

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Cryptococcus neoformans* A PARTIR DE EXCRETAS DE *Bubulcus ibis* Y *Columbia livia*, EN EL PERIMETRO URBANO DE LA CIUDAD DE POPAYÁN, COLOMBIA

CRISTIAN ALBERTO ANACONA TRÓCHEZ

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
UNIVERSIDAD DEL CAUCA
POPAYÁN
2014**

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Cryptococcus neoformans* A PARTIR DE EXCRETAS DE *Bubulcus ibis* Y *Columbia livia*, EN EL PERIMETRO URBANO DE LA CIUDAD DE POPAYÁN, COLOMBIA

Cristian Alberto Anacona Tróchez

Trabajo de grado para optar al título de Biólogo

Directora

Ms. Fabiola Eugenia González Cuellar

**Grupo de investigación Centro de Estudios en Microbiología y Parasitología
CEMPA**

Codirector

M.Sc. Luis Reinel Vásquez A.

**Grupo de investigación Centro de Estudios en Microbiología y Parasitología
CEMPA**

Asesora

M.Sc. Patricia Escandón

Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
UNIVERSIDAD DEL CAUCA
POPAYÁN
2014**

NOTA DE ACEPTACION

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Firma del Director

Firma del Estudiante

Popayán, 29 de Octubre de 2014

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios por acompañarme en mi corta trayectoria de vida.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la influencia directa o indirecta de muchas personas que estuvieron presentes en el desarrollo de este trabajo así como de mi desarrollo profesional y personal.

Le agradezco a mi directora Fabiola Eugenia González la confianza puesta en mí, al presentarme este proyecto y por toda su colaboración y apoyo para el desarrollo de éste trabajo.

Al profesor Luis Reinel Vásquez quien con su supervisión ayudo a corregir muchos errores no solamente en éste trabajo si no para mi futura vida profesional.

A mi asesora Patricia Escandón quien fue fundamental en el desarrollo del proyecto y me brindo parte de su gran conocimiento del cual me siento muy agradecido.

A los docentes de la Universidad del Cauca que me compartieron sus conocimientos, gracias a su paciencia y tiempo en enseñarme, tanto dentro como fuera de clase, enseñanzas que ayudaron a pulirme como un futuro excelente profesional.

Agradezco a las instituciones y dependencias de Colciencias, Instituto Nacional de Salud, y la Universidad del Cauca, quienes hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

Al Cuerpo de Bomberos Voluntarios de Popayán, Centrales Eléctricas del Cauca, Alcaldía de Popayán, Gobernación del Cauca, Arquidiócesis de Popayán, Museo Valencia, Bancolombia, Banco AV. Villas y Seguros Suramericana quien me colaboraron en la realización de los muestreos.

A mis amigos y compañeros, quienes me acompañaron en esta etapa y trabajaron conmigo hombro a hombro para la consecución de una meta, a quienes me compartieron un poco de su tiempo y me aguantaron en tantas situaciones, a quienes me brindaron y forjamos una buena amistad, amigos con quienes viví momentos que siempre recordare, a cada uno de ustedes gracias.

Por ultimo a mi familia y seres queridos, a mis abuelos y mi tío quienes con su cariño influyeron que me formara como persona. A mi padre quien con su tenacidad, profesionalismo y responsabilidad me ha ayudado a desarrollar cada meta que me he propuesto y me ha demostrado como se tienen que afrontar los desafíos del día a día.

A mi madre y hermana por no perderse un solo día de mi vida, por siempre sacarme una sonrisa, por alegrarme los días, por acompañarme y darme fuerza en todo lo que me proponga, son el motor de mi vida, gracias por estar siempre ahí.

A todos aquellos que ya no están, y me acompañan siempre donde quiera que me encuentre...

A todos ustedes, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
1. JUSTIFICACIÓN	15
2. ANTECEDENTES	17
2.1. Mundiales	17
2.2. Centroamérica y Suramérica	20
2.3. Colombia	22
3. MARCO TEÓRICO	24
3.1. Características de los Hongos	24
3.1.1. Levaduras	24
3.2. Características <i>Cryptococcus</i>	25
3.2.1. Bioquímicas y moleculares	25
3.3. Infección	27
3.4. Cuadro Clínico de la Criptococosis	30
3.4.1. Criptococosis pulmonar	31
3.4.2. Criptococosis del Sistema Nervioso Central	31
3.4.3. Meningitis	32
3.4.4. Meningoencefalitis	32
3.4.5. Criptococomas (granulomas criptococales)	32
3.4.6. Criptococosis Cutánea	33
3.4.6.1. Cutánea primaria	33
3.4.6.2. Cutánea secundaria	33
3.4.7. Criptococosis Ósea	34
3.4.8. Criptococosis Ocular	34
3.4.9. Criptococosis diseminada	34
3.5. Especies Hospederas	34
3.5.1. <i>Columba livia</i>	35
3.5.2. <i>Bubulcus ibis</i>	36
4. OBJETIVOS	37
4.1. Objetivo General	37
4.2. Objetivos Específicos	37
5. MARCO METODOLOGICO	38
5.1. Identificación del sitio de Muestreo	38
5.2. Características fisicoquímicas	38
5.3. Instrumento estructurado	38
5.4. Recolección de muestras	39
5.5. Procesamiento de las muestras	41

5.6. Identificación de <i>C. neoformans</i>	42
5.6.1. Identificación bioquímica de <i>C. neoformans</i>	42
5.6.2. Caracterización molecular	44
5.6.2.1. Extracción de ADN de alto peso molecular	44
5.6.2.2. Amplificación del gen orotidin monofosfato pirofosforilasa (OMPasa) llamado también <i>URA5</i>	45
5.6.2.3. PCR huella digital del ADN con el iniciador (GTG) ₅	47
5.7. Análisis Estadístico de Datos	47
6. RESULTADOS	49
6.1. Identificación de sitios y recolección de muestras	49
6.2. Aislamiento, caracterización e identificación bioquímica de <i>C. neoformans</i>	50
6.3. Caracterización molecular de <i>C. neoformans</i>	59
6.4. Caracterización de otras levaduras	63
7. DISCUSIÓN	64
8. CONCLUSIONES	75
RECOMENDACIONES	77
BIBLIOGRAFIA	79
ANEXOS	92

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Descripción de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i> con sus variedades, serotipos y genotipos.	25
Tabla 2. Sitios de muestreo con sus coordenadas respectivas.	49
Tabla 3. Porcentajes y recuentos de aislamientos de <i>C. neoformans</i> .	55
Tabla 4. Tabla de contingencia de patrón molecular con los porcentajes para cada sitio.	60

TABLA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Imagen de cultivos de <i>Cryptococcus</i> en agar CGB.	26
Figura 2. Patogenia de <i>Cryptococcus</i> .	27
Figura 3. <i>Columba livia</i> o paloma común.	35
Figura 4. <i>Bubulcus Ibis</i> o garcita de ganado.	36
Figura 5. Posición geográfica y perímetro urbano del municipio de Popayán.	40
Figura 6. Recolección de muestras.	41
Figura 7. Tratamiento y empaquetamiento de muestras ambientales.	42
Figura 8. Siembra en agar <i>Guizotia abyssinica</i> en cabina de bioseguridad tipo II.	43
Figura 9. Equipo para la identificación molecular.	46
Figura 10. Fotografías de cultivos en Agar <i>Guizotia abyssinica</i> .	50
Figura 11. Fotografía de montaje en azul de lactofenol de cepa No 157.	51
Figura 12. Fotografía de pruebas de productividad de Ureasa.	51
Figura 13. Fotografía de prueba inhibición en Cicloheximida.	52
Figura 14. Pruebas de confirmación de <i>Candida spp.</i>	52
Figura 15. Frecuencia de muestras positivas para <i>C. neoformans</i> por sitio.	53

Figura 16. Frecuencia de aislamientos totales de <i>C. neoformans</i> para cada uno de los sitios.	54
Figura 17. Recuento de aislamientos de <i>C. neoformans</i> versus temperatura.	56
Figura 18. Recuento de aislamientos de <i>C. neoformans</i> versus porcentaje de humedad relativa.	57
Figura 19. Recuento de aislamientos de <i>C. neoformans</i> versus altitud.	57
Figura 20. Frecuencia del patrón molecular en cada uno de los sitios muestreados.	59
Figura 21. Fotografía del gel de la ampliación del gen (GTG) ₅ por PCR.	61
Figura 22. Fotografía del gel controles para RLFP con el gen URA5.	61
Figura 23. Fotografía del gel de PCR del gen URA5 (amplificación del gen).	62
Figura 24. Fotografía del gel de restricción del gen URA5.	62
Figura 25. Frecuencia de hongo por cada sitio.	63

INDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Tabla de Porcentajes de aislamientos de <i>C. neoformans</i> entre todos los sitios.	92
ANEXO B. Pruebas Post Hoc para Anova de un factor, de las tres variables ambientales y las categorías de frecuencias.	93
ANEXO C. Prueba de subconjuntos homogéneos para temperatura.	94
ANEXO D. Prueba de subconjuntos homogéneos para Humedad Relativa.	94
ANEXO E. Prueba de subconjuntos homogéneos para Altitud.	95
ANEXO F. Tabla de Contingencia para tipo de hongo versus sitios y sus porcentajes de recuperación.	96
ANEXO G. Geolocalización de los sitios de muestreo con sus porcentajes de recuperación y patrones moleculares.	97

RESUMEN

La criptococosis, es una micosis sistémica, oportunista que afecta principalmente el sistema nervioso central de pacientes inmunosuprimidos, ocasionada por los miembros del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. Esta enfermedad ha retomado gran importancia debido a la aparición de la epidemia del sida, que recientemente ha marcado el estudio de la ecología y epidemiología de éste hongo. Este trabajo tiene como objetivos principales, caracterizar molecularmente los aislados de *C. neoformans* y determinar la frecuencia de distribución del hongo en el perímetro urbano de la ciudad de Popayán, en las excretas de paloma común (*Columba livia*) y Garcita de ganado (*Bubulcus ibis*). Se recolectaron 303 muestras de excrementos de *C. livia* y *B. ibis*, entre septiembre de 2012 a junio de 2013. Estas muestras fueron procesadas por técnicas convencionales; se aisló entre 5 a 18 colonias por muestra; la identificación de las colonias se realizó mediante pruebas bioquímicas y el patrón molecular se identificó mediante PCR huella digital con el iniciador (GTG)₅ y Polimorfismos de Restricción de Fragmentos Amplificados (RFLP) del gen *URA5*. Se identificaron 118 (38.94%) muestras que fueron positivas para *Cryptococcus spp.* en excretas de *C. livia*; se recuperaron 361 cepas de excrementos pertenecientes a *C. neoformans* var. *grubii* de las cuales 99,2% fueron patrón molecular VNI y 0,8% VNII, con una alta recuperación (24,4%) a una temperatura de 22,5°C y una humedad de 60,8%. Además se encontraron otras levaduras tipo *Candida spp.* y *Rhodotorula spp.* El análisis estadístico se realizó con el software estadístico SPSS v. 15, donde se aplicaron análisis de Chi², tablas de conglomeración, T3 de Dunnett y HSD de Tukey para determinar diferencias significativas entre los datos recolectados. Las excretas de *C. livia* son uno de los nichos fundamentales de *C. neoformans* var. *grubii*, hábitat ideal para su crecimiento, reproducción y dispersión, convirtiéndose en una de las principales fuentes de infección para pacientes susceptibles a ésta micosis.

INTRODUCCIÓN

La criptococosis es una enfermedad sistémica oportunista de amplia distribución mundial, causada por un hongo levaduriforme, que afecta principalmente a organismos inmunocomprometidos. Esta infección se adquiere por la inhalación de propágulos infectantes presentes en el ambiente provocando enfermedades respiratorias y neurológicas (basidiosporas o levaduras desecadas) (Casadevall and Perfect, 1998; Ellis and Pfeiffer, 1990; Sorrell and Ellis, 1997). El género *Cryptococcus* comprende 37 especies de hongos de los cuales solo 2 (*Cryptococcus gattii* y *Cryptococcus neoformans*) son relevantes para la mayoría de infecciones en humanos (Casadevall and Perfect, 1998; Heitman et al., 2011; Perfect and Casadevall, 2011). El complejo *C. neoformans/C. gattii* comprende la especie *C. neoformans* donde se encuentran las variedades *grubii*, serotipo A (Franzot et al., 1999) y la var. *neoformans* con el serotipo D; en la especie *C. gattii*, se encuentran los serotipos B y C y el híbrido entre las variedades *grubii* y *neoformans*, serotipo AD (Casadevall and Perfect, 1998) y el serotipo encontrado en Botswana, *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, VNB (Litvintseva et al., 2006; Litvintseva et al., 2003). Actualmente existen diferentes híbridos interespecies en algunos pacientes como AA, AB o BD (Bovers et al., 2008; Fenga et al., 2013).

Los biotipos de *C. neoformans* var. *neoformans* y *grubii* se han encontrado en varias fuentes ambientales relacionadas con excretas de diversas aves como canarios (*Serinus canarius*), periquillo común (*Melopsittacus undulatus*) y algunas especies de la familia Psittacidae, aunque principalmente a partir de excretas de la especie *Columba livia* (Sorrell and Ellis, 1997). En el año 2005, se reportó la presencia de *C. neoformans* var. *neoformans* en el sector urbano de la ciudad de Ica, Perú (Curo et al., 2005); luego en el 2006, en Bolívar, Venezuela se detectó la presencia de hongos patógenos primarios en excretas de palomas entre los cuales se encontraba *C. neoformans* var. *neoformans* (Cermeño et al., 2006). En 1994, se reportó la presencia de *C. neoformans* en distintas ciudades de Colombia, resultando positiva en el 53,8% de 52 muestras de excretas de *C. livia* (Ordoñez and Castañeda,

1994). Para el año 2005, informaron sobre la presencia de *C. neoformans* asociado a excretas y material vegetal de diferentes especies de árboles en el 46% de los municipios estudiados en el departamento de Cundinamarca (Quintero et al., 2005).

En el departamento del Cauca, desde el año 2003 al año 2014 se ha realizado una notificación pasiva al laboratorio de la secretaria departamental de salud de 25 casos de pacientes con criptococosis, a la cual es muy susceptible la población de personas con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), población que ha ido incrementando según el Instituto Nacional de Salud, (Grupo de ITS-sida, Sub dirección de vigilancia y control en salud pública) los cuales reportaron 40 casos de VIH-sida en el Cauca en el año de 2004, convirtiendo esta enfermedad en un problema de salud pública que debe tratarse.

En el municipio de Popayán se han reportado alrededor de 60 casos de personas infectadas con el virus del VIH-sida en el año de 2011 (Secretaria De Salud Del Cauca, 2014) y 23 casos de pacientes seropositivos infectados con criptococosis, entre los años 2003 hasta 2012 (Instituto Nacional De Salud, 2012). Estos casos indican la presencia del hongo en la ciudad, pero son escasos los datos sobre criptococosis, dado que esta micosis es de vigilancia pasiva más no obligatoria (Escandón et al., 2012). Antes de la realización de este trabajo se desconocía la distribución ambiental de *C. neoformans* en Popayán, por lo tanto esta investigación constituye un gran aporte para la investigación científica.

El propósito de esta investigación fue complementar los resultados de estudios realizados a nivel nacional y reportar los primeros datos sobre la epidemiología de *C. neoformans* en la ciudad Popayán. Para el desarrollo de la investigación se realizó una recolección de excretas de *Bubulcus ibis* y *C. livia* con un posterior tratamiento para aislar e identificar, por medio de pruebas bioquímicas y moleculares posibles serotipos pertenecientes a *C. neoformans*. Además se georeferenció los diferentes sitios de muestreo para identificar nichos ambientales, los cuales pueden llegar a ser posibles focos de infección.

1. JUSTIFICACIÓN

La criptococosis es una infección sistémica que compromete principalmente al Sistema Nervioso Central (SNC) dada su capacidad neurotrópica, causando afecciones pulmonares y neuronales; el curso de la infección depende de la cantidad de esporas que inocule el paciente y de su estado inmunológico el cual es determinante en la virulencia de la cepa infectante.

El hongo *C. neoformans*, causante de la enfermedad, se encuentra comúnmente en el suelo, detritos de árboles, tejados, cúpulas, excretas o nidos de algunas especies de aves y se puede dispersar en forma de esporas en el ambiente. El desarrollo de esta infección ocurre cuando se inhala las levaduras de éste hongo, existe contacto del patógeno con alguna lesión en la piel o el paciente recibe un trasplante infectado; una vez la cepa este dentro del cuerpo, esta desarrolla una capsula que puede llegar a medir hasta 6 veces su tamaño inicial. Cuando la infección ha alcanzado a los pulmones, puede permanecer en éstos, o diseminarse por todo el cuerpo por vía hematogena. La presencia de éste agente infectante en los alveolos desencadena una respuesta del sistema inmune del paciente, que en condiciones normales, es suficiente para controlar la infección; pero en personas con alguna afección en su sistema inmune, él hongo se disemina en el huésped y afecta principalmente al SNC, causando una meningoencefalitis.

Esta infección posee una distribución mundial, observándose principalmente en países en desarrollo y puede afectar tanto a humanos como animales. En el mundo se han descrito numerosos casos de muertes de pacientes a causa de la criptococosis. En Suramérica, los reportes sobre la incidencia de esta enfermedad han aumentado considerablemente lo cual ha hecho que diferentes investigadores e instituciones de Suramérica se interesen por conocer sobre la epidemiología de este patógeno.

Los aportes de esta investigación dentro del campo científico e investigativo consistirán en la identificación de los nichos ecológicos de *C. neoformans* en el

perímetro urbano la ciudad de Popayán, el aislamiento, tipificación de sus serotipos y la georeferenciación de posibles focos de contaminación. En el departamento del Cauca se observa que no existe información publicada sobre la epidemiología de *C. neoformans* dejando un claro vacío de conocimiento no solo para el departamento sino para toda la comunidad científica en general.

La información recolectada será suministrada a las entidades de salud pública, quienes deberán crear estrategias para minimizar las posibles fuentes de infección que puedan afectar a pacientes inmunocomprometidos, evitando ser susceptibles de sufrir esta infección. Además se aportarán datos estadísticos e informativos para la comunidad científica que realiza trabajos de seguimiento de la epidemiología de este patógeno. Otro de los beneficios es la formación investigativa de los participantes en éste proyecto, como en la metodología de campo para identificar los nichos ambientales de este hongo, en procedimientos para el aislamiento de *C. neoformans* con procesos estandarizados de cultivos y en la identificación de patrones moleculares mediante técnicas moleculares que se llevaron a cabo en el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS). Los participantes de este proyecto fortalecieron aptitudes en el campo de la investigación, lo que acarrea beneficios no solo a los participantes, si no a la comunidad científica y a la sociedad en general.

Este trabajo está enmarcado dentro de un macro proyecto denominado “Predicción de posibles áreas endémicas para *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* en Colombia: modelo ecológico de áreas en riesgo”, proyecto financiado por Colciencias y desarrollado en colaboración con el grupo de microbiología del Instituto Nacional de Salud.

1. ANTECEDENTES

2.1 MUNDIALES

En 1894, el científico italiano Sanfelice, obtuvo un aislamiento de una levadura capsulada y mucóide a partir del jugo de un melocotón fermentado a la que clasificó como *Saccharomyces neoformans* (Franzot et al., 1999), casi simultáneamente, en Alemania Otto Busse (1894) y Abraham Buschke (1895), notificaron por separado, el primer aislamiento de un hongo de características similares a partir de una lesión pseudosarcomatosa de la tibia de una mujer de 31 años. El patólogo Busse descubrió formaciones redondeadas en la lesión y procedió a aislar este hongo por medio de cultivo, resultando positivo para levadura. La paciente murió de una enfermedad diseminada y el hongo fue denominado como *Saccharomyces hominis* (Vázquez Tsuji et al., 2005). Luego, en el año de 1896, Ferdinand Curtis, aisló de un absceso inguinal de un joven francés de Lille, una especie de levadura que parecía causar tumores mixomatosos. Curtis experimentó con diversos animales encontrando la formación de enormes lesiones tumorales en pulmones, bazo y riñones. Curtis nombró esta cepa como *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens*. En 1901, Jean Paul Vuillemin, en Francia no encontró las típicas ascosporas del género *Saccharomyces*, además observó que no fermentaba los carbohidratos y la clasificó en el género *Cryptococcus*. Nombró al primer aislado clínico de Busse como *Cryptococcus hominis* y *Cryptococcus neoformans* para el aislamiento de Sanfelice (James A, 2010).

Rhoda Benham en 1935, fue la primera persona en dividir las dos variedades del *C. 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 *C. neoformans*, al aislarlo de la tierra, nidos y heces de las palomas y gallinas (Emmons, 1951; Levine et al., 1957). En el año de 1966, en dos ciudades de EEUU se aisló *C. neoformans* de excretas de Paloma, lo que corroboró

el estudio hecho por Chester W. Emmons y abrió las puertas a nuevos estudios epidemiológicos. En los años de 1966 y 1968, siguiendo el mismo procedimiento de Evans, identificaron la existencia cuarto serotipo el cual denominaron serotipo D. (Wilson et al., 1968).

A partir de 1970 se analizaron las diferencias en la bioquímica, morfología, serología y epidemiología de las variedades de *Cryptococcus*, con la ayuda del médico F. Gatti, el cual obtuvo el aislamiento de una levadura, en una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR), de un niño con meningitis en el Zaire (Gatti and Eeckels, 1970) y que Vanbreuseghem más adelante considero como una biovariedad o biotipo y propuso la denominación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Vanbreuseghem and Takashio, 1970).

Un gran avance en el conocimiento de *C. neoformans* en 1975 cuando K.J. Kwon Chung, descubrió la reproducción sexual de ésta levadura mediante cruces de cepas compatibles “matting” a y α y se produjeron los basidiomicetos de la fase teleomorfa, por lo que se clasifico en el género *Fillobasidiella* (Kwon-Chung, 1975).

También en la década de los 80, se realizaron hallazgos de gran interés en varios tópicos de las variedades de *Cryptococcus*. Al estudiar la actividad enzimática de la fenoloxidasa, enzima encargada de producir la melanina en *Cryptococcus*; reporto la existencia de cepas mutantes no productoras de melanina que tenían menos virulencia en modelos animales experimentales (KJ. et al., 1982), indicando la importancia de esta enzima como factor de patogenicidad; realizó diferencias epidemiológicas de los serotipos de *Cryptococcus* (Kwon-Chung and Bennett, 1984), así como también investigo las características bioquímicas de la ureasa, enzima clave para la identificación en el laboratorio de *Cryptococcus* (Kwon-Chung et al., 1987).

Años más tarde, Kwon Chung y colaboradores, encontraron que los tipos A y D eran similares entre sí, pero a la vez diferentes de los serotipos B y C esto llevo a que se reclasificaran las especies de *C. 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). Luego de encontrar que el hongo *Cryptococcus* tenía diferentes variedades y serotipos, la búsqueda sobre características que establecieran la identificación más exacta para *Cryptococcus* se intensificó. Los primeros estudios moleculares realizados en el año de 1994, se analizaron aislados de excretas de paloma y muestras clínicas de pacientes infectados, por medio de RFLP (por sus siglas en inglés Restriction fragment length polymorphism) en la ciudad de Nueva York, EEUU (Casadevall et al., 1994). Entre los años de 1995 y 1997 se realizaron diversos estudios donde se encontraron aislamientos ambientales y clínicos de *C. neoformans* en las ciudades de España, Irán, Nagasaki y Nepal (Colom Valiente et al., 1997; Khosravi, 1997; Pal, 1997; Yamamoto et al., 1995). Estos reportes logran indicar que el hongo posee una dispersión mundial como lo indican diversos autores.

En el año de 1999 la comunidad científica centro su atención hacia la isla de Vancouver, British Columbia (BC), Canadá, por un atípico brote de criptococosis ocasionado por *C. gattii*, el cual dio lugar a una de las mayores incidencias de esta infección en todo el mundo (Fyfe et al., 2008; Galanis and Macdougall, 2010; MacDougall et al., 2011). El reservorio natural de *C. gattii* parece ser suelo y restos de plantas, y se ha asociado con numerosas especies de árboles, al contrario de *C. neoformans*, el cual se encuentra en su mayoría en las excretas de animales hospederos (Kwon-Chung and Bennett, 1984; Sorrell, 2001). Actualmente, alrededor del 18% de los pacientes en Columbia Británica tienen esta enfermedad diseminada, incluyendo meningitis y criptococomas cerebrales (Fyfe et al., 2008) y la tasa de letalidad entre los residentes de BC durante 1999-2007 fue de 8,7% (Fyfe et al., 2008; Galanis and Macdougall, 2010), esta epidemia alcanzó a propagarse a la zona noreste de los EEUU, en su litoral pacífico.

Los estudios realizados es cuanto a esta epidemia demostraron que el nicho ambiental de *C. gattii*, no solo se desarrolla en zonas tropicales sino que también

se desarrolla en zonas templadas y frías que se suponía era una de las características del nicho ambiental de *C. neoformans* (Negroni, 2012).

En el año de 2003 se indicó la presencia de un nuevo patrón molecular identificado en una población clínica en Botswana, África, a este se le denominó VNB y el cual es geográficamente restrictivo (Fenga et al., 2013; Litvintseva et al., 2006). Luego en diferentes estudios realizados se encontró la existencia de nuevos híbridos, dada su alta recombinación al tener reproducción tanto sexual como asexual, resultando serotipos AB y BD (Bovers et al., 2008; Bovers et al., 2006; Fenga et al., 2013) .

Posteriormente en los años de 2005 y 2011 se encontraron los primeros aislamientos de *C. neoformans* y *C. gattii* en las ciudades de Seúl, Corea y Túnez, respectivamente. (Chee and Lee, 2005; Mseddi et al., 2011).

Desde su descripción inicial la criptococosis fue considerada como una infección mortal; aunque la mayoría de los informes se refería a pacientes con cáncer, enfermedades sistémicas o con infección meníngea (Perfect, 1989), pero esta enfermedad adquiere un gran protagonismo con la aparición de la epidemia del sida, causando un estimado de 1 millón de casos y 625.000 muertes por año debido a meningitis solo en pacientes con VIH en el mundo (Park et al., 2009). En los países como Suramérica y África los porcentajes de casos de pacientes infectados con criptococosis están alrededor del 10 al 30% en pacientes seropositivos (Mazuelos and Valverde, 2001).

2.2 CENTROAMÉRICA Y SURAMÉRICA

Los estudios y reportes realizados en Centroamérica y Suramérica, han sido muy diversos y han ampliado el conocimiento sobre la epidemiología de *Cryptococcus*; en 1995, México, se analizaron diversos sustratos, como frutas, plantas y excretas de aves, entre ellas algunas especies de loros encontrando *C. neoformans* en sus aislados (López-Martínez and Castañón-Olivares, 1995); en el año de 2003 se tipificaron molecularmente aislamientos ambientales y clínicos en el estado de Rio

Grande do Sul, Brasil, lo que abrió el camino para complementar estudios posteriores en Suramérica (Casali et al., 2003); en los años del 2005 al 2008 se reportaron nuevos aislamientos de *Cryptococcus*, en países de Perú (Curo et al., 2005), Chile (Arredondo González, 2006), Venezuela (Cermeño et al., 2006) y Colombia (Quintero et al., 2005), coincidiendo con la literatura que reporta la presencia de este hongo en zonas tropicales. En el año de 2006, estudiaron la presencia de *C. neoformans* y *C. gattii* en especies de aves cautivas en un zoológico al sur de Brasil, revelando que en 10 de 55 excretas de aves (18.18%) resulto positiva para *Cryptococcus* (Abegg et al., 2006); en los años de 2005 y 2006 se realizaron dos estudios en Brasil destacando, que la presencia de *C. neoformans* y *gattii* en la cloaca de las aves se ve en menor proporción, debido a la competencia con microbios intestinales y la alta temperatura corporal de las aves (Cafarchia et al., 2006; Hasimoto Souzal et al., 2005). Por otro lado en el año de 2006, en el estado de Bolívar, Venezuela, determinaron la presencia de hongos patógenos primarios en los excrementos de paloma en donde la incidencia fue mayor en cuanto a hongos filamentosos tales como: *Aspergillus spp.* (31,1%), *Mucor spp.* (20,2%), *Penicillium spp.* (9,5%) y *Fusarium spp.* (6,7%), en cuanto a cepas aisladas fueron las especies como *Candida albicans* (4,1%), *Cryptococcus albidus* y *Rhodotorula spp.* (2,7%), *C. neoformans var. neoformans* (1,4%), *Trichosporon asahii* (1,4%), *Curvularia*, *Microsporum* y *Phoma* así como *Histoplasma capsulatum* (1,3%) observando que hay un riesgo de infección con estos hongos patógenos (Cermeño et al., 2006). En el año de 2006 se realizó un estudio en la ciudad de Santiago de Chile, recolectando 300 muestras de excretas de aves, divididas en tres tipos, secas, húmedas y protegidas, de las cuales solo fueron positivas para *C. neoformans* en las excretas protegidas (78%), factores como la radiación solar, y humedad afectan el crecimiento del hongo (Arredondo González, 2006). Para el año de 2010, se publicó un estudio en aves urbanas de la ciudad de Fortaleza, al norte de Brasil, donde analizaron las excretas y cloacas de éstas aves, encontrando especies patógenas para el hombre como *C. neoformans* y *C. gattii*, *C. albidus*, *C. laurentii* y *C. uniguttulatus*, *Candida spp.* y *Trichosporon spp.* (Costa et al., 2010).

Posteriormente, en un estudio realizado en El Salvador, en el 2011, se observó que de 52 muestras recolectadas se aislaron 19 muestras positivas para *C. neoformans* (36.5%), siendo un porcentaje a tener en cuenta ya que las muestras fueron obtenidas en sitios de alta incidencia de población humana (parques, iglesias, plazoletas) (Ayala Chavarría et al., 2011).

2.3 COLOMBIA

Entre los estudios ambientales y clínicos realizados en diferentes ciudades de Colombia, en 1994, informaron sobre aislamientos en el 53.8% de 52 muestras de excretas, obtenidas en distintas ciudades de Colombia (Ordoñez and Castañeda, 1994), luego dos años después se realizaron dos estudios, uno analizó las excretas de palomas, en el perímetro urbano de la ciudad de Cali, indicando la presencia de *C. neoformans*; de 119 muestras, 59 (49.6%) fueron positivas para *C. neoformans* var. *neoformans*, demostrando que esta levadura tiene una amplia distribución en la ciudad (Bejarano et al., 1996); el otro estudio se realizó analizando las excretas y el aire que circula en las jaulas de las aves del Zoológico de la ciudad de Cali, Colombia, se estudiaron 380 muestras, 110 excrementos y 270 cajas de Petri, de las cuales se encontraron solo dos muestras positivas, una para excrementos de *Caracara plancus* y una caja con aire de la jaula de la misma especie (Caicedo et al., 1999). Luego en el departamento de Cundinamarca, 2005, se realizó un estudio determinando una relación entre la distribución ambiental de las diferentes variedades de *C. neoformans* y los pisos térmicos del departamento de Cundinamarca; se recolectaron de 765 muestras provenientes de 26 municipios; resultaron positivos 104 cepas dentro de las cuales se encontró 31% serotipo A, 59% serotipo B y un 10% serotipo C. Este estudio demostró una inclinación por el piso térmico frío que presentó temperaturas entre los 12 y 18°C y altitudes entre 2000 y 3000 msnm (Quintero et al., 2005). Para este mismo año, en la ciudad de Bogotá y alrededores se analizaron 480 muestras de detritos de árboles que resultaron el 6,7% de muestras positivas, de las cuales el 99,9% resultó *C. neoformans* var. *gattii* y el 1% *C. neoformans* var. *grubii*. Por otra parte se

recolectaron 89 muestras de excretas de aves, de estas se observaron 7,9% de muestras positivas para *C. neoformans* var. *grubii* (Granados and Castañeda, 2005).

En el año de 2007 se publicó un estudio liderado por el grupo colombiano para el estudio de la criptococosis, los cuales recopilaron los datos de diferentes pacientes infectados con *Cryptococcus*, identificando 891 (95.7%) casos de neurocriptococosis, 27 (2.9%) de formas pulmonares, 5 (0.5%) de lesiones cutáneas, 2 (0.2) ganglionares, 2 (0.2%) de úlceras y 1 (0.1%) de otras formas clínicas. El 82.7% fueron hombres con predominio en los adultos jóvenes y 25 (2.7%) en niños. La infección por el virus del VIH se encontró en el 78.1% de los casos (Lizarazo et al., 2007).

Para el año de 2012 se publicaron los resultados de una vigilancia sobre criptococosis realizada durante los años 2006 a 2010, durante estos años se recibieron 526 encuestas; se determinó que el factor de riesgo prevalente fue la infección por VIH (83,5 %), y la criptococosis definió el sida en 23 % de los casos. La incidencia anual promedio en la población general fue de 2,4 por un millón de habitantes mientras que, en pacientes con sida, aumentó a 3,3 por 1.000. 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 *C. neoformans* var. *grubii*, 1% *C. neoformans* var. *neoformans*, y 3,4% *C. gattii* (Escandón et al., 2012).

2. MARCO TEORICO

3.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS HONGOS

Los hongos (del latín *Fungī*) son organismos eucariotas, heterótrofos, con nutrición por absorción, unicelulares y/o multinucleados, no forman tejidos, típicamente inmóviles, aerobios o aerobios facultativos y cada célula puede generar por si sola un nuevo organismo de la misma especie (Arredondo González, 2006). Se reconocen tres grandes grupos: mohos u hongos filamentosos, las levaduras y las setas (Brooks et al., 2005).

Existen más de 200.000 especies de hongos, de los cuales solo unos pocos cientos de especies participan en las enfermedades humanas y 90% de esas micosis pueden atribuirse a unas cuantas docenas de hongos. Estas especies de hongos son indispensables en la naturaleza para reciclar y descomponer la materia orgánica. Tienen un mejor desarrollo en hábitats oscuros y húmedos, aunque crecen donde tengan una buena cantidad de materia orgánica. Entre los hongos se encuentran las levaduras, las cuales son fundamentales en técnicas industriales en los que se necesita procesos de fermentación, además constituyen importantes herramientas de investigación de procesos biológicos (Brooks et al., 2005).

3.1.1 Levaduras. Las levaduras son hongos unicelulares, la mayoría perteneciente a los ascomicetos, y una pequeña parte a los basidiomicetos, normalmente ovals, casi esféricas o cilíndricas, no tienen flagelos pero poseen la mayoría de organelos de los eucariotas, su reproducción puede ser asexual por gemación, división transversal o por reproducción sexual a través de la formación de esporas. Cada yema que se separa puede crecer y convertirse en una nueva levadura y algunas se agrupan formando colonias (Arredondo González, 2006; Brooks et al., 2005).

La reproducción sexual de los hongos implica la unión de núcleos compatibles; ésta reproducción genera esporas como por ejemplo: en los zigomicetos el cigoto

evoluciona a una zigospora; en los ascomicetos, a una ascospora; y en los basidiomicetos, a una basidiospora (Walker, 1999). El basidiomiceto *C. neoformans* produce la enfermedad llamada criptococosis, la cual se adquiere una vez inhalado este microorganismo (Deacon, 1998).

3.2 CARACTERÍSTICAS DE *Cryptococcus*

Morfológicamente *Cryptococcus* son levaduras redondas u ovals, de 3 a 8 μm de diámetro con la capsula llega a medir hasta 20 μm . Se reproducen por gemación única, con un cuello estrecho entre la célula madre y la hija. Excepcionalmente se observa gemación múltiple, formas alargadas y pseudohifas. Poseen una capsula de naturaleza polisacárida que le confiere virulencia, protegiendo al hongo de la fagocitosis. Esta capsula se puede observar a través de un examen en fresco con tinta china; tinción negativa que tiñe toda la preparación excepto la capsula. Crece muy bien en todos los medios, dado que poseen una capsula muy pequeña formando colonias muy parecidas a las del género *Candida*. (Mazuelos and Valverde, 2001).

3.2.1 Características bioquímicas y moleculares. El metabolismo de éste hongo es aerobio, por lo que no son fermentadoras, asimilan varios hidratos de carbono y producen la enzima ureasa. Recientes estudios, lo han clasificado dos especies y cinco serotipos con base a sus características morfológicas, bioquímicas y genéticas, las cuales son: *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo D, el híbrido AD, y *C. gattii*, serotipos B y C (Boekhout et al., 2001; Franzot et al., 1999; Kwon-Chung et al., 2002), Estos serotipos pueden identificarse utilizando diversas técnicas genéticas y moleculares como análisis de Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP), Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) del gen *URA5* y *PLB1*, Tipificación de la Secuencia del Locus Múltiple (MLST) (Harris et al., 2012; Meyer et al., 2003) (Tabla 1). Las técnicas moleculares también han permitido establecer la relación entre un genotipo en particular y su origen geográfico, como el caso del

brote de criptococosis originado en la isla de Vancouver, Canadá, en el cual, con el empleo de la técnica MLST de ocho loci poliformicos (Sx1a o Sx1 α , IGS1TEF1, GPD1, LAC1, CAP10, PLB1 y MPD1) se logró sugerir dos posibles orígenes geográficos (Australia o Sudamérica) para los aislamientos causantes del brote (Fraser et al., 2005).

Tabla 1. Descripción y recopilación de *C. neoformans* y *gattii* con sus variedades, serotipos y genotipos.

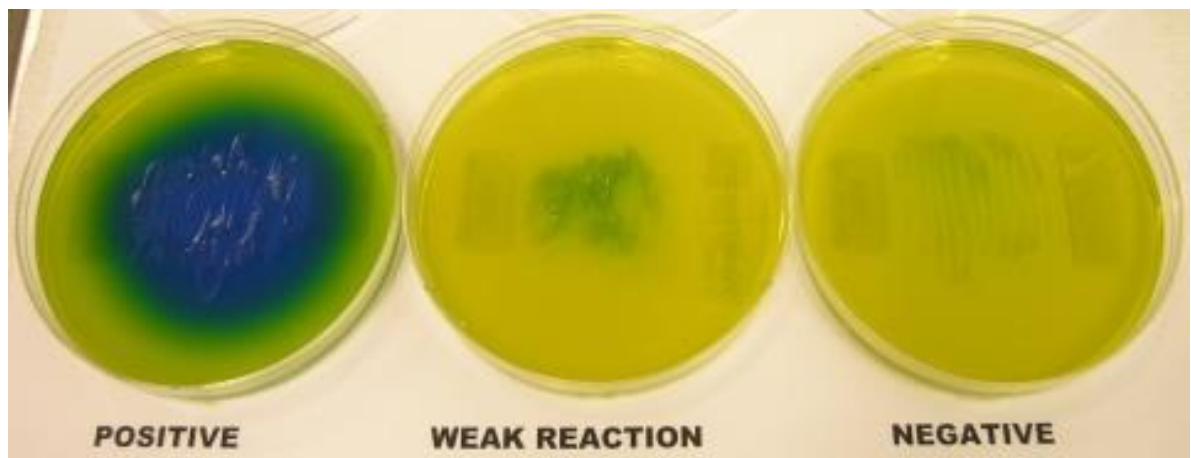
Genero	Especie	Variedad	Serotipo	PCR Huella digital (Escandón et al., 2006; Meyer et al., 2003; Meyer et al., 1999)	AFLP Boekhout et al. (Boekhout et al., 2001)	RFLP URA5 Meyer et al. (Meyer et al., 2003)	RFLP PLB1 Latouche et al. (Latouche et al., 2003)	
<i>Cryptococcus</i>	<i>neoformans</i>	<i>grubii</i>	A	VNI	AFLP1	VNI	A1	
				VNII	AFLP1A	VNII	A2	
				---	VNB	---	---	
		<i>neoformans</i>	D	VNIV	AFLP2	VNIV	A4	
	Hibrido	AD	VNIII	AFLP3	VNIII	A3 (A1, A4)		
	<i>gattii</i>	----		B/C	VGI	ALFP4	VGI	A5
				B/C	VGII	AFLP5	VGII	A6
				B/C	VGIII	ALFP6	VGIII	A7
				B/C	VGIV	AFLP7	VGIV	A8

Se recopilan diferentes técnicas moleculares. Tomado y modificado de Escandón 2009 (Escandón and Montilla, 2010).

Existen diferencias entre las dos especies, tanto desde el punto de vista patogénico como de distribución geográfica de tal forma que *C. neoformans* var. *grubii* se ha relacionado con la infección en los pacientes inmunodeprimidos, siendo de distribución mundial, mientras que *C. gattii* se ha descrito principalmente en infecciones de pacientes inmunocompetentes y su distribución está más restringida a países tropicales y subtropicales. También se diferencian estas variedades por sus características bioquímicas: los serotipos B y C, asimilan los ácidos 1-malico, fumárico y succínico, producen un color verde sobre agar con L-cavanina-glicina-azul de bromotimol, y asimilan la glicina como única fuente de carbono. Por otro

lado los serotipos A y D, no presentan estas reacciones (Fig. 1). Existen también diferencias genéticas por hibridación del DNA. La distribución en la naturaleza es también diferente: los tipos A y D se asocian con las deyecciones de palomas y otras aves, mientras que los tipos, B y C, se han encontrado en distintas especies de eucaliptos y en koalas (Mazuelos and Valverde, 2001). Además de estos serotipos se han encontrado algunos híbridos que se han observado solamente en laboratorio, estos son AA, AB, AD y BD. Se presume que estos híbridos se presentan en el ambiente dada la alta clonalidad de *Cryptococcus* pero hasta ahora solo se ha encontrado en pacientes (Bovers et al., 2008; Bovers et al., 2006).

Figura 1. Imagen de cultivos de *Cryptococcus* en agar CGB.



La placa de la izquierda representa una reacción positiva con *C. gattii*; la placa central muestra una reacción débil alrededor del inóculo, que se interpreta como negativa y la placa de la derecha muestra una reacción negativa con *C. neoformans*. Imagen tomada y modificada de (Klein et al., 2009).

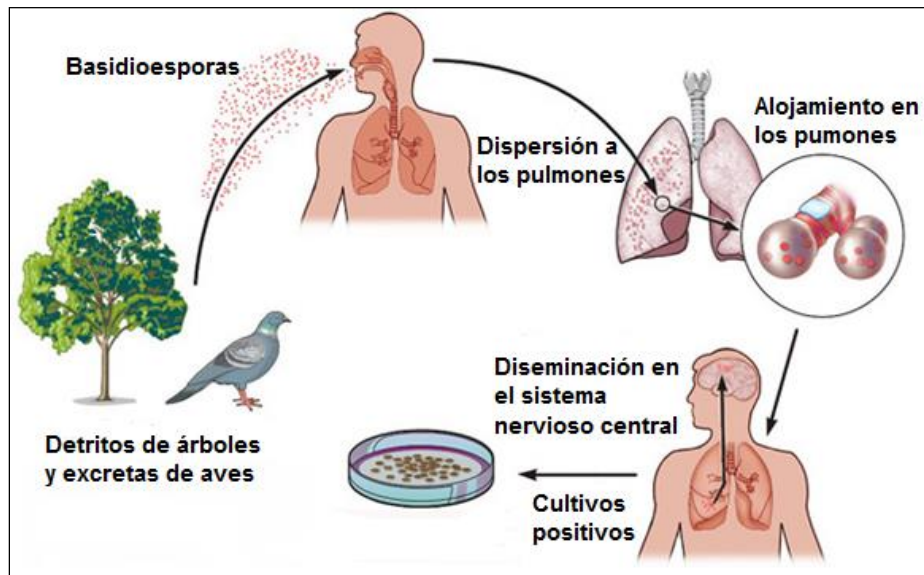
3.3 INFECCIÓN

El desarrollo de esta infección ocurre cuando se inhala las basidiosporas ambientales de *Cryptococcus*, existe algún contacto del patógeno con alguna lesión en la piel o el paciente recibe un trasplante infectado; una vez la cepa este dentro del cuerpo esta desarrolla una capsula que puede llegar a medir hasta 6 veces su

tamaño inicial. La presencia de *Cryptococcus* en los alveolos pulmonares desencadena una respuesta de la inmunidad celular y humoral del huésped, que en condiciones normales es suficiente para controlar la infección, auto controlándose en el 90% de los casos (Vázquez Tsuji et al., 2005). Según modelos experimentales, la resistencia a la infección parece depender de la activación de los macrófagos y neutrófilos por linfocitos más sensibilizados, además de una buena respuesta humoral con anticuerpos opsonizantes u opsoninas (Mazuelos and Valverde, 2001).

Los pacientes más susceptibles a la infección por *Cryptococcus* tienen alteraciones de la inmunidad celular o humoral, razón por la que el microorganismo no es eliminado por los mecanismos de defensa apropiados cuando penetra en las vías respiratorias; de tal manera la infección progresa, invade el pulmón, se disemina por vía hematógica y llega al SNC (Vázquez Tsuji et al., 2005) (Fig. 2).

Figura 2. Patogenia de *Cryptococcus*.



Se encuentra en el ambiente en detritos de algunas especies de árboles y excretas de aves. Se observa como las esporas son inhaladas y luego llegan a los pulmones, posteriormente se diseminan en el Sistema Nervioso Central y se confirma la infección recolectando muestras clínicas y realizando estudios micológicos. Tomado

y modificado de <http://bmolchem.wisc.edu/labs/hull/research.html> (University of Wisconsin, 2007).

La patogenicidad de *Cryptococcus* está determinada por interacciones de la capsula que impide la fagocitosis por la activación del sistema del complemento, conjuntamente con la acción de la enzima fenol-oxidasa que contribuye al neurotropismo del hongo. También se presume la existencia en el tejido nervioso de factores nutricionales selectivos, tales como asparagina, que pueden funcionar como fuentes de nitrógeno y estimular el crecimiento del *C. neoformans* (Chaskes and Tyndall, 1975). No se ha determinado totalmente la razón del tropismo tan marcado por el SNC, se cree que *C. neoformans* puede escapar del sistema inmunitario del huésped en el LCR, debido a la baja tasa de unión de la fracción C3 del sistema de complemento a la superficie de la capsula (Kozel, 1995). La baja concentración de glucosa presente en las meninges también puede favorecer el tropismo por el SNC ya que se ha demostrado que altas concentraciones de glucosa inhiben la acción de la enzima fenoloxidasa. (Polacheck et al., 1982), la acción de esta enzima protege a las células fúngicas contra ciertas sustancias oxidantes como los rayos UV que suelen tener efecto fungicida, así como también sirve de protección contra algunos micóticos (Wang and Casadevall, 1994).

La fenoloxidasa es una enzima catalizadora, que a partir de componentes difenolicos, produce el pigmento melanina la cual protege de los efectos oxidantes de células huéspedes. Se ha determinado en diferentes estudios que la melanina parece concentrarse en el lado interno de la pared celular, lo que le permitiría interactuar con sustancias del lado extracelular, previniendo la penetración de la levadura. También las propiedades químicas de la melanina la hace un fotoprotector muy eficiente, absorbiendo la radiación ultravioleta nociva y transformándola en energía (Canelo D and Casquero C, 2000; Polacheck et al., 1982; Rhodes et al., 1982).

3.4 CUADRO CLÍNICO DE LA CRIPTOCOCOSIS

El cuadro clínico es diferente en pacientes con sida y en los no infectados con el VIH, en individuos inmunocompetentes la infección es autolimitada y poco sintomática. La enfermedad diseminada ocurre en huéspedes con alteraciones inmunológicas o con enfermedades debilitantes como linfomas, leucemias, lupus eritematoso sistémica, diabetes mellitus descompensada y especialmente en pacientes con sida. La mayoría de los pacientes tienen síntomas inespecíficos como la cefalea, fiebre y malestar general. Los hallazgos físicos son escasos y no orientan el diagnóstico: los signos meníngeos, neurológicos focales o las convulsiones son infrecuentes. Es importante que el médico mantenga una alta sospecha de esta enfermedad para llegar al diagnóstico. De acuerdo al órgano afectado por la enfermedad, puede ser pulmonar, cerebral, cutánea, ósea o diseminada (Vázquez Tsuji et al., 2005).

Los primeros estudios han identificado varios factores de riesgo de infección de *Cryptococcus spp.*, sin embargo, estos no distinguen entre especies (MacDougall et al., 2011). En estudios experimentales, se ha mostrado que el uso de esteroides, disminuye la resistencia del huésped a esta infección (Levine et al., 1957). En otros estudios, las investigaciones han relacionado el uso de corticosteroides con un mayor riesgo de morir de meningitis criptocócica (Diamond and Bennett, 1974) y con un mayor riesgo de enfermedad diseminada (Duperval et al., 1977). Una encuesta a nivel nacional en Francia demostró en 163 pacientes con VIH, negativos para criptococosis (1985-1993), 52 pacientes mostraron tener tumores malignos (32%), de estos, 10 pacientes fueron sometidos a un trasplante de órganos (19%), de los cuales recibieron terapia con corticoesteroides (33%) el cual fue el principal factor predisponente para criptococosis (Dromer et al., 1996). Otros frecuentemente identificados condiciones predisponentes para la criptococosis incluyen sarcoidosis, hiper-inmunoglobulina (Ig) M y los síndromes de hiper-IgE, y CD4 + T-celullinopenia en los que son VIH negativos (Casadevall and Perfect, 1998). Los informes de casos

han sugerido también que la cirrosis es un factor de riesgo para peritonitis criptocócica (Mabee et al., 1995).

3.4.1 Criptococosis Pulmonar. La criptococosis pulmonar es una entidad clínica que por lo regular (95%) cursa de manera asintomática o subclínica, y solo se puede detectar mediante correlación de cambios radiológicos sugestivos y serología, a través de la detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFA). Los pocos casos sintomáticos se manifiestan desde estadios leves hasta graves, según el estado inmune del paciente. (Bonifaz, 2012; Subramanian and Mathai, 2005)

La sintomatología de la criptococosis leve simula un cuadro gripal, acompañado de tos, fiebre y discreto dolor pleural; no obstante, cuando el proceso se intensifica, la fiebre es más constante, hay pérdida de peso, astenia, adinamia y el paciente presenta tos con esputo mucoso o hemoptoico, en casos graves, se confunde con la tuberculosis miliar. (Chayakulkeeree and Perfect, 2006; Severo et al., 2011).

La mayoría de los reportes de casos pulmonares son ocasionados por *C. gattii*, y se pueden presentar en pacientes inmunocompetentes, ocasionando también más criptococomas tanto en el pulmón como en el cerebro (Bonifaz, 2012).

3.4.2 Criptococosis del Sistema Nervioso Central. Es la variedad más frecuente y la que más se diagnostica; se origina a partir del foco pulmonar, posterior a una diseminación hematogena; se presenta en más de 80% de los casos (Chayakulkeeree and Perfect, 2006; Severo et al., 2011). El neurotropismo de *C. neoformans* se ha atribuido a varias razones como la falta del factor anticriptococoso en LCR, por que puede evadir con facilidad la respuesta inmune, la producción por parte del hongo de la fenoloxidasa y la presencia de sustancias que estimulan su crecimiento como asparagina y creatinina (Tristano, 2010). La criptococosis de SNC se puede presentar en tres formas o variedades: meningitis, meningoencefalitis y criptococomas.

3.4.3 Meningitis. Es la variedad clínica más frecuente y por lo regular se manifiesta en forma subaguda o crónica y gradual; inicia con cefalea intensa o frontal, así como dolor retro-ocular; hay fiebre constante pero no intensa (38°C). Los signos de meningitis crónica están presentes: rigidez y dolor de cuello; los signos de Kerning y Brundzinski son positivos. Conforme el padecimiento se hace crónico, el enfermo presenta vomito constante, vértigo, delirio, alucinaciones, irritabilidad, y cambios de personalidad; convulsiones jacksonianas y pérdida temporal de la memoria. En algunos casos hay compromiso oftálmico en forma de neurorretinitis y por la misma afección neuronal se presentan fotofobia, estrabismo, diplopía y nistagmo (Bicanic and Harrison, 2005; Bonifaz, 2012).

La meningitis criptococosa toma un rumbo crónico dependiendo de las condiciones del paciente, con reportes de cronicidad de hasta 20 años. Cuando el padecimiento progresa con rapidez, el ataque al estado general es severo; se manifiesta con gran pérdida de peso, astenia, y adinamia, dando paso al coma y por lo regular el paciente muere por insuficiencia respiratoria (Bicanic and Harrison, 2005; Bonifaz, 2012).

3.4.4 Meningoencefalitis. Es una entidad clínica rara, casi siempre de curso agudo y fulminante; se presenta en pacientes con severa inmunodepresión, como aquellos sometidos a intensa terapia inmunosupresora (trasplantes) o con VIH-sida. El enfermo presenta todos los signos y síntomas de una meningoencefalitis aguda y de inmediato cae en coma, y fallece en un término de 2 a 3 días (Bicanic and Harrison, 2005; Bonifaz, 2012; Subramanian and Mathai, 2005).

3.4.5 Criptocomas (granulomas criptococales). Son una entidad rara, aunque han tenido un ligero aumento cuando son ocasionados por *C. gattii*; se conforman por masas fúngicas que se desarrollan en el cerebro en forma de abscesos y que habitualmente se confunden con neoplasias. Los pacientes en un inicio presentan cefalea, náusea, vómito y convulsiones de tipo jacksoniano; la compresión cerebral y medular genera diversas manifestaciones oftálmicas,

hemiplejia y hemiparesia. El curso de esta variedad también es grave y migra fácilmente al coma, paro respiratorio y muerte (Pasqualotto et al., 2004; Reséndiz et al., 2008).

3.4.6 Criptococosis Cutánea.

3.4.6.1 Cutánea primaria. Es una entidad clínica rara; se inicia a partir de la inoculación del hongo por vía cutánea a través de una solución de continuidad, formándose un complejo primario similar al de la esporotricosis; según las condiciones del paciente (estado inmune), la lesión primaria puede involucionar por completo o manifestarse en forma de lesiones nódulo-gomosas. Cuando el proceso está bien establecido, la morfología cutánea es de abscesos ulcerados, o bien lesiones papuloides de tipo acneiforme. (Bonifaz, 2012; Christianson et al., 2003; Fromtling et al., 1985).

3.4.6.2 Cutánea secundaria. Es una entidad clínica más común y ocurre en 10-20% de los casos; se origina a partir de la diseminación hematológica o linfática de criptococosis pulmonar o meníngea, por lo que se considera como “signo centinela”. La topografía clínica preferente es en cara, cuello y miembros. La mayoría de los casos se presentan en forma de lesiones solitarias o múltiples; las más comunes son de aspecto papular o también llamadas acneiformes (severo) y moluscoides, o parecidas a los moluscos contagiosos, sobre todo cuando se manifiestan en cara y cuello. (Bonifaz, 2012; Dora et al., 2006)

En menor proporción llegan a presentarse en forma de lesiones nódulo-linfáticas, simulando esporotricosis o nudosidades; o bien adquieren un aspecto tumoral y verrugoso. La mayoría de los pacientes refieren escaso prurito y poco dolor, aunque hay casos excepcionales con gran dolor. A diferencia de la criptococosis primaria, esta variedad tiene mal pronóstico y se considera enfermedad marcador de sida. (Chayakulkeeree and Perfect, 2006; Rico and Penneys, 1985).

3.4.6 Criptococosis Ósea. Es una entidad clínica más o menos frecuente y se calcula que en promedio 10% de los casos de criptococosis tienen afección ósea. Se origina a partir de focos pulmonares o meníngeos; tiene una predilección en orden decreciente por huesos largos (fémur, tibia, esternón, etc.), huesos craneales y vertebras. Afecta también las articulaciones. Las lesiones más comunes son de periostitis, osteofibrosis y, sobre todo, francas zonas de osteolisis; en este último tipo de lesiones se llegan a originar fistulas que salen a la piel y drenan un material seropurulento mucoso. La sintomatología más frecuente es de intenso dolor óseo y artralgias. (Bonifaz, 2012; Chayakulkeeree and Perfect, 2006; Fromtling et al., 1985; Subramanian and Mathai, 2005).

3.4.7 Criptococosis Ocular. Es una entidad rara; la mayoría de los casos oculares son consecuencia de diseminación del padecimiento. Se presenta en general con papiledema, parálisis motora y coriorretinitis. Los casos con edema papilar casi siempre son consecuencia de la diseminación del cuadro meníngeo, por el aumento de la presión intracraneal. (Fromtling et al., 1985; Severo et al., 2011; Subramanian and Mathai, 2005).

3.4.8 Criptococosis diseminada. Se observa en pacientes severamente inmunosuprimidos o en estados pre mortem. *C. neoformans* y *C. gattii* pueden invadir casi todos los órganos, sobresaliendo hígado, intestino, bazo, corazón, próstata, testículos, etc.: en todos los niveles se observan lesiones granulomatosas y de aspecto gelatinoso. (Fromtling et al., 1985; Severo et al., 2011).

3.5 ESPECIES HOSPEDERAS

Las palomas y otras aves son reservorios del hongo y fuentes de infección, ya que albergan en su organismo al hongo *C. neoformans* sin desarrollar la enfermedad debido a que su elevada temperatura corporal es de aproximadamente 42°C, en estas condiciones el microorganismo sobrevive pero no se desarrolla. (Lopez-Martinez and Castanon-Olivares, 1995; McDonough et al., 1966).

3.5.1 *Columba livia* El papel de las palomas como portadoras de hongos patógenos fue establecido por Emmons (Emmons, 1955) en 1955, el cual aisló *C. neoformans* de las excreciones de palomas urbanas (*C. livia*) (Fig. 3). Tras el descubrimiento de Emmons, diferentes estudios han demostrado que las heces de paloma son un importante reservorio de *C. neoformans*. Estas excretas se pueden encontrar acumuladas en palomares, aleros de edificios, áticos o balcones de casas abandonadas donde anidan las palomas. Este hábitat desecado, alcalino, rico en sales y nitrógeno, es ecológicamente restrictivo pero no es infrecuente en el medio ambiente urbano (Pal, 1997; Rubio, 1998). Parece que la alta concentración de creatinina en el estiércol de paloma favorece el crecimiento de *Cryptococcus*, pero además, las heces de pichón, brindan otras características: ambiente alcalino, hiperosmolar y rico en muchos compuestos nitrogenados, además de la creatinina. Las concentraciones de esta levadura en el excremento de paloma a menudo exceden 10^6 organismos viables por gramo, lo que puede inferir que además de creatinina, también asimila xantina, urea y ácido úrico, compuestos abundantes en los excrementos de las aves (Rosario et al., 2008; Ruiz et al., 1981).

Figura 3. *Columba livia* o paloma común.



Fotografía tomada en la plazoleta de la Iglesia La Catedral, Popayán. Sitio de alta concurrencia de *C. livia* **N** 2° 26' 28.57", **W** 76° 36' 22.73", 1760 msnm. Copywrite Cristian Anacona.

3.5.2 *Bubulcus ibis* También conocida como garcita de ganado mide 46 a 51 cm aproximadamente, blanca, pequeña, rechoncha, con cuello grueso, pico amarillo y patas verdoso opaco. En plumaje nupcial tinte viciuña en coronilla, espalda y pecho, pico y patas rojizos. Siempre viven en bandadas numerosas, generalmente asociadas con ganado vacuno y otros animales pastando o siguiendo maquinaria agrícola en busca de insectos y pequeños vertebrados (Fig. 4). En las partes más cálidas son familiares las bandadas formadas en largas líneas al salir o entrar de los dormideros. Es una especie muy adaptable. Anida colonialmente, aunque generalmente no con otras garzas, hay solo una reproducción cada año (Hilty and Brown, 2001). Las excretas por lo general se encuentran húmedas, dado el sitio de vida, el cual es altamente húmedo, al estar cerca a riveras de ríos o espejos de agua. Estas excretas contienen un alto contenido de nitrógeno, fosforo y sales lo que puede contribuir al crecimiento de microorganismos.

Figura 4. *Bubulcus Ibis* o Garcita de ganado.



Fotografía tomada en el Santuario de las Garzas, sitio de anidación, Popayán, Cauca. **N** 2° 27' 69.03", **W** 76° 38' 72.6"; 1701 msnm. Copywrite Cristian Anacona.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

- Determinar la frecuencia y caracterizar molecularmente los aislados de *Cryptococcus neoformans*, en deyecciones de las aves, Garcita de ganado (*Bubulcus ibis*) y la Paloma común (*Columba livia*), en el perímetro urbano de la ciudad de Popayán.

4.2 ESPECÍFICOS

- Describir las condiciones ambientales del nicho ecológico del complejo *Cryptococcus neoformans*, dentro del perímetro urbano de Popayán.
- Caracterizar bioquímica y molecularmente las cepas positivas para *Cryptococcus neoformans*, identificando los patrones moleculares y serotipos respectivos para cada aislamiento.
- Establecer y georeferenciar la frecuencia de *Cryptococcus neoformans* en cada uno de los sitios muestreados

5. MARCO METODOLOGICO

5.1 IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE MUESTREO

La ciudad de Popayán, capital del departamento del Cauca se encuentra situada en el Valle de Pubenza, entre las cordilleras central y occidental, sus coordenadas son N 2°26'39", O 76°37'17". Tiene 265.702 habitantes, de acuerdo al censo del Departamento Administrativo Nacional de Estadísticas, DANE, elaborado en el año 2005. La extensión territorial de Popayán es de 512 km² y su precipitación media anual de 1.941 mm. El municipio de Popayán es eminentemente urbano (Fig. 5). Un 90% de la población ocupa esta área y el 10% restante, ocupa el área rural; el municipio se encuentra dividido en 9 comunas, 23 Corregimientos.

5.2 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

La ciudad de Popayán se encuentra a una altitud de 1.737 msnm, con una temperatura media de 18-19°C durante todo el año, alcanzando temperaturas máximas en los meses de julio, agosto y septiembre en horas del medio día que alcanzan una temperatura de 29°C y mínimas de 10°C en horas de la madrugada en verano. También cuenta con extensas áreas planas y onduladas, ubicadas principalmente en las proximidades del río Cauca. La ciudad por su ubicación disfruta dos los pisos térmicos y debido a esto su clima es templado.

5.3 INSTRUMENTO ESTRUCTURADO

Se registraron los datos de colección de las muestras acopiadas en las salidas de campo. Estos datos hicieron referencia a localización geográfica (GPS), temperatura ambiental (T°), humedad relativa (%H) y altitud al nivel del mar (msnm), de cada uno de las muestras, como de los aislamientos recuperados.

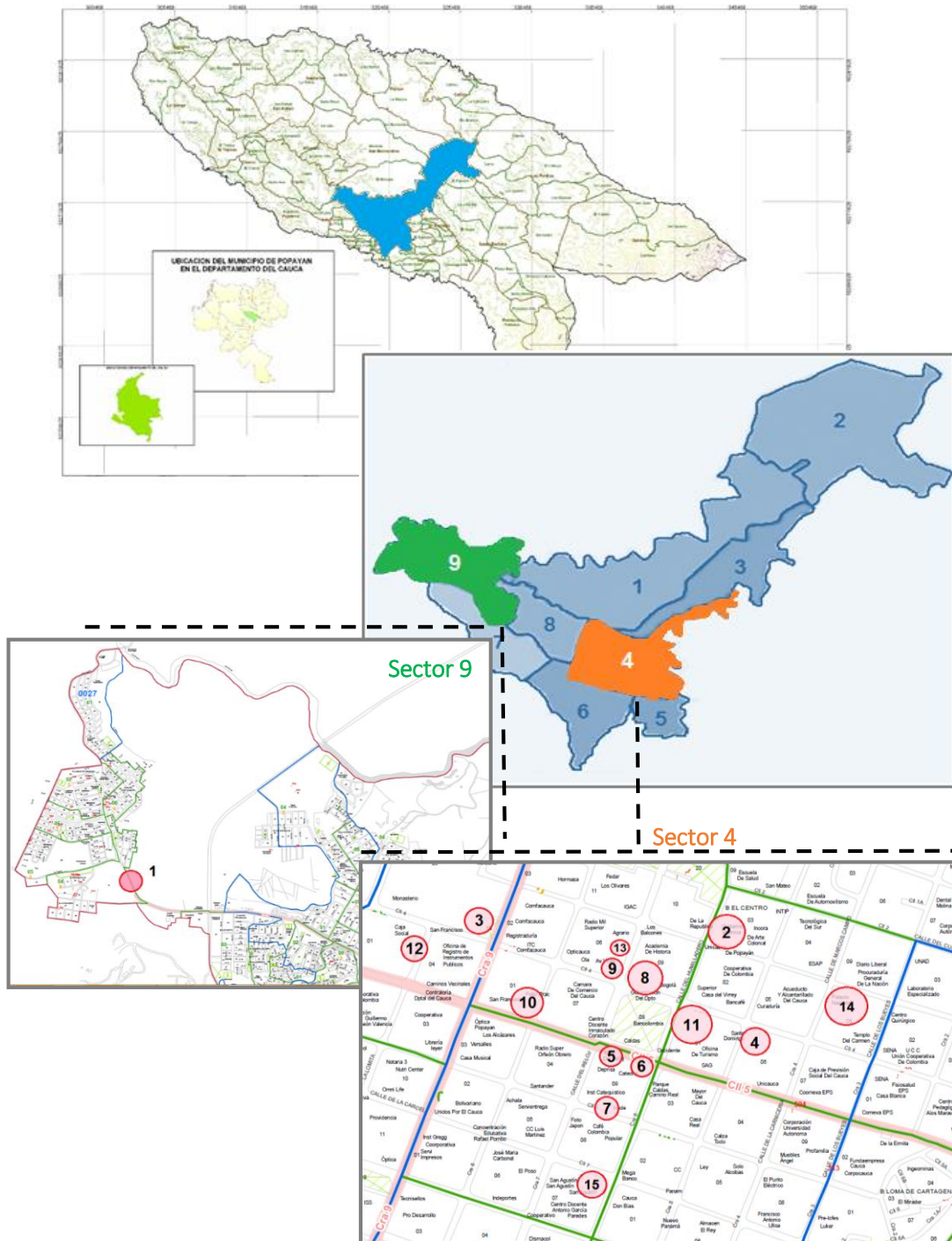
5.4 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Se tomaron diferentes puntos de referencia como techos, cúpulas, palomares, nidos, plazoletas, campanarios y parques, identificando una alta población de aves (*B. ibis* y *C. livia*), lo que aumenta la posibilidad de encontrar una alta acumulación de excretas. Antes de iniciar el muestreo se dividió el perímetro urbano en sectores (comunas), en donde se identificaron 9 sectores, los cuales se referenciaron en un mapa (Fig. 5); esto ayudo a identificar claramente los sitios que se debían escoger para el muestreo.

Posteriormente se examinó detalladamente por observación y seguimiento cada uno de los sectores en búsqueda de las especies *B. ibis* y *C. livia*. Además se pidió ayuda a los habitantes de cada uno de los sectores para que suministraran información sobre la localización de éstas aves; una vez terminada la búsqueda de las aves en todas las comunas, se determinó que solo dos comunas poseían una densidad alta de aves, las comunas 4 y 9. Una vez identificados los dos sectores, se escogió 15 sitios (Fig. 5); con el criterio de una alta densidad de aves por sitio (más de 40 especies); en estos sitios se recogieron 283 muestras de excretas de paloma común (*C. livia*) (Fig. 3) y 20 de garcita de ganado (*B. ibis*) (Fig. 4).

Por cada sitio de muestreo, se recolectaron de 20 a 23 muestras del sitio aleatoriamente; por cada muestra se tomaron 10 g de excretas y cada muestra se recolecto en bolsas plásticas de 20 x 30 con cierre tipo Ziploc®, que se rotularon y se transportaron al laboratorio de micología de la Facultad Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca para ser tratadas el mismo día. La toma de muestras se realizó en las horas de la mañana y luego fueron procesadas en horas de la tarde. En cada sitio de muestreo se tomaron factores ambientales como temperatura, presión atmosférica, humedad relativa y posición geográfica. Se recolectaron un total de 303 muestras en un periodo de 6 meses (Fig. 6 y 7).

Figura 5. Posición geográfica y perímetro urbano del municipio de Popayán.



Área de estudio. El perímetro está sectorizado por sus diferentes comunas, además se observan los puntos de muestreo. Imagen modificada del departamento de Planeación de la Alcaldía Mayor de Popayán.

Figura 6. Recolección de muestras



Fotografía donde se observa recolección de muestras con equipos de seguridad. Izquierda sitio 3, N 2° 26' 36.16", W 76° 36' 31.03"; derecha, sitio 6, N 2° 26' 28.57", W 76° 36' 22.73". Copywrite Cristian Anacona

5.5 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se pesaron 5 g de cada muestra recolectada en un frasco de vidrio al cual previamente se le agrego 25 ml de PBS estéril con un pH de 7.4; enseguida, la muestra se homogenizo, agitándola durante 30 minutos con un agitador; luego se dejó decantar durante 30 minutos y se filtró el contenido con ayuda de una gasa estéril a un tubo Falcón de 15 ml; al tubo Falcón con el filtrado se le adicionaron 50 μ l de una solución de antibióticos y se mezcló por inversión. Posteriormente se sembraron masivamente 100 μ l de cada filtrado en un medio de cultivo Agar

Guizotia abyssinica, y se incubaron a 28°C, observándolas diariamente durante 10 días (Fig. 7 y 8).

Figura 7. Tratamiento y empaquetamiento de muestras ambientales.

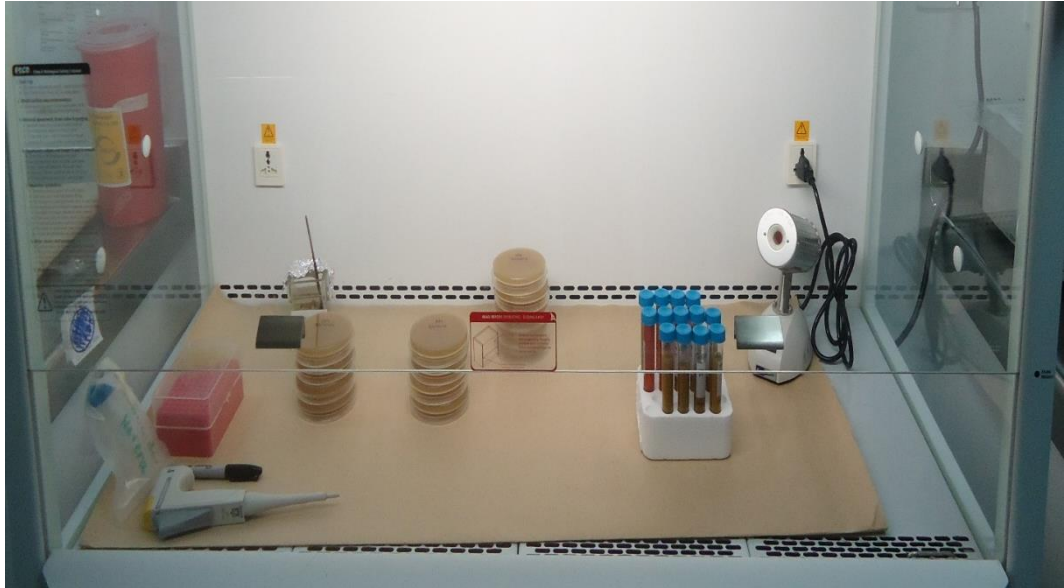


Fotografía donde se muestra el empaquetamiento de las muestras y el consecuente procesamiento de cada muestra en PBS. Copywrite Cristian Anacona.

5.6 IDENTIFICACIÓN DE *C. neoformans*

5.6.1 Identificación bioquímica de *C. neoformans* Las colonias mucosas que presentaron una coloración café (producción de melanina), se tomaron como posibles casos de *C. neoformans*, debido a la oxidación de los substratos fenólicos del medio de cultivo por la presencia de la enzima fenoloxidasa que posee el hongo (Fig. 10). Los cultivos negativos se dejaron en incubación prolongada hasta por 20 días, haciendo lecturas cada 72 horas. Todas las colonias con coloración café, se observaron bajo el microscopio con preparaciones de azul de lactofenol para confirmar que fueran levaduras (Fig. 11).

Figura 8. Siembra en agar *Guizotia abyssinica* en cabina de bioseguridad tipo II.



Fotografía donde se observan las muestras ya tratadas en tubos Falcón de 15 ml, los medios de Agar *Guizotia abyssinica*, y el material utilizado para el procedimiento de siembra. Copywrite Cristian Anacona.

También se tuvieron en cuenta otras colonias que estuvieron presentes y no presentaron coloración café, estas posteriormente se identificaron si eran levaduras. Consecutivamente, los cultivos que se identificaron como levaduras, se resembraron en agar Sabouraud para purificar la cepa, además este procedimiento permitió descartar posibles cepas de *Rhodotorula spp.* las cuales adquirieron un pimento color salmón o rosado, característica fenotípica de este microorganismo.

Luego a las cepas que presentaron coloración café o blanca en Agar *Guizotia abyssinica* y no adquirieron coloración rosada en Agar Sabouraud, se les realizó una serie de pruebas bioquímicas para la confirmación de *Cryptococcus*. A cada cepa se le realizó, una prueba de producción de ureasa, Inhibición en cicloheximida y determinación de nitratos; la productividad de ureasa es una característica fundamental para la identificación de *C. neoformans* (Fig. 12); la resiembra en Agar mycosel, que contiene cicloheximida, inhibe el crecimiento de *C. neoformans*; y la

determinación de nitratos permitió observar si se trataba de otro hongo diferente (Fig. 13).

Las cepas que resultaron positivas para productividad de ureasa, sin crecimiento en Agar mycosel, y negativas para nitratos, se les realizó una prueba complementaria en Agar Canavanina Glicina Azul de Bromotimol (CBG), determinando bioquímicamente y fenotípicamente si pertenecían a la especie *C. neoformans* o *C. gattii*, dado que este medio adquiere una coloración azul cuando está en presencia de *C. gattii*, ya que esta especie asimila los ácidos 1-malico, fumárico y succínico, producen un color verde sobre agar con L-cavanina-glicina-azul de bromotimol, y asimila la glicina como única fuente de carbono (Fig. 1). Por otro lado a las cepas que resultaron negativas para *C. neoformans*, se procedió a realizarles una prueba de tubo germinal para determinar la presencia de *Candida spp.* (Fig. 14).

Las cepas positivas bioquímicamente para *Cryptococcus*, se aislaron en agua glicerizada estéril, y se trasladaron al laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, Bogotá, para su confirmación molecular.

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

5.5.2.1 Extracción de ADN de alto peso molecular. Una de las características del hongo *Cryptococcus*, es el gran tamaño que posee su capsula (de 4 a 6 veces tu tamaño inicial), para lograr realizar una extracción de ADN de buena calidad, se debe efectuar un tratamiento especial para romper la capsula y las diferentes membranas internas; las cepas fueron sembradas con un día de anterioridad al procedimiento de extracción, en un medio de Extracto de Levadura Peptona Dextrosa (YEPD) ayudando a una disminución de tamaño de la capsula del hongo y así lograr una mejor obtención del ADN.

La extracción de ADN se realizó mediante la técnica de choque térmico (Modificado de (Meyer et al., 2003)); primero se resuspendieron las cepas en tubos eppendorf

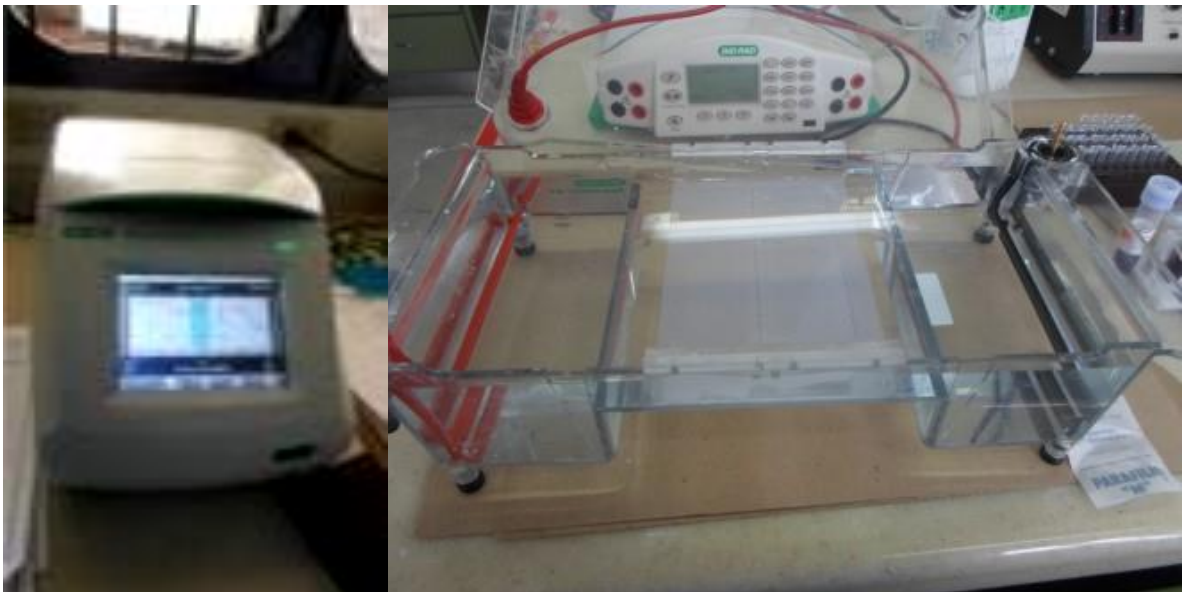
de 1,5 ml, se le adicionaron 500 μ L Buffer de Lisis (100 mg de ácido sulfónico triisopropylnapthalene, ácido para-aminosalicílico 600 mg, 10 ml de agua desionizada estéril, 2,5 ml de tampón de extracción (1 M Tris-HCl, 1,25 M NaCl, 0,25 M EDTA, pH 8,0)) para romper las diferentes membranas de la célula; luego se llevaron a una temperatura de -20°C por una hora. Pasado el tiempo, los tubos se agitaron durante 2 minutos en vortex y se llevaron a baño maría (60°C) durante 30 min. Posteriormente, se volvieron agitar las muestras durante 2 minutos en vortex y se llevaron de nuevo a baño maría durante otros 30 min. Una vez cumplido el tiempo se le agregó a cada tubo 500 μ L de una solución de FenolCloroformo-Isoamil y se homogenizó en vortex durante 2 min. Luego los tubos se llevaron a la centrifuga a 13500 rpm por 15 min a 4°C . Una vez terminada la centrifugación se removió el sobrenadante y se resuspendió a un tubo eppendorf de 1,5 mL. Consecutivamente, a cada tubo con el sobrenadante se le adicionó 500 μ L de Isopropanol a -20°C y se llevaron a -20°C durante una hora para precipitar el sobrenadante. En seguida, se centrifugaron los tubos a 13500 rpm a 4°C durante 15 min y luego se descartó el sobrenadante; seguido se agregó a cada tubo 500 μ L de Etanol al 70% y de nuevo se centrifugó a 13500 rpm a 4°C durante 15 min; el sobrenadante se descartó y se dejaron secar completamente los tubos en la cabina de bioseguridad. Posteriormente se le agregó 50 μ L de TE a cada tubo y se almacenaron a -20°C (Casali et al., 2003). La concentración de ADN se determinó espectrofotométricamente a 260/280 nm.

5.5.2.2 Amplificación del gen orotidin monofosfato pirofosforilasa (OMPasa) llamado también *URA5*. Para la determinación del patrón molecular de los aislamientos con la técnica de RFLP del gen *URA5* se realizó siguiendo el protocolo de laboratorio (Meyer et al., 2003). La PCR del gen *URA5* se realizó en un volumen final de 50 μ l. Cada reacción se preparó con 50 ng de DNA, 1X tampón de PCR (Invitrogen), 0,2 mM de DNTP'S (Invitrogen), 3 mM de acetato de magnesio, 1,5 U AmpliTaq DNA polimerasa (Invitrogen), y 50 ng de cada cebador, *URA5* (5'ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG 3') y SJ01 (5'TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC 3').

Luego la mezcla se llevó a Termociclador BioRad T100 en un programa de 35 ciclos a 2 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, luego 45 segundos de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de hibridación a 61°C, y 2 minutos de extensión a 72°C, seguido por un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C. (Fig. 9).

Los productos de amplificación fueron mezclados con un quinto volumen de buffer de carga (15% de Ficoll 400, 0,25% de naranja G, MilliQ agua), se tomaron 15 µl de productos de PCR que posteriormente restringirían en doble digestión con Sau96I (10 U/µl) y HhaI (20 U/µl) durante 3 horas, luego se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2.5% (teñido con Bromuro de etidio) a 100 V. Los patrones de RFLP se asignaron visualmente por comparación con los patrones obtenidos de las cepas estándar (VNI-VNIV y VGIV VGI) (Fig. 22) (Jackson et al. Sin publicar datos).

Figura 9. Equipo para la identificación molecular.



Fotografías donde se observa algunos de los equipos para la identificación molecular de *C. neoformans*. A la izquierda se observa el termociclador T100 Biorad y a la derecha el equipo de electroforesis con un gel de agarosa. Copywrite Cristian Anacona.

5.5.2.3 PCR huella digital del ADN con el iniciador (GTG)₅ La Identificación por PCR por huella digital para los diferentes aislamientos se realizó siguiendo el procedimiento de laboratorio (Meyer et al., 2003). La secuencia del iniciador (GTG)₅ se utilizó como único cebador en la PCR. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 50 µl que se preparó con 25 ng de DNA de alto peso molecular genómico, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl, 0,2 mM de DNTP'S (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Mannheim, Alemania), 3 mM de acetato de magnesio, 30 ng de cebador, y 2,5 U de polimerasa AmpliTaq DNA (Invitrogen). Luego las muestras fueron llevadas a 35 ciclos en un Termociclador BioRad T100 con 20 segundos de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de recocido a 50°C, y 20 segundos de extensión a 72°C, seguido por un ciclo de extensión final durante 6 min a 72°C. Los productos de amplificación se concentraron hasta 20 µl y se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,4% (teñido con bromuro de etidio) en 1X Tris-borato-EDTA (TBE) tampón a 60 V durante 1 hora, luego fueron visualizados con luz ultravioleta (Meyer et al., 1999). Los Tipos moleculares (VNI-VNIV y VGI VGIV) fueron asignados, de acuerdo con las bandas principales en los patrones. Todas las bandas que fueron visibles se incluyeron en el análisis, independientemente de su intensidad (Ellis et al., 2000; Meyer et al., 1999).

5.7 ANÁLISIS DE DATOS

Se realizó una base de datos de las variables evaluadas en el estudio en el paquete estadístico SPSS versión 15; en cada base de datos se registró los hallazgos que se realizaron durante el estudio.

En la base de datos de SPSS, se analizaron estadísticamente los resultados de los aislamientos, realizando gráficas y tablas de conglomeración, tendencias y proporciones tanto para los datos globales como para cada sitio teniendo en cuenta diferentes significancias como la de Chi cuadrado de Pearson.

Primero se analizó si los datos de aislamientos encontrados se ajustaban o no a la curva de normalidad; luego de esto se realizaron tablas de conglomeración, para observar cual eran los porcentajes de recuperación general y por cada sitio.

Luego de obtener estos porcentajes, se procedió a separar por categorías (Recuperación Alta, Media y Baja) para realizar análisis de tendencias en sitios e influencia de variables ambientales en la recuperación. Una vez elaborado esto, se aplicaron análisis con tablas Anova de un factor para determinar cuál fue la variabilidad y asociación que existe entre los diferentes factores ambientales versus la recuperación de *C. neoformans*. Los valores arrojados por la tabla Anova fueron confirmados con las pruebas de grupos equilibrados de HSD de Tukey y grupos desequilibrados de T3 de Dunnett, abarcando las posibles variabilidades y significancias que pudieran presentarse.

También se realizaron tablas de conglomeración con χ^2 , determinando no solo la frecuencia de los aislamientos de *C. neoformans*, sino la relación con de otras especies de levaduras encontradas.

6. RESULTADOS

6.1 IDENTIFICACIÓN DE SITIOS Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Los sitios escogidos para realizar los muestreos fueron 15 (Fig. 5, Tabla 2, Anexo G). El sitio 1 se caracterizó por tener solo especies de *B. ibis*, este presentó una alta humedad y el hábitat de esta especie se encontraba al aire libre mientras que los sitios del 2 al 15 se encontraron colonizados por la especie *C. livia*, especie que presentó, en su mayoría, hábitats cerrados y protegidos; estos sitios presentaron variabilidades en sus factores ambientales.

Tabla 2. Sitios de muestreo con sus coordenadas respectivas.

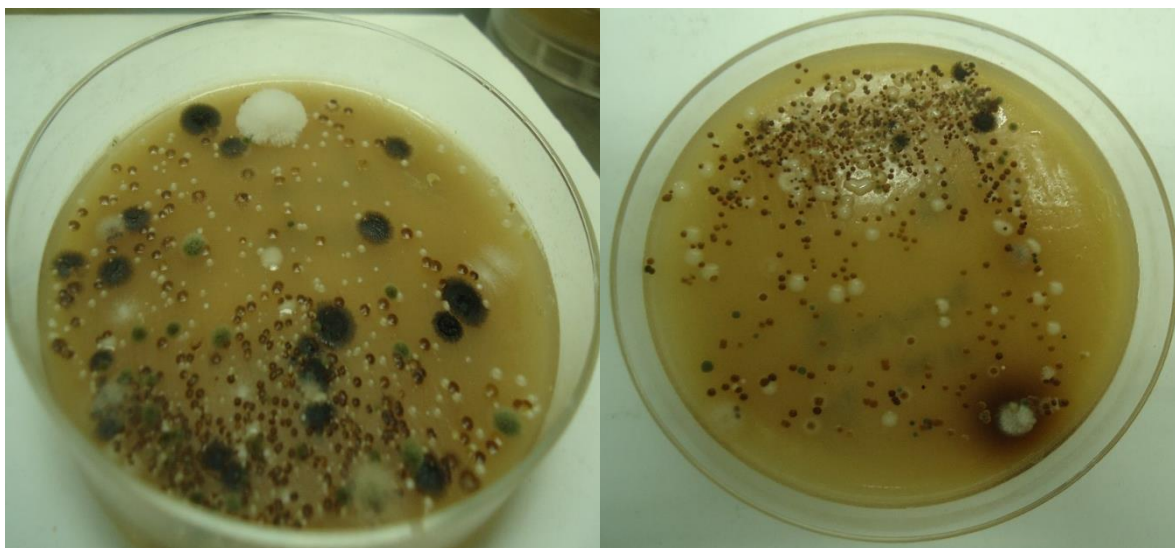
Sitio	Coordenadas
1	N 2° 27' 69.03", W 76° 38' 72.6"
	N 2° 27' 64.01", W 76° 38' 74.1"
2	N 2° 26' 36.97", W 76° 36' 18.06"
	N 2° 26' 38.02", W 76° 36' 15.21"
3	N 2° 26' 36.16", W 76° 36' 31.03"
4	N 2° 26' 29.99", W 76° 36' 16.57"
5	N 2° 26' 27.79", W 76° 36' 23.55"
6	N 2° 26' 28.57", W 76° 36' 22.73"
7	N 2° 26' 26.04", W 76° 36' 24.27"
8	N 2° 26' 33.37", W 76° 36' 22.50"
9	N 2° 26' 33.41", W 76° 36' 23.92"
10	N 2° 26' 31.89", W 76° 36' 28.10"
11	N 2° 26' 30.73", W 76° 36' 19.82"
12	N 2° 26' 34.76", W 76° 36' 31.89"
	N 2° 26' 34.02", W 76° 36' 30.23"
13	N 2° 26' 35.34", W 76° 36' 22.23"
14	N 2° 26' 31.79", W 76° 36' 12.07"
15	N 2° 26' 22.24", W 76° 36' 24.76"

Los sitios 1, 2 y 12 presentan dos fechas y coordenadas, dado que se realizaron más visitas por la baja cantidad de excretas encontradas en determinado sitio.

6.2 AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *C. neoformans*

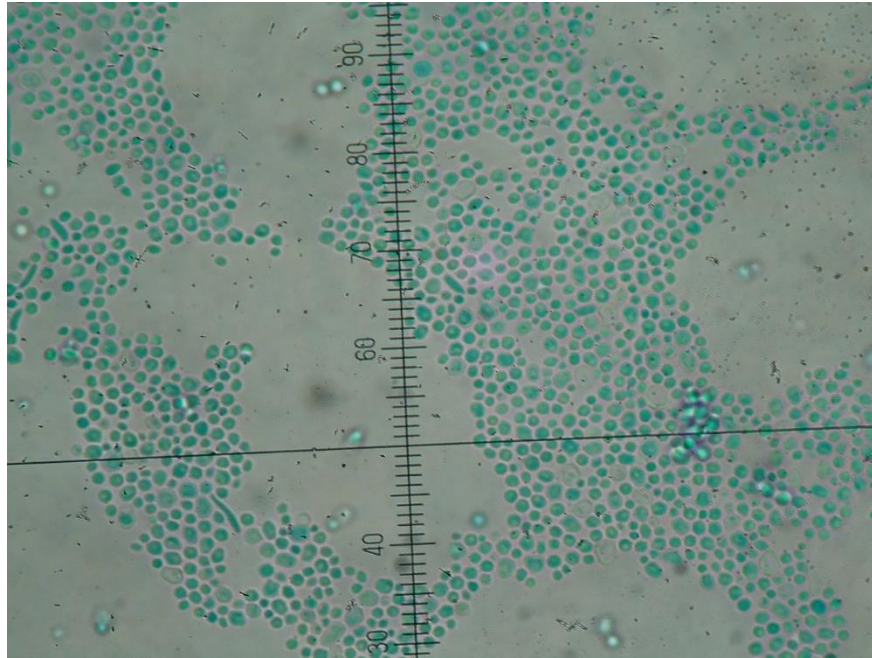
Para confirmar la presencia de *C. neoformans*, se seleccionaron las cepas que presentaron reacción ante en medio *Guizzotia abyssinica* (color café, producción de melanina) (Fig. 10) se les realizó observación bajo azul de lactofenol (levaduras) (Fig. 11), productividad de ureasa (positivo, viraje a color violeta-rosa) (Fig. 12), inhibición de crecimiento en cicloheximida (Fig. 13), determinación de nitratos (negativa) y CGB solo si las anteriores pruebas eran concluyentes (Fig. 1). Las colonias que presentaron cualquier resultado diferente al esperado se sembraron en agar Sabouraud, confirmando posibles casos de *Rhodotorula spp.* y una prueba de tubo germinal para determinar casos de *Candida spp* (Fig. 14).

Figura 10. Fotografías de cultivos en Agar *Guizzotia abyssinica*.



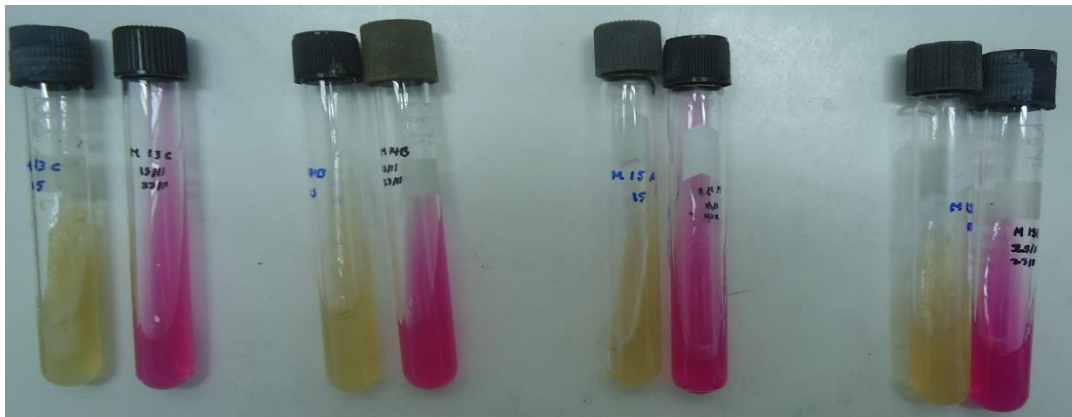
Cultivos de muestras del sitio 4, cepas con coloración café indican una reacción de *C. neoformans* a este medio (fenoloxidasasa positiva), cepas con coloración crema (posibles casos de *Candida spp.* o *Rhodotorula spp.*) y mohos ambientales.

Figura 11. Fotografía de montaje en azul de lactofenol de cepa No 157.



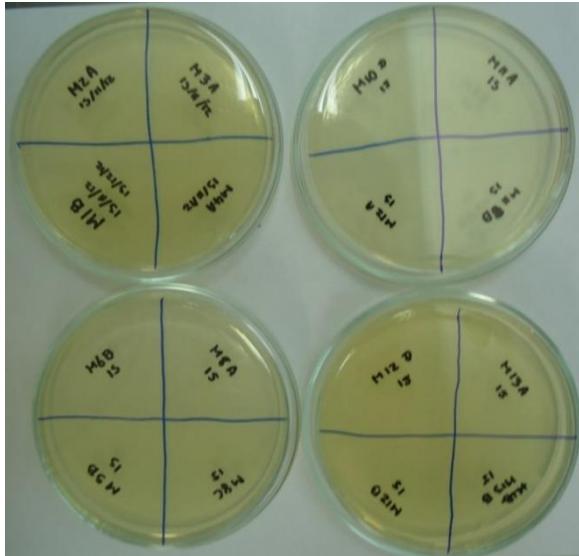
En un objetivo de 40X se observa el montaje de una cepa de coloración café, de la muestra 63 del sitio 4 donde se observan levaduras ovoides; esta cepa resulto positiva para *C. neoformans*. Copywrite Cristian Anacona.

Figura 12. Fotografía de pruebas de productividad de Ureasa.



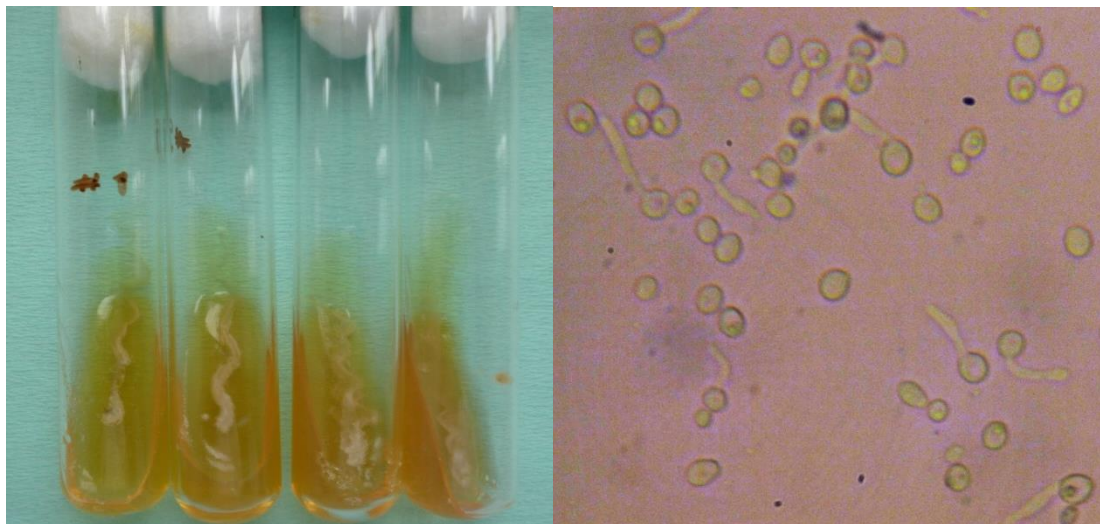
Pruebas de ureasa a cepas del sitio 13, con coloración café en Agar *Guizotia abyssinica*; si el medio vira a color rosado la prueba es positiva. Copywrite Cristian Anacona.

Figura 13. Fotografía de prueba de inhibición en cicloheximida.



En la prueba de medio con cicloheximida se observa si existe crecimiento de cepas de *C. neoformans* del sitio 13, ya que la cicloheximida inhibe el crecimiento de este hongo. Se observa que las cepas de *C. neoformans* analizadas no crecieron en este medio.

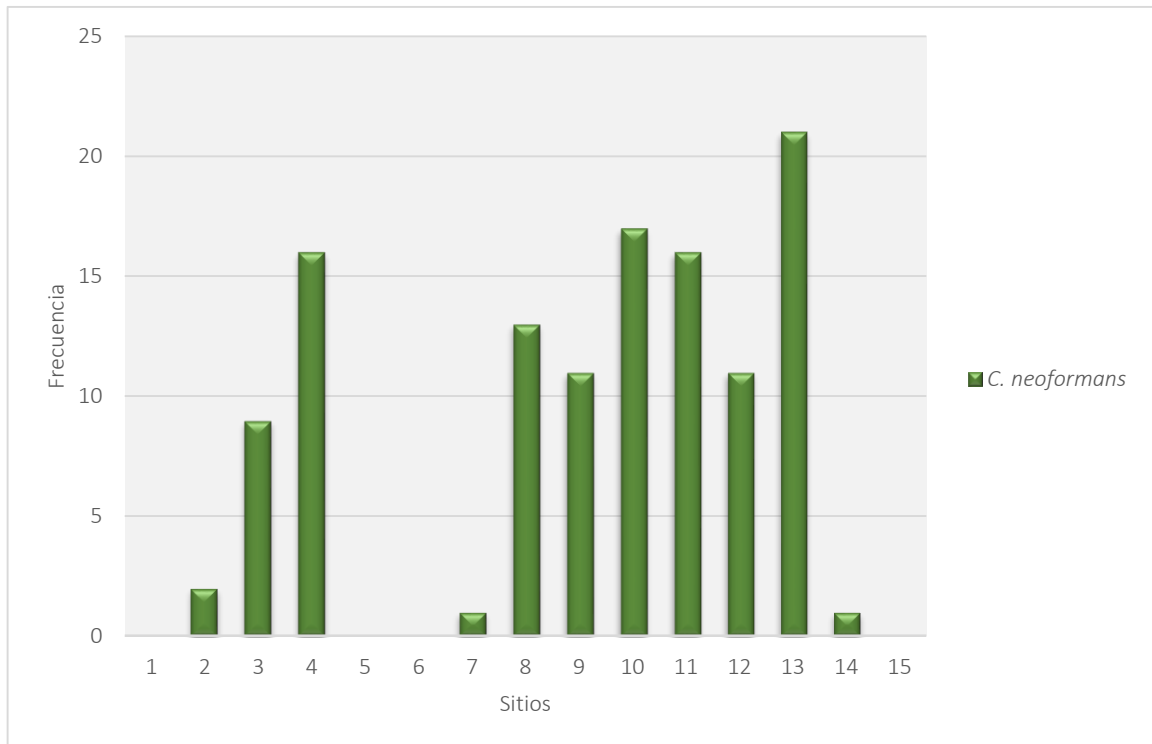
Figura 14. Pruebas de confirmación de *Candida spp.*



Izquierda prueba de ureasa negativa en cepas de *Candida spp.*; a la derecha prueba de tubo germinal positiva. Copywrite Fabiola González.

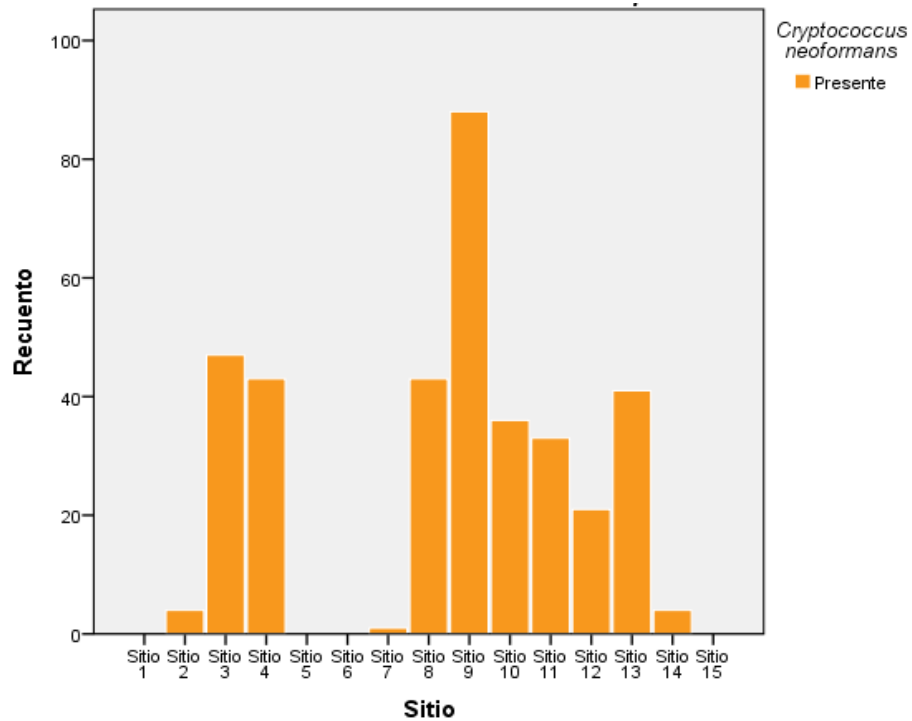
Los resultados indicaron que *C. neoformans* estuvo presente en 118 (38.94 %) de 303 Muestras (Fig. 15), de las muestras que resultaron positivas se recuperaron 361 (49,0%) cepas de *C. neoformans* de 737 cepas analizadas (Fig. 16). Los sitios con una mayor frecuencia de *C. neoformans* son el 4, 8, 19, 11 y 13 al contrario de los sitios 1, 5, 6, 7, 14 y 15 en donde fue escasa o nula la presencia de éste hongo.

Figura 15. Frecuencia de muestras positivas para *C. neoformans* por sitio.



Los sitios 1, 5, 6 y 15 no presentaron muestras con crecimiento de *C. neoformans*.

Figura 16. Frecuencia de aislamientos totales de *C. neoformans* para cada uno de los sitios.



En la figura 15, se logra observar la frecuencia de aislamientos encontrados en cada uno de los sitios; los sitios con mayor frecuencia de recuperación fueron el 3, 4, 8, 9, 10, 11 y 13; el sitio de recuperación media fue el 12 y los sitios 1, 2, 5, 6, 7, 14 y 15 fueron los de más baja recuperación. En la Tabla 3 se logra observar la conglomeración de los porcentajes de *C. neoformans* encontrados en cada sitio.

Tabla 3. Porcentajes y recuentos de aislamientos de *C. neoformans*.

			Cryptococcus neoformans		Total
			Ausente	Presente	
Sitio	Sitio 1	Recuento	46	0	46
		% dentro de Sitio	100,0%	0,0%	100,0%
	Sitio 2	Recuento	43	4	47
		% dentro de Sitio	91,5%	8,5%	100,0%
	Sitio 3	Recuento	41	47	88
		% dentro de Sitio	46,6%	53,4%	100,0%
	Sitio 4	Recuento	34	43	77
		% dentro de Sitio	44,2%	55,8%	100,0%
	Sitio 5	Recuento	27	0	27
		% dentro de Sitio	100,0%	0,0%	100,0%
	Sitio 6	Recuento	24	0	24
		% dentro de Sitio	100,0%	0,0%	100,0%
	Sitio 7	Recuento	24	1	25
		% dentro de Sitio	96,0%	4,0%	100,0%
	Sitio 8	Recuento	22	43	65
		% dentro de Sitio	33,8%	66,2%	100,0%
	Sitio 9	Recuento	13	88	101
		% dentro de Sitio	12,9%	87,1%	100,0%
	Sitio 10	Recuento	17	36	53
		% dentro de Sitio	32,1%	67,9%	100,0%
	Sitio 11	Recuento	13	33	46
		% dentro de Sitio	28,3%	71,7%	100,0%
	Sitio 12	Recuento	24	21	45
		% dentro de Sitio	53,3%	46,7%	100,0%
	Sitio 13	Recuento	9	41	50
		% dentro de Sitio	18,0%	82,0%	100,0%
	Sitio 14	Recuento	19	4	23
		% dentro de Sitio	82,6%	17,4%	100,0%
	Sitio 15	Recuento	20	0	20
		% dentro de Sitio	100,0%	0,0%	100,0%
Total		Recuento	376	361	737
		% dentro de Sitio	51,0%	49,0%	100,0%

Tabla de contingencia donde se observa el recuento de recuperación de *C. neoformans* en cada sitio y Porcentaje total de aislamientos en todos los sitios.

En la tabla 3 se observa que el 49% de aislamientos analizados resultaron positivos para *C. neoformans* frente a un 51% de cepas que correspondían a otras levaduras, como *Candida spp.* o *Rhodotorula spp.* Los sitios con mayor aislamiento de cepas fueron el 3, 4, 8, 9 y 13 al contrario del 1, 5, 6 y 15 donde no se recuperaron cepas de *C. neoformans*.

En la figura 17 se observa el rango temperatura en el cual se recuperó *C. neoformans*, vario de 19.8°C a 27.4°C, con un índice alto de recuperación a 22.5°C y 23.2°C mientras que a temperaturas de 24.1°C y 25.1°C no presento crecimiento; la variable humedad, presento un rango de recuperación que fluctuó de 36% a 76.4%, con un índice alto de recuperación a 60.8% (Fig. 18), con algunas variaciones en los valores de 37.5% y 38.3% que no presentaron crecimiento de *C. neoformans*; por otro lado, la altitud (Fig. 19) vario de 1745 a 1757 msnm, en donde su pico más alto de aislamiento fue a 1752 msnm, mientras que las altitudes más bajas de recuperación fueron a 1745, 1749 y 1753 msnm.

Figura 17. Recuento de aislamientos de *C. neoformans* versus temperatura.

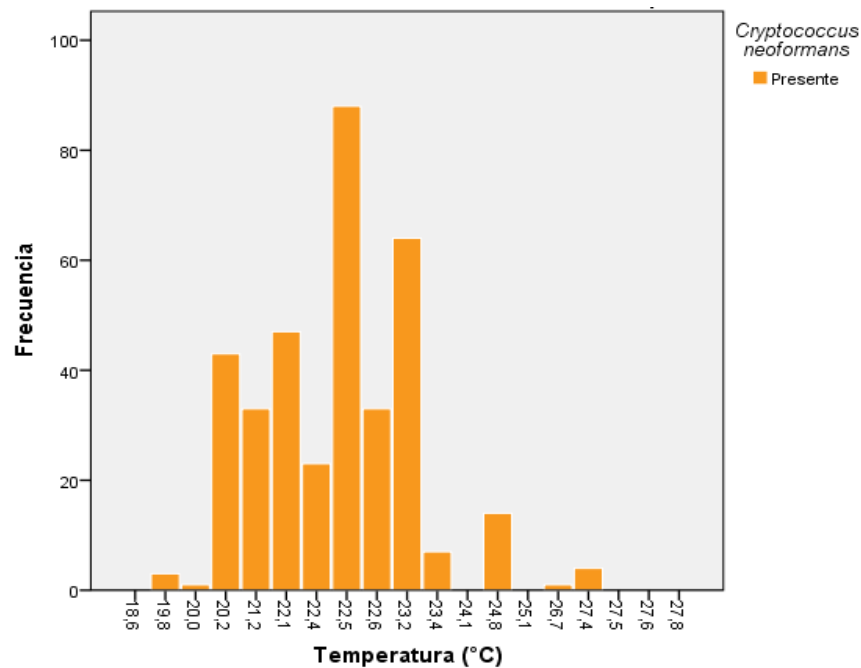


Figura 18. Recuento de aislamientos de *C. neoformans* versus porcentaje de humedad relativa.

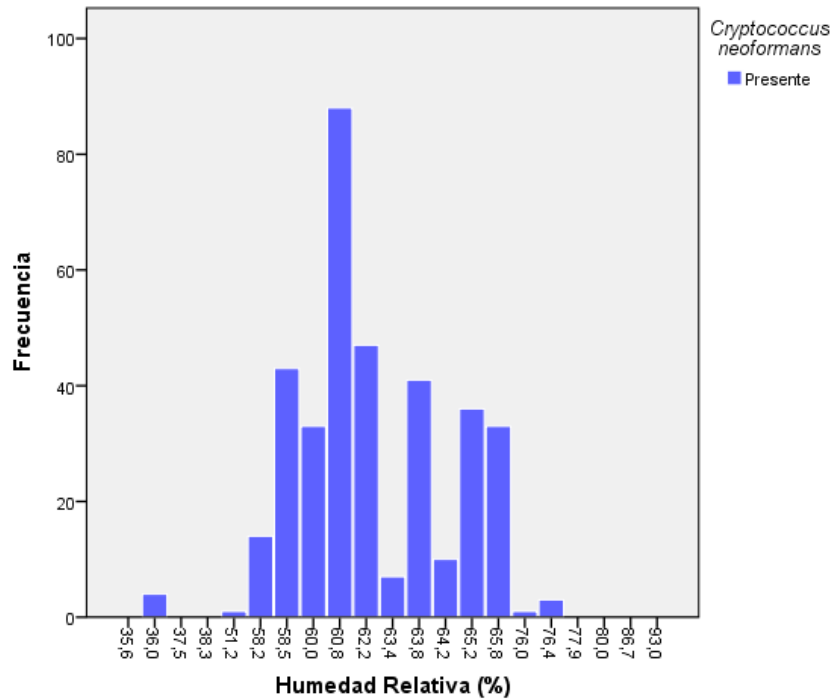
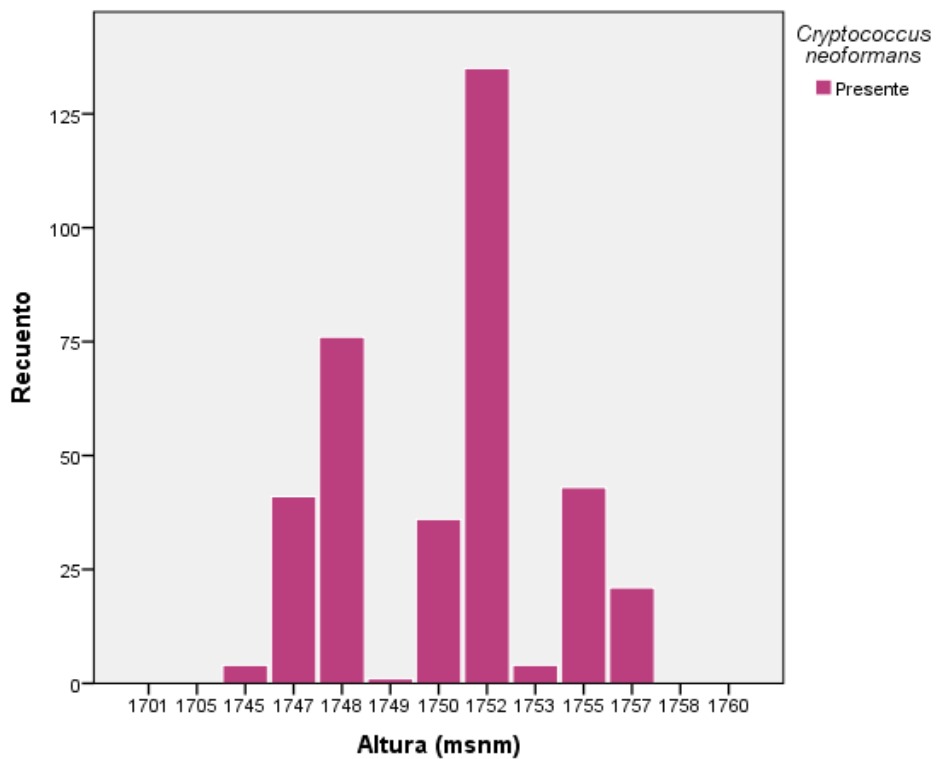


Figura 19. Recuento de aislamientos de *C. neoformans* versus altitud.



Para determinar la incidencia de las variables ambientales en la recuperación de *C. neoformans*, se realizó una tabla de conglomeración con porcentajes de aislamientos, con la cual logramos crear tres categorías de frecuencias de aislamiento: Alta (>21, Naranja), Media (5-20, Verde), Baja (<5, Azul) (Anexo A). Se realizó una prueba de Anova de un factor, comparando las diferentes frecuencias versus las variables ambientales. En este análisis se logró observar la influencia de las variables Temperatura, Humedad relativa y Altitud, sobre la recuperación de *C. neoformans* (Anexo B).

Por medio del análisis de HSD de Tukey y T3 de Dunnett observamos que existe una influencia de las variables ambientales en la recuperación de *C. neoformans*; la temperatura presento una similitud entre categorías Baja y Media ($P = 0,968$) y a su vez, estas categorías discreparon de la categoría alta ($p = 0,00$), observando que existe una influencia más alta de la temperatura en la categoría alta. Este resultado lo confirma el análisis de homogeneidad de subconjuntos donde se observa una agrupación entre las categorías Baja-Media diferenciándose de Alta (Anexo B y C).

El análisis de la humedad relativa, se observa como las categorías tienen una diferencia significativa entre ellas, Alta-Media ($P = 0,658$), Alta-Baja ($P = 0,012$) y Media-Baja ($P = 0,811$), revelando que la humedad es un factor influyente en todas las categorías. En el análisis de la homogeneidad de subconjuntos, observamos que las medias de las categorías son similares, formando un solo subconjunto, confirmando el anterior análisis (Anexo B y D).

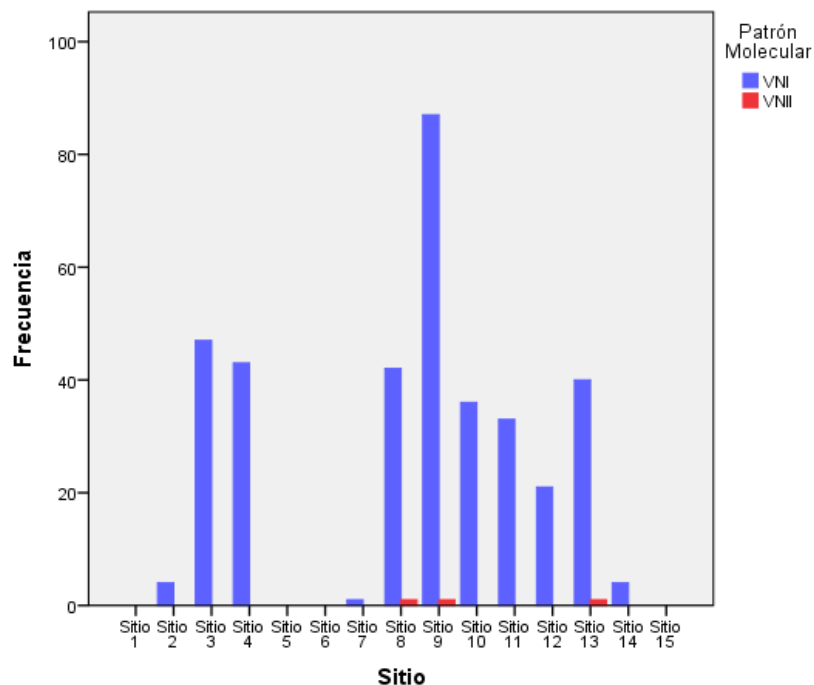
El análisis de la variable altitud, mostro que existe una diferencia muy baja entre las categorías Alta-Media ($P = 0,001$) y la categoría Baja ($P = 0,00$). El análisis de T3 de Dunnet reporto que las categorías no tienen similaridad, observándose una significancia de $P = 0,00$ entre todas las categorías, demostrando que la altitud no es un factor influyente. En la homogeneidad de subconjuntos, se reportan tres subconjuntos considerando que las tres variables no tienen medias similares apoyando el análisis anterior (Anexo B y E).

Estas pruebas estadísticas demuestran que las variables temperatura y humedad tienen una influencia más marcada en los aislamientos de *C. neoformans*, observándose que la temperatura es más influyente en la categoría alta ($P = 0,00$, categoría separada en un solo subconjunto) y que la humedad es influyente en todas las categorías (categorías agrupadas en un solo subconjunto). Por otro lado la altitud no presenta una influencia estadísticamente significativa en los aislados, observándose una diferencia entre todas las categorías.

6.3 CARACTERIZACION MOLECULAR DE *C. neoformans*

Una vez analizadas las cepas bioquímicamente, se tomaron en cuenta las cepas que resultaran positivas para *C. neoformans* a las cuales se les realizó análisis moleculares por PCR del gen $(GTG)_5$ (Fig. 21) y RFLP del gen URA5 (Fig. 22, 23 y 24), identificando a 358 (99,2 %) cepas como *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, VNI y 3 (0,8 %) VNII (Tabla 4) (Fig. 20). La frecuencia del patrón molecular VNII se observa en los sitios 8, 9 y 13 (Tabla 4; Fig. 20; Anexo G).

Figura 20. Frecuencia del Patrón Molecular en cada uno de los sitios muestreados



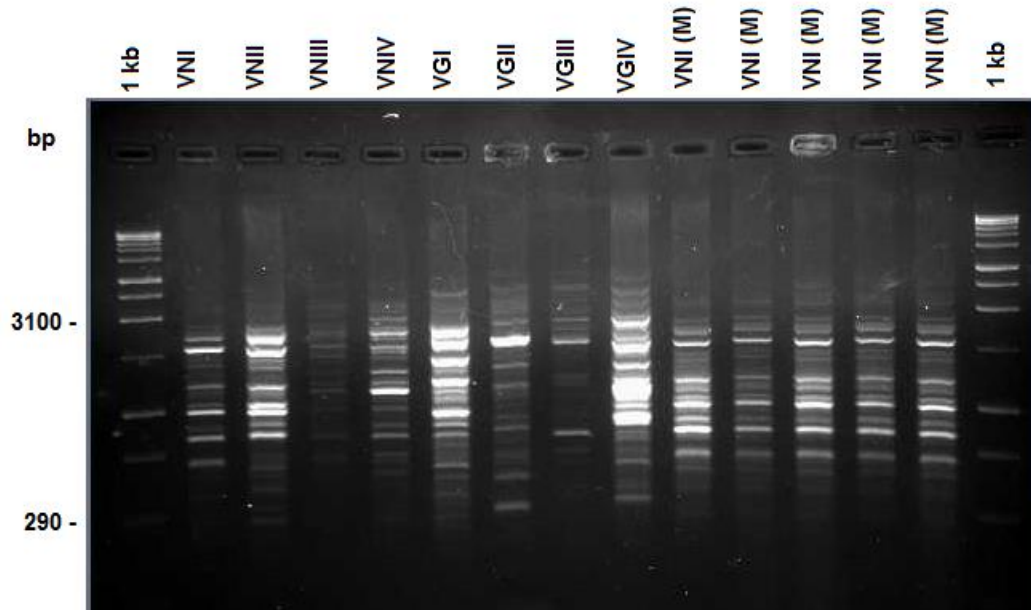
Se observan los patrones moleculares VNI y VNII. En los sitios 1, 5, 6 y 15 no se recuperaron cepas de *C. neoformans*.

Tabla 4. Tabla de contingencia de Patrón Molecular con los porcentajes para cada sitio.

		Patrón Molecular		Total	
		VNI	VNII		
Sitio	Sitio 1	Recuento	0	0	0
		% dentro de Sitio	0,0%	0,0%	100,0%
	Sitio 2	Recuento	4	0	4
		% dentro de Sitio	100%	0,0%	100%
	Sitio 3	Recuento	47	0	47
		% dentro de Sitio	100,0%	0,0%	100,0%
	Sitio 4	Recuento	43	0	43
		% dentro de Sitio	100,0%	0,0%	100,0%
	Sitio 5	Recuento	0	0	0
		% dentro de Sitio	0,0%	0,0%	100,0%
	Sitio 6	Recuento	0	0	0
		% dentro de Sitio	0,0%	0,0%	100,0%
	Sitio 7	Recuento	1	0	1
		% dentro de Sitio	100,0%	0,0%	100,0%
	Sitio 8	Recuento	42	1	43
		% dentro de Sitio	97,7%	2,3%	100,0%
	Sitio 9	Recuento	87	1	88
		% dentro de Sitio	98,9%	1,1%	100,0%
	Sitio 10	Recuento	36	0	36
		% dentro de Sitio	100,0%	0,0%	100,0%
	Sitio 11	Recuento	33	0	33
		% dentro de Sitio	100,0%	0,0%	100,0%
	Sitio 12	Recuento	21	0	21
		% dentro de Sitio	100,0%	0,0%	100,0%
	Sitio 13	Recuento	40	1	41
		% dentro de Sitio	97,6%	2,4%	100,0%
	Sitio 14	Recuento	4	0	4
		% dentro de Sitio	17,4%	0,0%	100,0%
	Sitio 15	Recuento	0	0	0
		% dentro de Sitio	0,0%	0,0%	100,0%
Total	Recuento	358	3	361	
	% dentro de Sitio	99,2%	0,8%	100,0%	

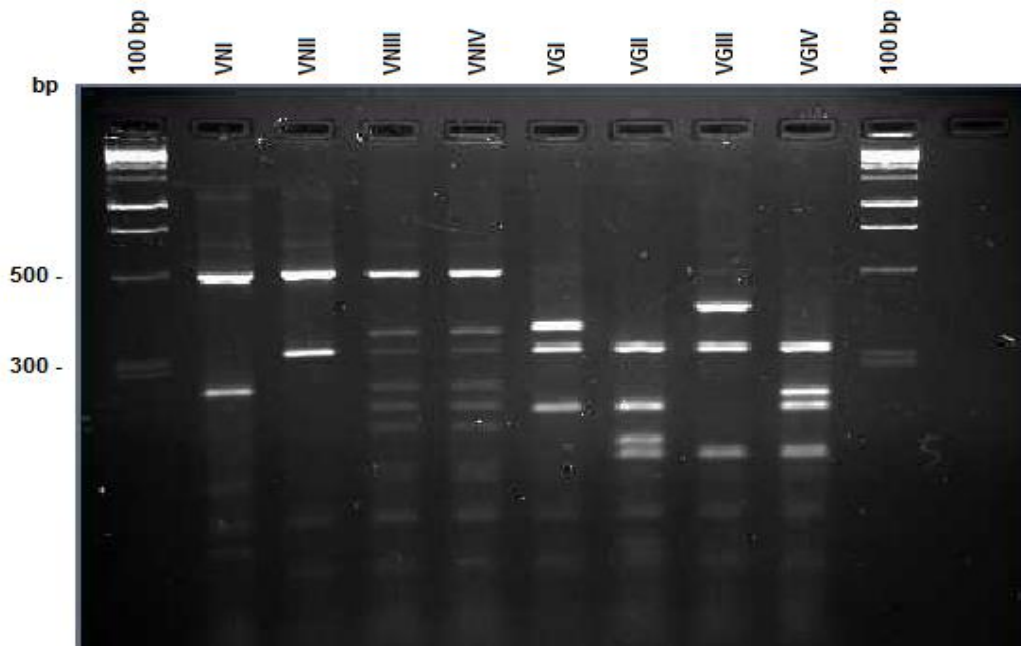
Porcentaje de cada patrón molecular en cada uno de los sitios y sus porcentajes de recuperación en cada uno y total.

Figura 21. Fotografía del gel de la ampliación del iniciador (GTG)₅ por PCR.



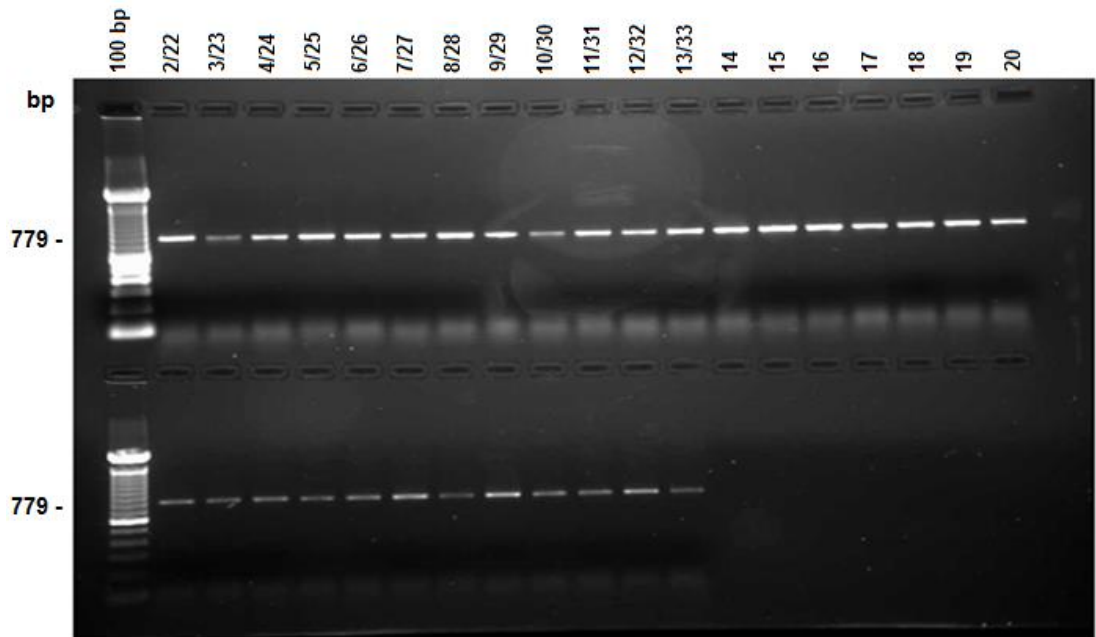
Carril 1 y 15 Marcador de peso molecular 1 kb; carril 2 al 9 cepas control (2; VNI, 3; VNII, 4; VNIII, 5; VNIV, 6; VGI, 7; VGII, 8; VGIII, 9; VGIV); Carril 10 al 14 cepas correspondientes al patrón molecular VNI.

Figura 22. Fotografía del gel con controles para RLFP con el gen URA5.



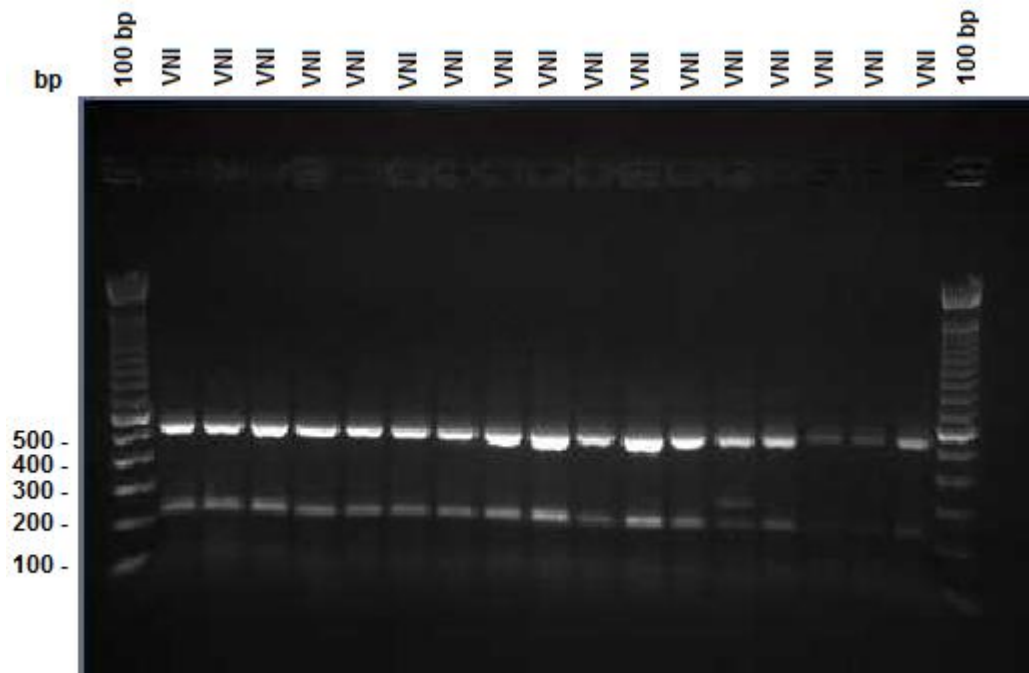
Carril 1 y 10 Marcador de peso molecular 100 bp; carril 2 al 9 cepas control (2; VNI, 3; VNII, 4; VNIII, 5; VNIV, 6; VGI, 7; VGII, 8; VGIII, 9; VGIV).

Figura 23. Fotografía del gel de PCR del gen URA5 (amplificación del gen).



Carril 1 y 21, marcador de peso molecular 100 bp; carril 2-20, 22-33 cepas confirmando presencia de *C. neoformans* con peso a 779 pb.

Figura 24. Fotografía del gel de restricción del gen URA5.

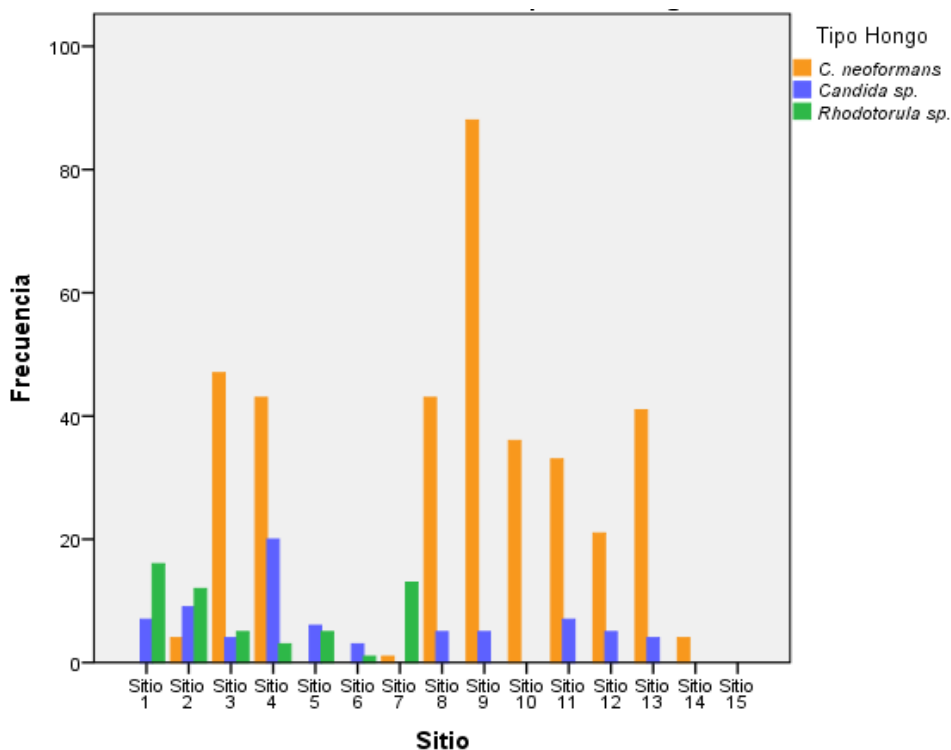


Carril 1 y 18 Marcador de peso molecular 100 bp; carril 2 al 17 cepas correspondientes a el patrón molecular VNI.

6.4 CARACTERIZACIÓN DE OTRAS LEVADURAS

En torno a la recuperación de *C. neoformans* también se lograron identificar otras especies de levaduras que se analizaron para determinar la coexistencia con éste hongo. Dentro de esta identificación con coloración rosada para *R. rubra* en agar sabouraud y presencia *Candida spp* con confirmación por la prueba de tubo germinal positiva. (Fig. 14) se lograron aislar 75 (10,17 %) y 55 (7,46 %) levaduras de *Candida spp.* y *Rhodotorula spp.* respectivamente. En el sitio 15 no hubo crecimiento de levaduras pero si de algunos mohos ambientales (Fig. 25; Anexo F).

Figura 25. Frecuencia de Hongos por cada sitio.



Las cepas identificadas bioquímicamente como *C. neoformans*, se les realizó pruebas en Agar Canavanina Glicina azul de Bromotimol (CBG) determinando posibles casos de *C. gattii*; todas las cepas sospechosas resultaron ser negativas.

7. DISCUSIÓN

Esta es la primera investigación epidemiológica a nivel descriptivo y molecular sobre la presencia de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* que se realiza en excretas de *C. livia*, en el perímetro urbano de la ciudad de Popayán, Cauca, con la cual se aporta al desarrollo del conocimiento sobre la epidemiología de éste hongo.

C. neoformans es un hongo de distribución mundial, el cual por medio de diferentes estudios desarrollados en países como Estados Unidos, España, Brasil, detectaron características epidemiológicas, una de ellas fue encontrar que *C. neoformans* no solamente se encontraba en frutas y algunos animales (Franzot et al., 1999), sino que también se detectó en personas con lesiones pseudosarcomatosas, tumores mixomatosos, lesiones tumorales en pulmones, bazo y riñones que fallecían con enfermedades sistémicas (Deacon, 1998; James A, 2010; Vázquez Tsuji et al., 2005). Se encontraron evidencias de que su nicho principal son las excretas de aves, principalmente de palomas, en donde se encuentra un hábitat desecado, alcalino, rico en sales, nitrógeno, creatina, xantina, urea y ácido úrico; diferentes nutrientes para el crecimiento y reproducción de éste hongo, como lo pudimos observar en este estudio, el cual presento una alta recuperación del hongo *C. neoformans* en excretas de estas aves. Además, éste nicho es un hábitat para que otras especies de hongos y bacterias puedan crecer y competir por los nutrientes. (Emmons, 1951; Levine et al., 1957).

Como podemos observar en los resultados, *C. neoformans* se ha recuperado de 11 (73,3%) de 15 sitios, 118 (38.94 %) de 303 muestras (Fig. 15), de las cuales se recuperaron 361 cepas (49,0 %), (Fig. 16; Tabla 2 y 3), demostrando la existencia de este hongo en la ciudad de Popayán, resultado que concuerda con proporciones encontradas en diferentes estudios epidemiológicos; a nivel mundial, los primeros estudios demostraron que se recupero un 69,2% de muestras positivas tanto de detritos de arboles como de excretas de aves; en otro estudio aislaron el 27,32% de muestras positivas en Estados Unidos (Emmons, 1960; McDonough et al., 1966);

así mismo en 1994, New York, investigadores recuperaron el 100% de muestras positivas en Nueva York (Casadevall et al., 1994); otros resultados, con porcentajes similares se hallaron en Nagasaki, Japón, donde encontraron un 62,06% (Yamamoto et al., 1995); en Nepal, recuperaron el 25% de muestras positivas (Pal, 1997); en Irán, encontraron un 17,8% de positividad (Khosravi, 1997); En Thuringia, Alemania, hallaron un 74,5% de muestras positivas para *C. neoformans* (uno de los más altos) (Kielstein et al., 2000); en Chiang Mai, Tailandia, recuperaron en el 100% de las muestras analizadas *C. neoformans* (Sriburee et al., 2004) y en Corea, encontraron un 23,6% de muestras positivas (Chee and Lee, 2005);

En cuanto a recuperación de *C. neoformans* a nivel regional y nacional se encuentran diversos estudios con porcentajes cercanos al encontrado en éste trabajo, por ejemplo en Chile, recuperaron un 26% de muestras positivas (Arredondo González, 2006); en Brasil, en el 2005, hallaron un 25,53% y en el 2008 un 20,3% de positividad (Kobayashil et al., 2005; Lugarini et al., 2008); en Salvador, encontraron un 39,5% (Ayala Chavarría et al., 2011) y en Cundinamarca, Colombia, recuperaron un 21% (Quintero et al., 2005).

Hay que resaltar que en la ciudad de Popayán se han registrado pacientes con criptococosis (25 casos reportados desde 2003 a 2014) (Instituto Nacional De Salud, 2012; Secretaria De Salud Del Cauca, 2014),. Hasta ahora no se han llevado a cabo estudios pertinentes para determinar cuál fue el foco de contaminación dado que la micosis por *Cryptococcus* es de vigilancia pasiva mas no obligatoria (Escandón et al., 2012). Resultados que indican posibles focos de contaminación para pacientes con alteraciones en su sistema inmune.

Se puede observar que *C. neoformans* se encontró en una mayor frecuencia en los sitios 3, 4, 8, 9, y 13, esto puede ser debido a alta concentración de excretas en estos, dado que las palomas localizaban sus nidos en estos puntos, y esta especie no retira sus excretas en cada anidada, lo que ayuda a que se formen pilas de sustrato, aumentando la densidad de microorganismos (Tabla 2 y Fig. 16), además

un factor influyente es la radiación absorbida por estas excretas, la cual fue mínima, ya que se encontraban en sitios cubiertos o por un techo o dentro de un campanario, hábitats oscuros y húmedos que ayudan a un mejor desarrollo, aunque estos crecen donde tengan una buena cantidad de materia orgánica (Brooks et al., 2005), al contrario de sitios como el 1, 2, 5, 6, 7, 14 y 15 donde las excretas estuvieron expuestas al sol la mayoría del tiempo, lo cual pudo desencadenar la inhibición del crecimiento del hongo *C. neoformans* y su baja densidad (Tabla 2 y Fig. 15), como lo describen en estudios (Quintero et al., 2005), anotando que la exposición de pocas horas de brillo solar a las muestras, permiten el crecimiento de *C. neoformans*; otros estudios (Bejarano et al., 1996; Negroni, 2012) respaldan que los rayos ultravioleta del sol inhiben el crecimiento de la levadura; aunque por otras investigaciones indican que la melanina presente en este hongo le permite sobrevivir a la radiación solar y que puede llegar a utilizar esta radiación como energía metabólica (Ledford, 2007).

En los otros sitios como 10, 11 y 12 las excretas no estuvieron completamente expuestas a la luz directa del sol, pero no estuvieron acumuladas en gran proporción como en los sitios de mayor frecuencia obteniéndose densidades de aislamiento medias en comparación con sitios como el 9, esto pudo ser debido a combinación de los factores ambientales que hay entre los sitios.

Otros factores de incidencia sobre la recuperación de este hongo es la concentración de nutrientes en algunos sitios y excretas de aves; en el sitio 1, se analizaron excretas de garcita de ganado (*B. ibis*) (Fig. 4), estas excretas varían sus concentraciones de nutrientes, inhibiendo el crecimiento de del hongo *C. neoformans* (Nielsen et al., 2007), y las condiciones del tubo digestivo de esta especie influye en la presencia del hongo (Rosario et al., 2008). Además de la posible mezcla de las excretas de *B. ibis* con las heces de otras especies que habitan este nicho, podrían haber alterado las concentraciones de nutrientes, como por ejemplo gallinazos (Orden Accipitriformes), y algunas especies de mamíferos de los órdenes Chiroptera y Rodentia.

Entre las cepas aisladas de *C. neoformans* se logró observar rangos de aislamiento altos, como en la variable temperatura, que dentro un rango de 19,8 a 27,4°C, tuvo una mayor recuperación a 22,5°C (Fig. 17), teniendo en cuenta que en los meses de muestreo se presentaron comportamientos atípicos del clima de la ciudad, donde las temperaturas promedio diarias eran superiores a la temperatura promedio normal (19°C). En la variable humedad relativa, se observó un rango entre 36,0% y 76,4% (Fig. 18), pero con porcentajes que fluctuaron en la recuperación del hongo, debido a que hubo sitios donde la humedad fue de 63,4% pero su temperatura fue más alta del pico ideal o el sitio de muestreo no presentó abundante excretas, afectando la recuperación del hongo. El rango de humedad donde se presentó una alta proporción del hongo *C. neoformans* varió entre 58,5%, 60,8%, 62,2%, y 63,8%; En la variable altitud observamos como el rango de recuperación fue de 1745 a 1757 msnm con un pico alto de recuperación a 1752 msnm (Fig. 19).

Al analizar las variables ambientales contrastadas con la recuperación de *C. neoformans* por medio de pruebas de Anova, HSD de Tukey y T3 de Dunnett (Anexo B), que existe una influencia de la temperatura y humedad en los aislamientos, observándose que al categorizar las cepas recuperadas había una diferencia significativa entre la alta y baja recuperación (Anexo A), lo que nos indica que determinadas temperaturas y humedades son necesarias para establecerse en hábitat (esto se confirmó mediante pruebas de subconjuntos homogéneos) (Anexos C, D y E). Contrastando estos resultados con los rangos de recuperación de temperatura y humedad, observamos que los rangos óptimos para el crecimiento de *C. neoformans* son, temperaturas que varíen de 19,8°C a 27,4°C y humedades relativas de 36% a 76,4% (Fig. 17 y 18).

Estos análisis estadísticos demuestran como las variables ambientales juegan un papel determinante en el hábitat de *C. neoformans*, como lo demuestran diversos estudios realizados alrededor del mundo como en Alicante, España (Colom Valiente et al., 1997) Bolívar, Venezuela (Cermeño et al., 2006) y Cundinamarca, Colombia (Quintero et al., 2005); estos estudios indican que variables como temperatura,

humedad y altitud fueron determinantes en el crecimiento, reproducción y posterior diseminación de este hongo.

Por otra parte, la variable ambiental altitud, tiene una gran importancia en el nicho fundamental de *C. neoformans*, ya que esta influye en la temperatura media, disminuyendo 0.65°C cada 100 metros de altitud en zonas templadas. Un ejemplo claro de esta influencia es el estudio realizado por Castañeda en Cundinamarca (Quintero et al., 2005), donde se observa como a diferentes zonas altitudinales el hongo tuvo una frecuencia diferente, ya que varío su temperatura, radiación y humedad relativa; en este estudio se observó que a mayor altitud, era menor el crecimiento de *C. neoformans* en contraste con los pisos térmicos a altitudes más bajas. Cabe resaltar que este estudio, el piso térmico templado o bosque húmedo premontano (bh-PM) es el mismo todos los muestreos, por lo que no varía mucho en los registros altitudinales obtenidos, pero si varía su temperatura y humedad, por las condiciones ambientales y estructurales de cada sitio (Fig. 19).

Estudios realizados en diferentes países como Brasil (Ribeiro and Ngamskulrungraj, 2008), Estados Unidos (Nielsen et al., 2007), España (Colom Valiente et al., 1997), Perú (Curo et al., 2005), Colombia (Quintero et al., 2005), Chile (Arredondo González, 2006), El Salvador (Ayala Chavarría et al., 2011), Venezuela (Cermeño et al., 2006) demuestran que temperatura y humedad son factores cruciales a la hora de recuperar *C. neoformans* en el ambiente, esto concuerda con los resultados observados en este estudio.

La mayoría de las infecciones que son causadas por patógenos ambientales que adquieren una ventaja selectiva por las condiciones del hábitat, donde existen combinaciones ambientales que son necesarias para que las especies toleren el ambiente físico, la obtención de energía y nutrientes, lo que causa que tengan la oportunidad de infectar a nuevos organismos (Morse, 1995). El carácter esporádico de criptococosis humana y la rareza de la transmisión de humano a humano documentado indican que la infección se adquiere a partir del medio ambiente

(Casadevall and Perfect, 1998) lo cual es de gran importancia epidemiológica, dado que los resultados obtenidos nos arrojan cantidades considerables de organismos encontrados, como por ejemplo el sitio 9 (N 2° 26' 33.41", W 76° 36' 23.92") (Fig. 16), el cual fue uno de los sitios de mayor aislamiento de *C. neoformans*.

Por otro lado, en el análisis de excretas de aves, muchos estudios corroboran que coexisten muchas especies de hongos y bacterias, dado que es un medio de muchos nutrientes para su óptimo desarrollo. En este estudio se recuperaron levaduras que crecieron conjuntamente con *C. neoformans*, donde se identificaron las especies *Candida spp.* y *Rhodotorula spp.* El crecimiento de estas levaduras vislumbra la existencia de una competencia por el nicho fundamental, lo que pudo ser uno de los factores que altero la densidad poblacional de *C. neoformans* como lo indican diversas investigaciones (Cabañes, 2008; Cermeño et al., 2006; Costa et al., 2010; Gustin and Kelley, 1971).

En el anexo F, se observa que *C. neoformans* (49,0%) posee una dominancia sobre *Candida spp.* y *Rhodotorula spp.* (10,2% y 7,5% respectivamente), registrándose frecuencias altas en casi todos los sitios (Fig. 25; Anexo F); debido a que *C. neoformans* puede sintetizar rápidamente la urea que se encuentra concentrada en las excretas de paloma, gracias a la acción de la ureasa que es una enzima característica de síntesis y virulencia de éste hongo (Fig. 25). (Canelo D and Casquero C, 2000; Kronstad et al., 2011; Rhodes et al., 1982; Zaragoza and Nielsen, 2013). El hongo *C. neoformans* es el mejor adaptado a estos nichos aunque hay que tener en cuenta los diversos rangos de altitud, temperatura, y humedad para una óptima recuperación de este hongo.

En los sitios 1, 5, 6 y 15 observamos que no hay crecimiento de *C. neoformans* pero si de *Candida spp.* y *Rhodotorula spp.*, a excepción del sitio 15 que no hubo crecimiento de levaduras pero si de mohos (Fig. 25). En el sitio 1, la levadura dominante fue de *Rhodotorula spp.* (34,8%) seguido de *Candida spp.* (15,2%), esto pudo ser causado por la alta humedad relativa, posibles mezclas con excretas de

otros animales y variación en la concentración de nutrientes de las excretas de *B. ibis* (Fig. 20; Anexo F). En los sitios 5, y 6 se observa una baja frecuencia de levaduras con una pequeña dominancia de *Candida spp.*, debido a las condiciones extremas de los sitios. En las zonas 7, 10 y 14, la levadura *Candida spp.* no se recuperó, esto pudo ser debido a la competencia por el nicho como se observa en el sitio 7, donde existe una dominancia de *Rhodotorula spp.* El hongo *Rhodotorula spp.* presento una dominancia en los sitios 1, 2 y 7 (34,8%, 25,5%, 52,0% respectivamente) y no se logró recuperar de los sitios 8 al 15, la variación de temperaturas y humedades en estos sitios pudo ser unos de los factores incidentes en la no recuperación de este hongo y la competencia por nicho con las otras dos levaduras que si se recuperaron de estos sitios (Fig. 25; Anexo F). Hay que anotar que estas dos especies de levaduras son cosmopolitas y poseen una gran adaptación a diferentes ambientes por lo cual pueden coexisten con otros hongos.

En el análisis de la densidad poblacional entre los sitios, se logró observar que los sitios con mayor densidad fueron el sitio 3, 4, 8, 9, y 13 en los cuales las frecuencias acumuladas de los hongos, es más alta para *C. neoformans*, como se observan y analizan en las gráficas anteriores (Fig. 15 y 16; Anexo A). Esto se debe a que en estos sitios, la concentración de los nutrientes, rangos de temperaturas y humedades, que son óptimas para la recuperación de hongos. Los sitios 1, 2, 5, 6, 7, y 14 (Tabla 2) fueron los sitios con menor densidad poblacional, debido a la baja concentración de nutrientes o a la exposición de estos sitios a radiación solar que inhibe el crecimiento tanto de *C. neoformans* como de otras levaduras (Fig. 16; Anexo 2). En el sitio 15, de baja recuperación de levaduras se observó que una alta tasa de crecimiento de mohos, los cuales resisten más a condiciones adversas por la composición sus membranas y paredes celulares (Chai et al., 2009).

En recientes estudios, se clasificaron dos especies y cinco serotipos con base a sus características morfológicas, bioquímicas y genéticas, las cuales son: *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo D, el híbrido AD, y *C. gattii*, serotipos B y C (Boekhout et al., 2001; Franzot et al., 1999;

Kwon-Chung et al., 2002). Para la identificación y confirmación molecular de las cepas de *C. neoformans* se utilizaron las técnicas ya tipificadas de PCR del gen (GTG)₅ (Fig. 21) y RFLP del gen URA5 (Fig. 22, 23 y 24) (Harris et al., 2012; Meyer et al., 2003), demostrando que el 100% de estas cepas eran var. *grubii*, serotipo A, con una variedad en su patrón molecular donde el 99,8% fue VNI y el 0,8% VNII (Tabla 4; Fig. 20; Anexo G), resultados que corroboraron los resultados bioquímicos, donde ninguna cepa de *C. neoformans* presento alguna reacción con el medio CGB como reacciona la especie *grubii* asimilando ácidos 1-malico, fumárico y succínico, produciendo un color verde sobre agar con L-cavanina-glicina-azul de bromotimol, y asimilan la glicina como única fuente de carbono.

Estos resultados son afines a estudios realizados a nivel mundial, donde observan índices de recuperación similares, como en New York, EEUU, donde el 100% de muestras positivas para *C. neoformans* resultaron VNI (Casadevall et al., 1994) o en California y Texas donde de un 91,8% de recuperación se encontró un 2,5% VNI, 82,8% VNII, 7,6% VNIV y 7,1% VNIII (Litvintseva et al., 2005); en Nagasaki, Japón, de un 62,06% de positividad el 100% de aislamientos fueron VNI (Yamamoto et al., 1995); en Thuringia, Alemania, del 74,5% resultaron 60,5% VNI y 39,5% VNIV (Kielstein et al., 2000); en Chiang Mai, Tailandia el 100% de muestras ambientales resultaron positivas donde se encontró que el 62,3% es VNI en muestras de aves y arboles (Sriburee et al., 2004); en Seúl, Corea se reportó un 23,6% de positividad del cual resulto el 100% VNI (Chee and Lee, 2005); en Túnez, África, del 10,4% de muestras positivas, resultaron el 100% de cepas VNI (Mseddi et al., 2011)

A nivel regional y nacional, también se encontraron estudios con porcentajes afines a éste trabajo, como en diferentes ciudades de Brasil; en Rio Grande do Sul, el 100% de las muestras positivas presentaron un 52,6% de cepas VNI en excretas de aves y un 47,4% en árboles, referente a VNIV (Casali et al., 2003); en Goiás, el 20,3% de muestras presento un 100% de cepas VNI (Kobayashil et al., 2005); en Paraná, se reportó un 25,53% del cual resultaron 100% VNI (Lugarini et al., 2008); en Minas Gerais, el 7,9% de muestras positivas reporto un 95% de cepas VNI y 5%

VNII (Ferreira-Paim et al., 2011); en Cundinamarca, Colombia de un 21% recuperado en aves, el 100% correspondió a VNI (Quintero et al., 2005).

Se puede observar que la dominancia del serotipo A, VNI (99,8%), se encuentra en todos los sitios donde se recuperó *C. neoformans* concordando con la estudios realizados anteriormente, donde resaltan la distribución del serotipo A, patrón molecular VNI, tanto en muestras ambientales como clínicas (Fig. 21 y 24), seguido del serotipo VNII (0,8%) (Fig. 21 y 22) que se encontró en baja proporción en los sitios 8, 9 y 13 (Anexo G). Hay que anotar que estas observaciones son un reflejo de los estudios realizados a nivel mundial, donde analizaron excretas de palomas y determinaron que las heces de esta especie es uno de los principales vectores de diseminación de este hongo, responsable de la mayoría de los casos de criptococosis, asociados a pacientes con sida en América del Sur (Negróni, 2008; Viviani and Tortorano, 2009). Cabe destacar que existen otras especies y serotipos dentro del género de *Cryptococcus*, como la especie *C. gattii* y sus serotipos B y C, los cuales se han encontrado en algunas especies de árboles y animales, como los koalas en Australia (Mazuelos and Valverde, 2001).

La posición geográfica de la ciudad de Popayán, contribuye a que se encuentren condiciones óptimas para el crecimiento de la especie *C. gattii*, serotipos B y C, el cual está restringido a zonas tropicales y subtropicales. Últimos estudios han demostrado que estos serotipos presentan crecimiento en excretas de algunas aves como se exponen en estudios realizados en Brasil (Abegg et al., 2006) y España (Frasés et al., 2009); en estos estudios se demostró que a pesar de que el nicho fundamental de *C. neoformans*, serotipo A y D son dominantes en las excretas de aves también puede crecer conjuntamente la especie *C. gattii*, a pesar que esta especie no posee las enzimas para contrarrestar el efecto de la metabolización de la creatinina, la cual alcaliniza demasiado el sustrato. (Viviani and Tortorano, 2009); Esta especie no se encontró en ninguna de las muestras analizadas.

Las variedades y serotipos *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, VNI y VNII se han relacionado a pacientes inmunodeprimidos, principalmente de pacientes infectados con VIH, relacionando la infección por este hongo como un posible centinela de la enfermedad sida. Además esta especie posee una amplia distribución en diferentes hábitats, en especial heces y nidos de palomas, cortezas de árboles (enzima lacasa, ayuda a la degradación de lignina), excrementos de diferentes especies de aves (Viviani and Tortorano, 2009).

En el habitat natural las levaduras de *C. neoformans* no poseen capsula y su diámetro solo alcanza de 1 a 3 μm , lo que facilita el paso a través de las vías pulmonares más pequeñas (Chayakulkeeree and Perfect, 2006), las cuales, una vez en los alveolos pulmonares, desencadenan una respuesta de la inmunidad celular y humoral del huésped, respondiendo a la activación de los macrófagos y neutrófilos por linfocitos más sensibilizados que en condiciones normales es suficiente para controlar la infección, auto controlándose en el 90% de los casos (Vázquez Tsuji et al., 2005). Pero en pacientes con afecciones en la inmunidad celular, la patogenicidad aumenta; el hongo comienza a reproducirse e impide la fagocitosis, activando su sistema complemento de la capsula, mediante su componente principal Glucoroxilomanato (GXM) y la enzima fenol-oxidasa que contribuye al neurotropismo del hongo (Mazuelos and Valverde, 2001) (Kidd et al., 2007; Perfect and Casadevall, 2002).

Desde la creciente pandemia de sida el 90% de los casos diagnosticados de criptococosis están asociadas a pacientes con infecciones por VIH, aunque se presentan otras causas que favorecen la infección, como el embarazo, los trasplantes de órganos, linfomas tratados con fármacos citotóxicos, tratamientos con altas dosis de corticosteroides, como los utilizados en el lupus eritematoso sistémico. Otras causas y/o enfermedades que representan un riesgo para presentar criptococosis progresiva son la sarcoidosis, los síndromes de hiperinmunoglobulinemias por IgM e IgE y las linfopenias de células CD4-positivas no debidas al VIH. En los casos en que no se identifican causas predisponentes

evidentes, la frecuencia es más alta en el sexo masculino y después de los 40 años. En niños es poco frecuente, inclusive en aquellos infectados por el VIH (Casadevall and Perfect, 1998; Chayakulkeeree and Perfect, 2006; Viviani and Tortorano, 2009)

Debido a que la infección de criptococosis es por la inhalación masiva o continua de blastoconidias o basidiosporas del hongo, es importante señalar que gran parte del centro histórico de Popayán (Tabla 2; Anexo G), el cual es un lugar de gran atractivo turístico, son fuentes importantes de infección para quienes los visitan, no sólo porque se logró recuperar *C. neoformans* de sitios donde no se había registrado presencia de este hongo (38,94%, serotipo A), sino que también porque en los cultivos se obtuvieron una gran número de colonias (más de 100 colonias), lo que refleja que la densidad del hongo en las excretas de *C. livia* es alta.

Estos datos contrastan con un estudio realizado en Colombia, entre los años 1987 a 2004, donde Escandón et al., analizaron las relaciones epidemiológicas entre los aislamientos clínicos y ambientales del complejo *C. neoformans*, observándose que en aislamientos clínicos hay una dominancia del serotipo A (91,1 %), mientras que en los aislamientos ambientales, el serotipo A se encuentra en el 42,2%, 42,6% serotipo B y el 13,2% serotipo C (Escandón et al., 2006). Esto puede ser debido a que el estudio realizado por Escandón et al., se recogieron 2785 detritos de árboles y solo 31 muestras de excretas de aves, de las cuales 35 aislamientos, entre detritos y excretas, pertenecían al serotipo A, mientras que en este estudio se recolectaron 303 muestras de excretas de aves de las cuales 118 muestras pertenecieron al serotipo A (Fig. 4; Anexo G).

8. CONCLUSIONES

- Se detectó una alta presencia de *C. neoformans* en las excretas de *C. livia*, en el perímetro urbano de Popayán, donde se logró recuperar un 38,94 % de muestras positivas y un 49,0% de cepas positivas, demostrando que este hongo se encuentra presente en las excretas de esta especie, la cual está distribuida en gran parte de la ciudad.
- Se caracterizó molecularmente los aislamientos recuperados de *C. neoformans*, confirmando los resultados arrojados por los análisis bioquímicos, observando que el 100% de las cepas recuperadas eran *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A; su patrón molecular presento un 99,8% para VNI y un 0.8% para VNII, confirmando que esta variedad es la más cosmopolita del complejo *C. neoformans*.
- La recuperación de *C. neoformans* en los sitios analizados referencio que en gran parte de la zona central de la ciudad se detectó la presencia de éste hongo (73,33% de los sitios), esto se debe a la combinación de factores tanto ambientales como estructurales que permiten una mayor concentración de organismos patógenos.
- *C. neoformans* se recuperó de las excretas de *C. livia* (Paloma común), demostrando que las heces de ésta especie son un medio muy importante para el crecimiento éste hongo, al contrario de las excretas de la especie *B. ibis* (Garcita de ganado) que presentó diversas variaciones en los factores bióticos, abióticos y composición química, lo cual derivo en la no recuperación de *C. neoformans*.
- Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la recuperación de *C. neoformans* y los factores ambientales, observándose que la temperatura (recuperación alta a 22,5°C) y la humedad relativa (recuperación alta a un

60,8%) son factores influyentes en el crecimiento, como lo reportan diversos estudios. También elementos como la acumulación de excretas y estructuras que brindaban protección a las heces de factores externos como la radiación influyeron en la recuperación del hongo. La altitud no fue determinante en este estudio por estar en un mismo piso térmico.

- Se encontró que existe una coexistencia con otros hongos que se han logrado adaptar al medio (*Candida spp.* y *Rhodotorula spp.*), esto puede dar pie a una competencia entre ellos por la cantidad de nutrientes del medio, lo cual pudo haber sido uno de los factores que influyó en el no óptimo crecimiento de *C. neoformans* en algunos de los sitios muestreados.

RECOMENDACIONES

- Debido a la alta tasa de recuperación del hongo, este estudio muestra la importancia de continuar realizando muestreos ambientales en otros sitios del perímetro urbano y rural de Popayán, donde se han reportado casos de criptococosis sin tener un conocimiento de su origen.
- Este estudio muestra la importancia de realizar una vigilancia sobre los sitios muestreados para determinar si la presencia de este hongo es constante durante todo el año o hay fluctuaciones en determinados periodos.
- Se recomienda que se realicen estudios con una mayor duración para observar las fluctuaciones de los factores ambientales durante periodos largos y cuál es la influencia de estos en el crecimiento y dispersión de *C. neoformans* en cada periodo y/o estación.
- En futuros estudios, se recomienda que analizar más detalladamente la especie *B. ibis*, dado que la contaminación de las muestras y el difícil acceso a estas impidió un óptimo análisis de las excretas de esta especie, teniendo en cuenta que es una especie que anida en un solo sitio, pero se desplaza por un gran sector tanto urbano como rural en busca de alimento, lo cual podría contribuir a la dispersión no solo de *C. neoformans* sino también de otros patógenos como *Candida spp* y *Rhodotorula spp*.
- En estudios posteriores, se recomienda tener en cuenta otros factores externos, como excretas de otras especies tanto de aves como mamíferos, detritos de árboles, radiación y densidad de acumulación de excretas o detritos, para así determinar otras posibles fuentes de propagación del hongo.
- En estudios posteriores se invita a que se estudien otros organismos que coexisten en estas excretas de aves, dado que este es un medio óptimo para que habiten no solo levaduras patógenas como *C. neoformans*, *Candida spp*, y

Rhodotorula spp, si no también otro tipo de levaduras, mohos y bacterias que puedan resultar patógenas.

- Se recomienda a las personas que estén en constante contacto con sitios de alta densidad de palomas o excretas de aves, lleven protección de bioseguridad adecuada como guantes, tapabocas y gorro para evitar adquirir propagulos del hongo.
- A personas con conocimiento de una alta deficiencia en su sistema inmune se recomienda que se encuentren al margen de los sitios anteriormente expuestos, dado que podrían sufrir una exposición a este tipo de hongo patógeno, lo cual podría desencadenar una infección.
- Se invita a los entes tanto gubernamentales como de salud pública a la implementación de programas de control de natalidad de la especie *C. livia* y limpieza de sitios anidados de éstas, protegiendo como papel fundamental la coexistencia de estas especies con el ambiente urbano, ya que esta especie cumple un papel fundamental en el componente paisajístico urbano.

BIBLIOGRAFÍA

- Abegg, M. et al., 2006. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from the excreta of psittaciformes in a southern Brazilian zoological garden. *Mycopathologia*, 161(2): 83-91.
- Arredondo González, C.M., 2006. *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas recolectadas en lugares públicos de la ciudad de Santiago, Chile., Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología, 48 pp.
- Ayala Chavarría, D., López Henríquez, F.d.M. and Valencia Recinos, R.E., 2011. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras del ambiente contaminadas con excrementos de palomas en diferentes zonas en El Salvador. *Minerva Revista en Línea CIC-UES*, 2(1): 21-27.
- Bejarano, L.D.C., Elisa, L.C., Dazuli, M. and Ines, A.M., 1996. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas del perímetro urbano de la ciudad de Santiago de Cali. *Colombia Med*, 27: 106-109.
- Bicanic, T. and Harrison, T., 2005. Cryptococcal meningitis. *Br Med Bull.*, 72: 99-118.
- Boekhout, T. et al., 2001. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 147: 891-907.
- Bonifaz, A., 2012. *Micología Médica Básica*, 4, 385 pp.
- Bovers, M. et al., 2008. AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* × *C. gattii* hybrid. *Emerg Infect Dis*, 14(7).
- Bovers, M. et al., 2006. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Research*, 6(4): 599–607.
- Brooks, G., Butel, J. and Morse, S., 2005. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Editorial el Manual Moderno, S.A, 18.

- Cabañes, F.J., 2008. Micosis y zoonosis: *Cryptococcus* spp. Rev. Iberoam. Micol., Vol. 25.
- Cafarchia, C. et al., 2006. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. Medical Mycology, 44(6): 485-492.
- Caicedo, L.D., Alvarez, M.I., Delgado, M. and Cárdenas, A., 1999. *Cryptococcus neoformans* in bird excreta in the city zoo of Cali, Colombia. Mycopathologia, 147(3): 121-124.
- Canelo D, C. and Casquero C, J., 2000. Fenoloxidasa Modificada: Clave para identificar cepas de *Cryptococcus neoformans*. Rev. Perú. med. exp. salud pública, 17(1): 5-8.
- Casadevall, A., Currie, B.P. and Freundlich, L.F., 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptococcus neoformans* isolates from environmental (pigeon excreta) and clinical sources in New York City. J Clin Microbiol., 32(5): 1188–1192.
- Casadevall, A. and Perfect, J., 1998. *Cryptococcus neoformans*. American Society for Microbiology Press: 541.
- Casali, A., Goulart, L. and Rosa e Silva L, e.a., 2003. Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. Fems Yeast Res 2003, 1559: 1-11.
- Cermeño, J.R. et al., 2006. *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* in dove's (*Columbia livia*) excreta in Bolívar State, Venezuela. Revista Latinoamericana de Microbiología, 48(1): 6-9.
- Colom Valiente, M.F., Alberdi, M., Meseguer, I. and Torres-Rodríguez, J.M., 1997. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras de medio ambiente de Alicante. Rev Iberoam Micol., 14: 63-64.

- Costa, A. et al., 2010. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia*, 169(3): 207-13.
- Curo, M., Salinas, F.M. and Casquero, C.J., 2005. *Cryptococcus Neoformans* en excretas de palomas, suelo y aire de los palomares del perímetro Urbano de Ica, 2002. *Rev. Perú. med. exp. salud pública*, 22(4): 262-266.
- Chai, L.Y.A., Netea, M.G., Vonk, A.G. and Kullberg, B.-J., 2009. Fungal strategies for overcoming host innate immune response. *Medical Mycology*, 47(3): 227-236.
- Chaskes, S. and Tyndall, R.L., 1975. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para- and ortho-Diphenols: effect of the nitrogen source. *J Clin Microbiol.*, 1(6): 509–514.
- Chayakulkeeree, M. and Perfect, J.R., 2006. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 20(3): 507-544.
- Chee, H. and Lee, K., 2005. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from pigeon droppings in Seoul, Korea. *J Microbiol.*, 43(5): 469-72.
- Christianson, J., Engber, W. and Andes, D., 2003. Primary cutaneous cryptococcosis in immunocompetent and immunocompromised hosts. *Med Mycol.*, 41(3): 177-188.
- Deacon, J., 1998. *Introducción a la Micología Moderna*. Editorial Limusa S.A. México,, 2.
- Diamond, R. and Bennett, J., 1974. Prognostic factors in cryptococcal meningitis. A study in 111 cases. *Ann Intern Med*, 80(2): 176-81.

- Dora, J. et al., 2006. Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in immunocompetent hosts: case report and review. *Mycopathologia.*, 161(4): 235-238.
- Dromer, F., Mathoulin, S., Dupont, B. and Laporte, A., 1996. Epidemiology of *cryptococcosis* in France: a 9-year survey (1985-1993). French Cryptococcosis Study Group. *Clin Infect Dis*, 23(1): 82-90.
- Duperval, R., Hermans, P., Brewer, N. and Roberts, G., 1977. Cryptococcosis, with emphasis on the significance of isolation of *Cryptococcus neoformans* from the respiratory tract. *Chest*, 72(1): 13-9.
- Ellis, D. et al., 2000. Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Med Mycol*, 38 Suppl 1: 173-82.
- Ellis, D. and Pfeiffer, T., 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol*, 28(7): 1642-4.
- Emmons, C., 1955. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am J Hyg*, 62(3): 227-32.
- Emmons, C.W., 1951. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J Bacteriol*, 62(6): 685-690.
- Escandón, P. et al., 2012. Cryptococcosis in Colombia: Results of the national surveillance program for the years 2006-2010. *Biomédica*, 32(386-98).
- Escandón, P. and Montilla, A., 2010. Tipificación molecular de aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*. *Infectio*, Vol. 14 No. 28.
- Escandón, P., Sánchez, A., Martínez, M., Meyer, W. and Castañeda, E., 2006. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity

- and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. FEMS Yeast Research, 6(4): 625–635.
- Fenga, X. et al., 2013. Development of a Singleplex PCR Assay for Rapid Identification and Differentiation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *Cryptococcus gattii*, and Hybrids. J. Clin. Microbiol., 56(6): 1920-1923.
- Ferreira-Paim, K. et al., 2011. Genotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from captive birds in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Mycosis, 54(45): 294–300.
- Franzot, S., Salkin, I. and Casadevall, A., 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J Clin Microbiol, 37(3): 838-40.
- Fraser, J.A. et al., 2005. Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. Nature, 437: 1360-1364.
- Frasés, S., Ferrer, C., Sánchez, M. and Colom-Valiente, M., 2009. Molecular epidemiology of isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Spain. Rev Iberoam Micol., 26(2): 112.
- Fromtling, R. et al., 1985. Capsular deficient *cryptococcus neoformans* in AIDS patients. The Lancet, 325(8435): 988 - 989.
- Fyfe, M. et al., 2008. *Cryptococcus gattii* infections on Vancouver Island, British Columbia, Canada: emergence of a tropical fungus in a temperate environment. Can Commun Dis Rep, 34(6): 1-12.
- Galanis, E. and Macdougall, L., 2010. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. Emerg Infect Dis, 16(2): 251-7.
- Gatti, F. and Eeckels, R., 1970. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. I. Description of the disease and of the strain. Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol, 50 (6): 689-93.

- Granados, D.P. 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.
- Gustin, P.N. and Kelley, D.C., 1971. A survey of zoo aviaries for the presence of *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia et mycologia applicata* 45(2): 93-101.
- Harris, J., Lockhart, S. and Chiller, T., 2012. *Cryptococcus gattii*: where do we go from here? *Med Mycol*, 50(2): 113-29.
- Hasimoto Souzal, L.K. et al., 2005. Antifungal susceptibilities of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in goiânia city, Goiás, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 47: 253-256.
- Heitman, J., Kozel, T., Kwon-Chung, J., Perfect, J.R. and Casadevall, A., 2011. *Cryptococcus*: From Pathogen to Model Yeast. ASM Press.
- Hilty, S. and Brown, W., 2001. *Guia de las aves de Colombia*, 1.
- Instituto Nacional De Salud, I., 2012. Reporte de Pacientes con Criptococosis desde el 2001 hasta el 2012, INS.
- James A, B., 2010. A history of research on yeasts 14:¹ medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. *Wiley Online Library*, 27: 875–904.
- Khosravi, A.R., 1997. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in northern Iran. *Mycopathologia*, Vol. 139(2): 93-95.
- Kidd, S.E. et al., 2007. Characterization of Environmental Sources of the Human and Animal Pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. *Appl Environ Microbiol.*, 73(5): 1433–1443.

- Kielstein, P., Hotzel, H., Schmalreck, A., Khaschabi, D. and Glawischnig, W., 2000. Occurrence of *Cryptococcus* spp. in excreta of pigeons and pet birds. *Mycosis*, 43(7): 15.
- KJ., K.-C., I., P. and TJ., P., 1982. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J Bacteriol*, 150(3): 1414-21.
- Klein, K. et al., 2009. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. *J Clin Microbiol*, 47(11): 3669-72.
- Kobayashil, C.C.B.A. et al., 2005. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 47(4).
- Kozel, T., 1995. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.*, 3(8): 295-9.
- Kronstad, J.W. et al., 2011. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 193-203.
- Kwon-Chung, J. and Bennett, J., 1984. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *American Journal of Epidemiology*, 120(1): 123-130.
- Kwon-Chung, J., Boekhout, T., Fell, J. and Diaz, M., 2002. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 2002, 51: 804.
- Kwon-Chung, K., Wickes, B., Booth, J., Vishniac, H. and Bennett, J., 1987. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 55(8): 1751-4.
- Kwon-Chung, K.J., 1975. A new genus, *filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. *Mycologia*, Vol. 67, No. 6: 1197-1200.

- 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. *Appl. Environ. Microbiol*, 69(4): 2080-2086.
- Ledford, H., 2007. Hungry fungi chomp on radiation. In: N. Journal (Editor), <http://www.nature.com/news/2007/070521/full/news070521-5.html#B1>.
- Lema, M.L. and Santos, L.A., 2011. *Cryptococcus Meningea*
- Levine, S., Zimmerman, H. and Scorza, A., 1957. Experimental cryptococcosis (torulosis). *Am J Pathol*, 33(3): 385-409.
- Litvintseva, A., Thakur, R., Vilgalys, R. and Mitchell, T., 2006. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics*, 172(4): 2223-38.
- Litvintseva, A.P., Kestenbaum, L., Vilgalys, R. and Mitchell, T.G., 2005. Comparative Analysis of Environmental and Clinical Populations of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol*, 43(2): 556-564.
- Litvintseva, A.P. et al., 2003. Evidence of Sexual Recombination among *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates in Sub-Saharan Africa. *Eukaryotic Cell*, 2(6): 1162-1168.
- 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.
- Lopez-Martinez, R. and Castanon-Olivares, L.R., 1995. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in Mexico City. *Mycopathologia*, 129(1): 25-8.

- López-Martínez, R. and Castañón-Olivares, L., 1995. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in Mexico City. *Mycopathologia*, 129(1): 25-8.
- Lugarini, C. et al., 2008. *Cryptococcus neoformans* Isolated from Passerine and Psittacine bird excreta in the state of Paraná, Brazil. *Mycopathologia*, 166(2): 61-9.
- Mabee, C., Mabee, S., Kirkpatrick, R. and Koletar, S., 1995. Cirrhosis: a risk factor for cryptococcal peritonitis. *Am J Gastroenterol*, 90(11): 2042-5.
- MacDougall, L., Fyfe, M., Romney, M.S. and Galanis, E., 2011. Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada. *Emerg Infect Dis*.
- Mazuelos, M.E. and Valverde, C.A., 2001. Criptococosis: diagnóstico microbiológico y estudio de la sensibilidad in vitro. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- McDonough, E., Lewis, A. and Penn, L., 1966. Relationship of *Cryptococcus neoformans* to pigeons in Milwaukee, Wisconsin. *Public Health Rep*, 81(12): 1119-23.
- Meyer, W., Castaneda, A., Jackson, S., Huynh, M. and Castaneda, E., 2003. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*, 9(2): 189-95.
- 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): 1790-9.
- Morse, S.S., 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis*, 1(1): 7-15.

- Mseddi, F. et al., 2011. First environmental isolations of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Tunisia and review of published studies on environmental isolations in Africa. *Mycopathologia*, 171(5): 355-60.
- Negrone, R., 2008. Criptococosis. In: FUNDAI (Editor), Sida y Enfermedades Asociadas. Diagnóstico Clínica y Tratamiento. Beneticci, J, pp. 332-336.
- Negrone, R., 2012. Cryptococcosis. *Clinics in Dermatology*, 30(6): 599-609.
- Nielsen, K., De Obaldia, A.L. and Heitman, J., 2007. *Cryptococcus neoformans* Mates on Pigeon Guano: Implications for the Realized Ecological Niche and Globalization. *Eukaryotic Cell*, 6(6): 949-959.
- Ordoñez, N. and Castañeda, E., 1994. Serotipificación de aislamientos clínicos y del medio ambiente de *Cryptococcus neoformans* en Colombia. *Biomedica*, 14: 131-139.
- Pal, M., 1997. First report of isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from avian excreta in Kathmandu, Nepal. *Rev Iberoam Micol*, 14(4): 181-3.
- Park, B.J. et al., 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 23(4): 525-530
10.1097/QAD.0b013e328322ffac.
- Pasqualotto, A., Bittencourt, S.C., de Mattos, O.F. and Severo, L., 2004. Cryptococemia. An analysis of 28 cases with emphasis on the clinical outcome and its etiologic agent. *Rev Iberoam Micol.*, 24(3): 143-146.
- Perfect, J., 1989. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*, 3: 77-102.
- Perfect, J. and Casadevall, A., 2002. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.*, 16(4): 74.
- Perfect, J. and Casadevall, A., 2011. The history of *Cryptococcus* and Cryptococcosis. *ASM Press*, 1: 17-26.

- Polacheck, I., Hearing, V.J. and Kwon-Chung, K.J., 1982. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol.*, 150(3): 1212–1220.
- Quintero, E., Castañeda, E. and Ruiz, A., 2005. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento del Cundinamarca-Colombia. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 22: 93-98.
- Reséndiz, M., Velázquez, G., Pérez, E., Chávez, M. and Olvera, R., 2008. Criptococosis cerebral, análisis de 29 casos en 23 años de autopsias en el Hospital General de México. *Patología Revista Latinoamericana*, 46(3): 222-227.
- Rhodes, J.C., Polacheck, I. and Kwon-Chung, K.J., 1982. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.*, 36(3): 1175-1184.
- Ribeiro, M.A. and Ngamskulrungrroj, P., 2008. Molecular characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in Vitoria, ES, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50: 315-320.
- Rico, M. and Penneys, N., 1985. Cutaneous cryptococcosis resembling molluscum contagiosum in a patient with AIDS. *Arch Dermatol.*, 121(7): 901-902.
- Rosario, I., Acosta, B. and Colom, F., 2008. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus spp.* *Revista Iberoamericana de Micología*, 25: S13-S18.
- Rubio, C., 1998. Micosis subcutáneas y sistémicas. In: En: García Rodríguez JA and E. Picazo JJ (Editors), *Microbiología Médica. 1. Microbiología Médica General*, Madrid, Harcourt Brace 1998, pp. 663-667.
- Ruiz, A., Fromtling, R. and Bulmer, G., 1981. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. *Infect Immun*, 31(2): 560-3.

- Secretaria De Salud Del Cauca, S., 2014. Reporte de Casos de Pacientes con sida para el Departamento del Cauca, Secretaria De Salud Del Cauca.
- Severo, C. et al., 2011. Cryptococcuria as manifestation of disseminated cryptococcosis: Staib agar as a selective identification medium. *Mycosis*, 54(6): 760-766.
- Sorrell, T., 2001. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol*, 39(2): 155-68.
- Sorrell, T.C. and Ellis, D.H., 1997. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 14: 42-43.
- Sriburee, P., Khayhan, S., Khamwan, C., Panjaisee, S. and Tharavichitkul, P., 2004. Serotype and PCR-fingerprints of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Chiang Mai, Thailand. *Mycopathologia.*, 158(1): 25-31.
- Subramanian, S. and Mathai, D., 2005. Clinical manifestations and management of cryptococcal infection. *J Postgrad Med*, 51(5): 21-26.
- Tristano, A.G., 2010. Criptococosis meníngea y lupus eritematoso sistémico: Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Rev. chil. infectol.*, 27(2).
- University of Wisconsin, D.m.a.i., 2007. The Hull Lab, <http://bmolchem.wisc.edu/labs/hull/research.html>, pp. The C. neoformans infectious cycle. C. neoformans.
- Vanbreuseghem, R. and Takashio, M., 1970. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. *Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol*, 50(6): 695-702.
- Vázquez Tsuji, O., Martínez Barbabosa, I. and Campos Rivera, T., 2005. Criptococosis. Historia natural y estado actual del tratamiento. *Acta Pediátrica de México*, 26: 18-28.

- Viviani, M.A. and Tortorano, A.M., 2009. Cryptococcosis. In: C.L. Elsevier (Editor), *Clinical Mycology*, pp. 231-249.
- Walker, T.S., 1999. *Microbiologia*. MCGRAW-HILL / Interamericana De Mexico, 3: 541.
- Wang, Y. and Casadevall, A., 1994. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl Environ Microbiol.*, 60(10): 3864–3866.
- Wilson, D., Bennett, J. and Bailey, J., 1968. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 127(3): 820-3.
- Yamamoto, Y. et al., 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. *J Clin Microbiol.*, 33(12): 3328-32.
- Zaragoza, O. and Nielsen, K., 2013. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Current Opinion in Microbiology*, 16(4): 409-413.

ANEXOS

ANEXO A. Tabla de Porcentajes de aislamientos de *C. neoformans* entre todos los sitios.

			<i>Cryptococcus neoformans</i>		Total
			Ausente	Presente	
Sitio	Sitio 1	Recuento	46	0	46
		% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	12,2%	0,0%	6,2%
	Sitio 2	Recuento	43	4	47
		% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	11,4%	1,1%	6,4%
	Sitio 3	Recuento	41	47	88
		% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	10,9%	13,0%	11,9%
	Sitio 4	Recuento	34	43	77
		% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	9,0%	11,9%	10,4%
	Sitio 5	Recuento	27	0	27
		% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	7,2%	0,0%	3,7%
	Sitio 6	Recuento	24	0	24
		% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	6,4%	0,0%	3,3%
	Sitio 7	Recuento	24	1	25
		% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	6,4%	0,3%	3,4%
	Sitio 8	Recuento	22	43	65
% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>		5,9%	11,9%	8,8%	
Sitio 9	Recuento	13	88	101	
	% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	3,5%	24,4%	13,7%	
Sitio 10	Recuento	17	36	53	
	% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	4,5%	10,0%	7,2%	
Sitio 11	Recuento	13	33	46	
	% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	3,5%	9,1%	6,2%	
Sitio 12	Recuento	24	21	45	
	% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	6,4%	5,8%	6,1%	
Sitio 13	Recuento	9	41	50	
	% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	2,4%	11,4%	6,8%	
Sitio 14	Recuento	19	4	23	
	% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	5,1%	1,1%	3,1%	
Sitio 15	Recuento	20	0	20	
	% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	5,3%	0,0%	2,7%	
Total		Recuento	376	361	737
		% dentro de <i>Cryptococcus neoformans</i>	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla de contingencia donde se determina el porcentaje y conglomeración de tres categorías de frecuencias para los 15 sitios, Alta (>21, Naranja), Media (5-20, Verde), Baja (<5, Azul).

ANEXO B. Pruebas Post Hoc para Anova de un factor, de las tres variables ambientales y las categorías de frecuencias.

Variable dependiente	(I) Frecuencia <i>C. neoformans</i>	(J) Frecuencia <i>C. neoformans</i>	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
Temperatura (°C)	HSD de Tukey	Baja	Media	-,0886	,3668	,968	-,950	,773
			Alta	2,0322*	,1843	,000	1,599	2,465
		Media	Baja	,0886	,3668	,968	-,773	,950
			Alta	2,1208*	,3484	,000	1,303	2,939
		Alta	Baja	-2,0322*	,1843	,000	-2,465	-1,599
			Media	-2,1208*	,3484	,000	-2,939	-1,303
	T3 de Dunnett	Baja	Media	-,0886	,2884	,986	-,782	,604
			Alta	2,0322*	,2722	,000	1,378	2,687
		Media	Baja	,0886	,2884	,986	-,604	,782
			Alta	2,1208*	,1125	,000	1,845	2,397
		Alta	Baja	-2,0322*	,2722	,000	-2,687	-1,378
			Media	-2,1208*	,1125	,000	-2,397	-1,845
Humedad Relativa (%)	HSD de Tukey	Baja	Media	-1,2588	2,0420	,811	-6,054	3,537
			Alta	-2,9501*	1,0260	,012	-5,360	-,541
		Media	Baja	1,2588	2,0420	,811	-3,537	6,054
			Alta	-1,6913	1,9396	,658	-6,246	2,864
		Alta	Baja	2,9501*	1,0260	,012	,541	5,360
			Media	1,6913	1,9396	,658	-2,864	6,246
	T3 de Dunnett	Baja	Media	-1,2588	1,6199	,822	-5,154	2,636
			Alta	-2,9501	1,5766	,176	-6,743	,843
		Media	Baja	1,2588	1,6199	,822	-2,636	5,154
			Alta	-1,6913*	,4017	,000	-2,682	-,701
		Alta	Baja	2,9501	1,5766	,176	-,843	6,743
			Media	1,6913*	,4017	,000	,701	2,682
Altura (msnm)	HSD de Tukey	Baja	Media	-15,986*	1,896	,000	-20,44	-11,53
			Alta	-9,625*	,953	,000	-11,86	-7,39
		Media	Baja	15,986*	1,896	,000	11,53	20,44
			Alta	6,360*	1,801	,001	2,13	10,59
		Alta	Baja	9,625*	,953	,000	7,39	11,86
			Media	-6,360*	1,801	,001	-10,59	-2,13
	T3 de Dunnett	Baja	Media	-15,986*	1,456	,000	-19,49	-12,48
			Alta	-9,625*	1,460	,000	-13,14	-6,11
		Media	Baja	15,986*	1,456	,000	12,48	19,49
			Alta	6,360*	,117	,000	6,08	6,64
		Alta	Baja	9,625*	1,460	,000	6,11	13,14
			Media	-6,360*	,117	,000	-6,64	-6,08

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

ANEXO C. Prueba de subconjuntos homogéneos para temperatura.

Temperatura (°C)			
Frecuencia <i>C. neoformans</i>	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
HSD de Tukey ^{a,b}	Alta	480	22,088
	Baja	212	24,120
	Media	45	24,209
	Sig.		1,000
			.956

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 103,368.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Se observa que las categorías Media y Baja poseen una similitud alta con una significancia de $P = 0,956$, formando 2 subconjuntos.

ANEXO D. Prueba de subconjuntos homogéneos para Humedad Relativa.

Humedad Relativa (%)			
Frecuencia <i>C. neoformans</i>	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
HSD de Tukey ^{a,b}	Baja	212	59,137
	Media	45	60,396
	Alta	480	62,087
	Sig.		.204

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 103,368.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

ANEXO E. Prueba de subconjuntos homogéneos para Altitud.

Altura (msnm)					
Frecuencia <i>C. neoformans</i>		N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD de Tukey ^{a,b}	Baja	212	1741,01		
	Alta	480		1750,64	
	Media	45			1757,00
	Sig.		1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 103,368.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Se observa que todas las categorías poseen una diferencia clara entre ellas formando 3 subconjuntos ($P = 1,000$).

ANEXO F. Tabla de Contingencia para tipo de hongo versus sitios y sus porcentajes de recuperación.

			Tipo Hongo				Total
			NN/NoCrecio	<i>C. neoformans</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Rhodotorula sp.</i>	
Sitio	Sitio 1	Recuento	23	0	7	16	46
		% dentro de Sitio	50,0%	0,0%	15,2%	34,8%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	9,3%	0,0%	9,3%	29,1%	6,2%
Sitio 2	Sitio 2	Recuento	22	4	9	12	47
		% dentro de Sitio	46,8%	8,5%	19,1%	25,5%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	8,9%	1,1%	12,0%	21,8%	6,4%
Sitio 3	Sitio 3	Recuento	32	47	4	5	88
		% dentro de Sitio	36,4%	53,4%	4,5%	5,7%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	13,0%	13,0%	5,3%	9,1%	11,9%
Sitio 4	Sitio 4	Recuento	11	43	20	3	77
		% dentro de Sitio	14,3%	55,8%	26,0%	3,9%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	4,5%	11,9%	26,7%	5,5%	10,4%
Sitio 5	Sitio 5	Recuento	16	0	6	5	27
		% dentro de Sitio	59,3%	0,0%	22,2%	18,5%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	6,5%	0,0%	8,0%	9,1%	3,7%
Sitio 6	Sitio 6	Recuento	20	0	3	1	24
		% dentro de Sitio	83,3%	0,0%	12,5%	4,2%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	8,1%	0,0%	4,0%	1,8%	3,3%
Sitio 7	Sitio 7	Recuento	11	1	0	13	25
		% dentro de Sitio	44,0%	4,0%	0,0%	52,0%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	4,5%	0,3%	0,0%	23,6%	3,4%
Sitio 8	Sitio 8	Recuento	17	43	5	0	65
		% dentro de Sitio	26,2%	66,2%	7,7%	0,0%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	6,9%	11,9%	6,7%	0,0%	8,8%
Sitio 9	Sitio 9	Recuento	8	88	5	0	101
		% dentro de Sitio	7,9%	87,1%	5,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	3,3%	24,4%	6,7%	0,0%	13,7%
Sitio 10	Sitio 10	Recuento	17	36	0	0	53
		% dentro de Sitio	32,1%	67,9%	0,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	6,9%	10,0%	0,0%	0,0%	7,2%
Sitio 11	Sitio 11	Recuento	6	33	7	0	46
		% dentro de Sitio	13,0%	71,7%	15,2%	0,0%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	2,4%	9,1%	9,3%	0,0%	6,2%
Sitio 12	Sitio 12	Recuento	19	21	5	0	45
		% dentro de Sitio	42,2%	46,7%	11,1%	0,0%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	7,7%	5,8%	6,7%	0,0%	6,1%
Sitio 13	Sitio 13	Recuento	5	41	4	0	50
		% dentro de Sitio	10,0%	82,0%	8,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	2,0%	11,4%	5,3%	0,0%	6,8%
Sitio 14	Sitio 14	Recuento	19	4	0	0	23
		% dentro de Sitio	82,6%	17,4%	0,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	7,7%	1,1%	0,0%	0,0%	3,1%
Sitio 15	Sitio 15	Recuento	20	0	0	0	20
		% dentro de Sitio	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	8,1%	0,0%	0,0%	0,0%	2,7%
Total	Total	Recuento	246	361	75	55	737
		% dentro de Sitio	33,4%	49,0%	10,2%	7,5%	100,0%
		% dentro de Tipo Hongo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

ANEXO G. Geolocalización de los sitios de muestreo con sus porcentajes de recuperación y patrones moleculares.

