

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
CRYPTOCOCCUS SPP. A PARTIR DE HECES DE
PALOMAS (*Columba livia*), EN LA UAAAN-UL”**

**POR
ALICIA GALEANA RAMÍREZ**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE
CRYPTOCOCCUS SPP. A PARTIR DE HECES DE
PALOMAS (*Columba livia*), EN LA UAAAN-UL”**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
POR**

ALICIA GALEANA RAMÍREZ

ASESOR PRINCIPAL

MC. JOSÉ LUIS CORONA MEDINA

TORREÓN, COAHUILA, MEXICO

JUNIO DE 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *CRYPTOCOCCUS*
SPP. A PARTIR DE HECES DE PALOMAS (*Columba*
livia), EN LA UAAAN-UL”**

POR

ALICIA GALEANA RAMÍREZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



TESIS

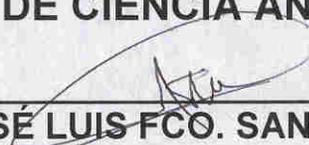
**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *CRYPTOCOCCUS*
SPP. A PARTIR DE HECES DE PALOMAS (*Columba
livia*), EN LA UAAAN UL**

Tesis Aprobada por el

PRESIDENTE DEL JURADO


MC. JOSÉ LUIS CORONA MEDINA

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL**


MC. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2009

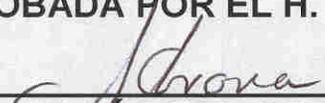
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

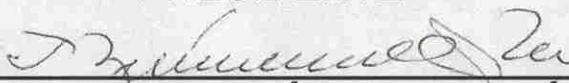


TESIS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *CRYPTOCOCCUS*
SPP. A PARTIR DE HECES DE PALOMAS (*Columba*
livia), EN LA UAAAN UL

TESIS APROBADA POR EL H. JURADO EXAMINADOR


MC. JOSÉ LUIS CORONA MEDINA
PRESIDENTE


DR. RAFAEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
VOCAL


MC. MARGARITA Y. MENDOZA RAMOS
VOCAL


MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
VOCAL SUPLENTE

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

JUNIO DE 2009

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas, quienes me ayudaron en una u otra forma a la realización de esta investigación de tesis de Licenciatura.

Primero que nada deseo agradecer desde el fondo de mi corazón a Dios por permitir mi existencia y porque quiso que a pesar de una infinidad de obstáculos pudiera concluir mi carrera y terminar mi tesis.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro "Unidad Laguna", que me permitió pertenecer a tan distinguida institución y me acogió brindándome servicios muy importantes para poder subsistir y así contar con una carrera tan digna como lo es la Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila por haber colaborado facilitando sus instalaciones (laboratorios), por haber hecho posible esta investigación.

Al MC. José Luis Corona Medina, mi asesor, por haberme dado la oportunidad de trabajar con él en este proyecto y por sus valiosas sugerencias.

A la Dra. Rocio González por su paciencia para aportarnos los conocimientos prácticos y teóricos; así como por haber compartido su valiosa experiencia que fue indispensable para poder concluir esta investigación.

A mis amigos incondicionales de toda la carrera, Alma Dolores Reyes Vite y Rigoberto Hernández Cruz, porque en ellos he encontrado siempre el apoyo moral y palabras de aliento cuando más las he necesitado, por aportar sus conocimientos en el campo de la Medicina Veterinaria y Zootecnia cuando los he requerido y sin duda por ser mis mejores amigos.

A Ausencio Olán Sánchez por brindarme apoyo moral, así como sus conocimientos y por haber estado siempre conmigo mientras se pudo.

A todos mis compañeros y colegas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro "Unidad Laguna", que de forma desinteresada siempre me han apoyado contribuyendo siempre con sus comentarios y opiniones constructivas para ser mejor persona cada día.

Por último quiero dejar constancia de mi agradecimiento a todas aquellas personas que en una u otra forma ayudaron a la realización del estudio.

DEDICATORIAS

A mis padres, Abel Galeana Franco y Lidia Ramírez Anzures, a mis hermanos, Pedro, Patricio, Macrina, Rosalba, Bertha, Emiliano y Francisco Javier. Gracias por su apoyo económico y confianza que tuvieron en mí para poder seguir estudiando.

Y sobrinos Xochitl, Onésimo, Julissa, Ruyeri Alejandro, Amayrani, Evelin, Vianey, Jorge y Fernanda. Gracias a su apoyo y estímulo permanente me permitieron culminar este proyecto.

A Cesar Osvaldo Cedillo Espino, José Luis Zavala Ávila y Ángel Rivera Flores por aportar su ayuda económica en esta fase final de mi carrera.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos.....	I
Dedicatorias.....	II
Índice general.....	III
Índice de cuadros.....	IV
Índice de figuras.....	IV
Glosario.....	V
Resumen.....	VI
I.-Introducción.....	1
II.-Revisión de literatura.....	3
2.1.-Criptococosis.....	3
2.2.-Manifestaciones clínicas.....	4
2.2.1.-Criptococosis pulmonar.....	5
2.2.2.-Meningoencefalitis.....	5
2.2.3.-Criptococosis cutánea.....	5
2.2.4.- Criptococosis ocular.....	6
2.3.-Procedimientos diagnósticos.....	6
2.3.1.-Examen directo.....	6
2.3.2.-Aislamiento Primario.....	6
2.3.3.-Pruebas Serológicas.....	7
2.3.4.- Aislamiento e identificación.....	8
2.4.-Tratamiento.....	9
2.4.1.-Criptococosis Pulmonar.....	9

2.4.2.-Meningitis e infección diseminada.....	10
2.5.-Criptococosis en animales domésticos.....	10
2.5.1.-Criptococosis felina.....	12
2.5.2.- Criptococosis canina.....	13
2.6.-Epidemiología.....	14
2.7.-Tratamiento para animales.....	15
2.8.-Etiología.....	15
2.8.1.- <i>Cryptococcus neoformans</i>	15
2.8.2.-Taxonomía del estado anamorfo.....	16
2.8.3.-Teleomorfos.....	17
2.9.-Fuentes naturales y distribución geográfica.....	18
2.10.-Ecología y ciclo de vida.....	20
2.11.-Características Bioquímicas.....	21
2.12.-Factores de virulencia.....	23
2.13.-Características generales y medios de cultivo.....	23
III.-Hipótesis.....	26
IV.-Objetivos.....	26
4.1.-Objetivos.....	26
V.-Materiales y métodos.....	27
5.1.- Localización y área de estudio.....	27
5.2.-Duración y recolección de muestras.....	28
5.2.1. Lugar de recolección y distribución.....	28
5.3.-Siembra, identificación e aislamiento.....	30
5.4.- Técnicas de resiembra e aislamiento.....	31

5.5.- Técnicas de identificación.....	32
5.5.1.- Frotis con tinta china para observar cápsulas.....	32
5.5.2.- Prueba de la fenoloxidasa.....	32
VI.-Resultados.....	33
VII.- Discusión.....	38
VIII.-Conclusiones.....	39
IX.-Literatura Citada.....	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>spp.</i>	18
Cuadro 2. Localización y distribución de muestras.....	29
Cuadro 3. Número de muestras positivas y porcentaje de prevalencia.....	34
Cuadro 4. Muestras positivas y prevalencia al sol y sombra.....	35
Cuadro 5. Registros de muestras analizadas e identificación de hongos.....	35
Cuadro 6. Últimos registros de muestras analizadas e identificación de hongos.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Cryptococcus neoformans</i> con su cápsula y diámetro que puede ir de los 2 a los 20 µm. Observación con tinta china.....	24
Figura 2. <i>Cryptococcus neoformans</i> en medio de Sabouraud a temperatura de 33.5°C, suele formar colonias cremosas, con pigmento amarillo y superficie lisa.....	25
Figura 3. <i>Cryptococcus neoformans</i> variedad <i>gattii</i> con formas de yemas y células ovaladas largas.....	26
Figura 4. Localización de la Comarca Lagunera (INEGI, Carta Topográfica 150000, Matamoros G13D26, Coahuila y Durango, Edición 1999).....	27
Figura 5. Localización de diversas áreas, de donde se tomaron las muestras en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna.....	29
Figura 6. Métodos de preparación para sembrar las excretas de paloma (<i>Columba livia</i>), en Agar Dextrosa Papa y Sabouraud.....	31
Figura 7. Frecuencia de los diversos microorganismos identificados en base a las 80 muestras analizadas.....	33
Figura 8. Distribución de <i>Cryptococcus spp.</i> en diversas áreas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro UL.....	34

GLOSARIO

Ácido úrico: Producto del metabolismo de las proteínas presente en la sangre y excretado por la orina.

Amoniaco: Gas aromático incoloro compuesto por nitrógeno y oxígeno, que se produce como consecuencia de la descomposición de la materia orgánica nitrogenada. Actúa como estimulante aromático, como detergente y como emulsionante, además de tener otras muchas acciones.

Apoplejía: obsoleto, accidente cerebrovascular que conduce a una parálisis.

Aspergillus: Género de hongos que es un frecuente contaminante de laboratorio y produce infecciones nosocomiales.

Biopsia: extracción de una pequeña pieza de tejido vivo de un órgano u otra parte del cuerpo para, mediante el examen microscópico, confirmar o establecer un diagnóstico, estimar un pronóstico o seguir el curso de una enfermedad.

Candida: Género de hongos levaduriformes que incluye al patógeno común *Candida albicans*.

Cápsula: envoltura membranosa que rodea a ciertos microorganismos, como los neumococos.

Colonias: conjunto de microorganismos en un cultivo que proceden de una sola célula. Las colonias, según su configuración, pueden ser lisas, rugosas o enanas.

Creatina: Compuesto nitrogenado importante producido por los procesos metabólicos del cuerpo. Combinada con el fósforo produce fosfatos de alta energía.

Creatinina: Sustancia generada a partir del metabolismo de la creatina, presente normalmente en la sangre, en la orina y en el tejido muscular.

Cryptococcus: Género de hongos levaduriformes que se reproducen por gemación más que por esporas. Existen varias especies patógenas; la más importante es *C. neoformans*.

Dermatofito: Cualquiera de los diversos hongos que producen enfermedades parasitarias de la piel en los seres humanos.

Detritos: Tejido muerto, enfermo o lesionado, y cualquier cuerpo extraño que deba ser retirado de una herida o zona en tratamiento.

Diplopía: Doble visión, producida por la función defectuosa de los músculos extraoculares o por algún trastorno de los nervios correspondientes. **V**

Ergosterol: Esterol insaturado del grupo de la vitamina D aislado de las levaduras, champiñones, cornezuelo de centeno y otros hongos. Cuando se trata con radiación ultravioleta se convierte en vitamina D₂.

Espujo: Material expulsado por la tos, procedente de los pulmones y expectorado a través de la boca. Contiene moco, restos celulares o microorganismos, y en ocasiones también sangre o pus. La cantidad, el color y la composición del espujo son datos importantes para el diagnóstico de numerosas enfermedades.

Gemación: Tipo de reproducción asexual en el que la célula produce una proyección semejante a una yema que contiene cromatina y que eventualmente se separa del progenitor y se desarrolla como un organismo independiente. Es la forma común de reproducción en los animales inferiores y las plantas, tales como las esponjas, levaduras y mohos.

Guanina: Base púrica principal presente en los nucleótidos y componente fundamental del ADN y ARN. En forma libre o no combinada está presente en cantidades mínimas en la mayoría de las células, normalmente como producto de la hidrólisis enzimática de ácidos nucleicos y nucleótidos.

Hifa: Estructura filiforme del micelio de un hongo.

Inmunodeficiente: Relativo a un trastorno del sistema inmune, en el que la inmunidad humoral o celular es infrecuente y está disminuida la resistencia a la infección.

Inmunosupresión: administración de sustancias que alteran de forma significativa la capacidad del sistema inmunitario para responder a la estimulación antigénica, mediante la inhibición de la inmunidad humoral y celular. La inmunosupresión puede ser deliberada, como en la preparación de trasplantes, para evitar el rechazo por parte del huésped de los tejidos del donante; o accidental, como resulta frecuentemente en el tratamiento del cáncer con quimioterapia.

Latente: Dormido, que existe como posibilidad; por ejemplo: la tuberculosis puede estar latente durante períodos extensos de tiempo, y convertirse en activa en determinadas condiciones.

Levadura: Todo hongo nucleado unicelular, habitualmente oval, que se reproduce por gemación.

Manitol: Azúcar que apenas se metaboliza, utilizado como diurético osmótico y en pruebas de función renal. Se prescribe para facilitar la diuresis, disminuir la presión intraocular e intracraneal, para facilitar la excreción de sustancias y residuos tóxicos y para evaluar la función renal.

Melanina: Carbohidrato que contiene tres o más moléculas de carbohidratos simples. Las dextrinas, almidones, glucógenos y pentosas son ejemplos de polisacáridos.

Meningitis: Cualquier infección o inflamación de las membranas que envuelven el cerebro y la médula espinal. Normalmente es purulenta y afecta al líquido del espacio subaracnoideo. Se caracteriza por cefalea intensa, vómitos y dolor y rigidez de nuca.

Metástasis: proceso por el que las células tumorales se diseminan hacia localizaciones distantes del organismo. Dado que los tumores malignos no están encapsulados, las células pueden escaparse y ser transportadas por la circulación linfática o sanguínea a otros órganos alejados del tumor primario. 2. el tumor que se desarrolla de esta forma.

Micelio: Masa de filamentos ramificados interconectados, formando una trama que elaboran la mayoría de los hongos.

Nistagmo: Movimientos rítmicos involuntarios de los ojos; las oscilaciones pueden ser horizontales, verticales, giratorias o mixtas.

Nitrato: una sal del ácido nítrico.

Nitrito: éster o sal del ácido nitroso, utilizado como vasodilatador y antiespasmódico. Entre los nitritos más ampliamente utilizados están los de amilo, etilo, potasio y sodio.

Paraplejía: Trastorno caracterizado por una pérdida sensitiva o motora en las extremidades inferiores. También pueden estar afectados los músculos de la espalda y los abdominales, por lo que la parálisis puede ser completa o incompleta.

Paresia: parálisis parcial, relacionada en algunos casos con una neuritis local. 2. manifestación tardía de la neurosífilis, caracterizada por parálisis generalizada, incoordinación temblorosa, convulsiones transitorias, pupilas de Argyll Robertson y demencia progresiva provocada por la degeneración de las neuronas corticales.

Polisacárido: Carbohidrato que contiene tres o más moléculas de carbohidratos simples. Las dextrinas, almidones, glucógenos y pentosas son ejemplos de polisacáridos.

Rhizopus: género de hongos que incluye algunas especies identificadas como causa de zigomicosis en seres humanos.

Somnolencia: Nivel de consciencia disminuido caracterizado por deseo de dormir y dificultad para permanecer alerta. Puede ser causado por falta de sueño, medicamentos, abuso de sustancias o trastorno cerebral.

Tetraplejía: Trastorno caracterizado por la parálisis de los brazos, de las piernas y del tronco por debajo del nivel de la lesión asociada de la médula espinal. Puede estar ocasionado por una lesión de la médula espinal, especialmente en la zona comprendida entre la quinta y la séptima vértebras cervicales.

Ureasa: enzima utilizada en la determinación de la urea en la sangre o la orina. 2. enzima que cataliza la hidrólisis de la urea a dióxido de carbono y amoniacó. 3. enzima antitumoral.

Virulencia: Capacidad de un microorganismo para producir enfermedad.

Xantina: Producto derivado del nitrógeno en el metabolismo de las nucleoproteínas. Se encuentra normalmente en el músculo, hígado, bazo, páncreas y orina.

RESUMEN

Se han realizado trabajos de investigación en diversos lugares, con diferentes climas y vegetación que pudiera servir como medio de cultivo, pero la realidad es que ha sido en el sur del continente principalmente (Colombia, Venezuela, Brasil y Perú), pero no en México.

Sin embargo, es un buen momento para iniciar este tipo de investigaciones en México en este caso en la Comarca Lagunera de Torreón Coahuila; antes de que presentemos niveles importantes de Cryptococosis en general, y no lo podamos controlar en el futuro.

Dado que existen muy pocas investigaciones en el campo de la Micología Veterinaria a nivel general, surgió el interés por realizar el presente trabajo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro UL, específicamente en los edificios de Biblioteca, Laboratorio de Anatomía, Centro de Investigación en Reproducción Caprina (CIRCA) y Comedor Universitario.

Se colocaron 5 g de excretas de palomas en un frasco de vidrio con 20 ml de solución salina fisiológica con: 0.25 ml de cloranfenicol y 0.2 ml de estreptomina, dejándolas reposar por 10 minutos para posteriormente centrifugarlas a 2500 rpm durante 5 minutos.

Se depositaron 0.5 ml en cajas de Petri con medios de cultivo y se colocaron en la incubadora a 35.3°C por un periodo de 5 días.

Posteriormente se procedió a identificar las colonias que habían crecido para determinar si se trató de *Cryptococcus neoformans spp.*

Se resembraron y/o aislaron las colonias sospechosas y se identificaron a través de la técnica en fresco con solución fisiológica salina.

Las colonias se observaron con el esteroscopio y las lamillas preparadas con las técnicas en fresco en el microscopio, primero a 10 aumentos y después a 40.

Se determinó la presencia de la levadura *Cryptococcus spp.* en las excretas de palomas (*Columba livia*) en instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, así como la frecuencia en heces expuestas y no a la radiación solar.

Palabras Clave: *Criptococosis*, *Cryptococcus spp*, Palomas (*Columba livia*), Heces de palomas.

I INTRODUCCIÓN

La criptococosis es una micosis sistémica producida por un hongo levaduriforme encapsulado denominado *Cryptococcus neoformans*, descubierto hace aproximadamente cien años por Sanfelice, quien aisló originalmente el microorganismo de un jugo de melocotón (Sorrell, 2001).

En 1895 Sanfelice aisló *Cryptococcus neoformans* de nódulos linfáticos de bovino, Villemín en 1901 lo halló en pulmón de porcino y Frothingham en 1902 describió la Criptococosis en un caballo. En 1951 Curtis realizó el primer aislamiento en felinos y Holzworth en 1952, en afecciones respiratorias y pulmonares. En 1953 Seibold demostró el primer caso en perros. Desde entonces la enfermedad se ha reportado en forma esporádica. Al año siguiente en 1954 Seibold reprodujo la enfermedad en animales de experimentación y llamó a este hongo *Saccharomyces neoformans* (Baro, 1999).

Por otro lado, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* ha sido asociado históricamente con excrementos de paloma y otras aves, siendo aislado de estas deyecciones al igual que del suelo contaminado con las mismas (Barreto de Oliveira, 2004).

Se ha descrito que *Cryptococcus* utiliza la creatinina presente en estas deyecciones en sus procesos biológicos. Las palomas con *Cryptococcus neoformans* en sus tractos intestinales pueden excretar la levadura durante varios meses sin desarrollar signos clínicos de la enfermedad. Esta variedad es la más comúnmente aislada de humanos y ha sido señalada como un patógeno

secundario en pacientes inmunocomprometidos (Sorrell, 2001; Barreto de Oliveira, 2004).

Cryptococcus neoformans var. *gattii* se ha aislado de algunas especies de árboles del género *Eucalyptus*, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de Australia y Sudamérica. Existen escasas publicaciones australianas sobre este tema, pero hay información de que en Ayacucho, entre 1996-1997 se realizaron aislamientos ambientales de esta levadura. La criptococosis es un proceso fúngico causado por levaduras ovals de 4-10 μm de diámetro, que se encuentran rodeadas por una gruesa cápsula gelatinosa. Este proceso, causado por *Cryptococcus neoformans*, se ha descrito principalmente en gatos, perros y caballos. Se desconoce la forma exacta por la que los *Cryptococcus* desencadenan la infección, ya que pueden detectarse en animales con una función inmunológica normal, aunque es más habitual que se desarrolle en animales inmunodeficientes (Baro, 1999; Pal, 1998).

El aparato respiratorio, especialmente el pulmón, es la principal vía de entrada y el punto a partir del cual se produce la diseminación sistémica. No obstante, también se han descrito infecciones cutáneas, nerviosas y oculares. *Cryptococcus neoformans* puede causar una respuesta granulomatosa, pero por lo general la inflamación es menos severa que la ocasionada por otros hongos. Para realizar el diagnóstico es necesario emplear técnicas citológicas o histológicas. Las características morfológicas de estos hongos (incluyendo la tinción positiva de su cápsula con mucicarmina) son suficientes para llevar a cabo el diagnóstico (Pal, 1998).

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.-Criptococosis

El término criptococosis se usa para referirse a una infección causada por un hongo encapsulado denominado *Cryptococcus neoformans*. Sin embargo, técnicamente podemos aplicar este nombre a infecciones causadas por otras especies del género. Esta micosis presenta desde el punto de vista epidemiológico una fuente de infección exógena, una vía de transmisión respiratoria, un foco primario pulmonar y una diseminación hematógena con tropismo hacia el sistema nervioso central (García-Hernoso, 2001; Litvintseva, 2005).

Desde el punto de vista etiológico se describen dos variedades de *Cryptococcus neoformans*: *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans* y *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii*. Cada una de estas variedades presenta dos serotipos, en la variedad *neoformans* los serotipos A y D, mientras que en la variedad *gattii*, los serotipos B y C. Se han reportado casos de infección humana producida por otras especies de *Cryptococcus*, como *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii* pero estos aislamientos deben ser confirmados. La fuente más importante en la naturaleza de *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans* son los nidos de palomas viejos secos y llenos de deyecciones y los suelos contaminados con este material. Sin embargo, no tenemos informes sobre brotes epidémicos de estas micosis asociados con lugares contaminados. La fuente de *Cryptococcus neoformans* en las deyecciones de palomas no ha sido identificada. Aparentemente las palomas no llegan a desarrollar la infección (Belay, 1996; García-Hernoso, 1999).

Cryptococcus neoformans variedad *gattii* a la fecha no ha sido aislado de deyecciones de palomas o del suelo. Su hábitat natural ha sido identificado en el *Eucalyptus camaldulensis*, conocido como el árbol de goma rojo de Australia (Halliday, 1999).

El hombre adquiere infección por inhalación de *Cryptococcus neoformans*. Las partículas infecciosas son células pequeñas no capsuladas diseminadas en el aire, provenientes de las deyecciones secas de pájaros, o basidiosporas provenientes de la forma perfecta de este hongo, *Filobasidiella neoformans*. La protección del hospedero contra *Cryptococcus neoformans* se basa en un eficiente funcionamiento del sistema inmunológico de células T (Gokulshankar, 2004; Saracli, 2006).

Las deficiencias en el funcionamiento normal de las células T constituye el factor predisponente más importante en esta micosis, presentando los pacientes las formas agudas progresivas y diseminadas de la enfermedad. La profunda deficiencia de este sistema que se presenta en los pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida los predispone a desarrollar una criptococosis diseminada (Barreto de Oliveira, 2004; Chee, 2005).

2.2.-Manifestaciones Clínicas

Las infecciones pulmonares leves o subclínicas son las formas más comunes de criptococosis, sin embargo, éstas son menos diagnosticadas que las meningitis porque frecuentemente pasan desapercibidas, ya que muchas veces son

asintomáticas. El principal órgano de choque es el sistema nervioso central, pero otros órganos también pueden ser afectados (Trilles, 2004).

2.2.1.-Criptococosis pulmonar

En individuos normales la criptococosis pulmonar es persistente. Los síntomas incluyen tos, leve dolor torácico, esputo mucoso, pérdida de peso, sudoración nocturna, febrícula y malestar general. Con mucha frecuencia no se presenta cuadro febril. En los pacientes inmunodeficientes la afección criptocócica de los pulmones tiende a consolidarse, con compromiso de las meninges por diseminación hematológica (Perfect, 2006; Vogel, 1969).

2.2.2.-Meningoencefalitis

La infección del encéfalo y de las meninges es la forma clínica más común en la criptococosis y constituye la mayor causa de muerte en esta enfermedad. Se presenta debido a la diseminación hematológica del microorganismo a partir del foco primario pulmonar. En los pacientes inmunodeprimidos, los síntomas y signos clínicos pasan muchas veces desapercibidos, siendo la cefalea bilateral y difusa el más frecuente (Steenbergen, 2000), aunque también pueden presentarse somnolencia y confusión, mientras que otros pueden ser náusea, vómito, rigidez de la nuca, visión borrosa o diplopía (Bovers, 2006; Cogliati, 2001).

2.2.3.-Criptococosis cutánea

Entre un 10 y 15% de los pacientes con criptococosis diseminada presentan lesiones cutáneas metastásicas, las cuales se observan como lesiones nodulares

solitarias o múltiples, ulceradas o abscedadas. Las lesiones están frecuentemente localizadas en la cabeza, pero pueden aparecer en el tronco y en las extremidades superiores (Severo, 2001).

2.2.4.- Criptococosis ocular

La criptococosis ocular incluye signos como pupiloedema, parálisis motora y corioretinitis. El edema pupilar se presenta en pacientes con meningoencefalitis como resultado del aumento de la presión intracraneana, mientras que la corioretinitis muchas veces precede a otras manifestaciones de una criptococosis diseminada.

2.3.-Procedimientos diagnósticos

Establecer el diagnóstico de criptococosis frecuentemente es menos difícil que diagnosticar otras infecciones micóticas. Para el diagnóstico son muy importantes los métodos de laboratorio (Stepanovic, 2002).

2.3.1.-Examen directo

Las células de *Cryptococcus neoformans* se pueden observar fácilmente en el líquido cefalorraquídeo (LCR), otros fluidos, o secreciones, usando preparaciones con tinta china, nigrosina o una suspensión proteica de plata que pone de manifiesto las cápsulas que caracterizan a este hongo (Baro, 1999).

2.3.2.-Aislamiento primario

La posibilidad de aislar *Cryptococcus neoformans* del LCR se incrementa si tenemos oportunidad de manejar diferentes muestras que deben ser centrifugadas

con el objeto de inocular el sedimento en las placas de cultivo. El aislamiento primario se lleva a cabo utilizando el medio de sabraud glucosado y otros medios como el agar bidens o agar *guizotia abisinica*, en los que la producción de feniloxidasas desarrolla colonias de color café, actuando como un medio selectivo. Se debe considerar que la gran mayoría de las cepas de *Cryptococcus neoformans* son sensibles a la cicloheximida, razón por la cual no debemos usar el medio de mycosel. Este organismo crece mejor a temperaturas entre 30° C y 35° C, manteniendo las placas en incubación hasta por tres semanas antes de proceder a descartarlas. *Cryptococcus neoformans* puede también ser aislado de sangre, esputo, orina, líquido prostático y otros tipos de muestras. Las variedades se diferencian usando el medio de canavanina-glicina azul de bromotimol (CBG) (Baroni, 2006; Nandhakumar, 2006).

2.3.3.-Pruebas serológicas

Los anticuerpos para *Cryptococcus neoformans* pueden ser detectados con frecuencia en pacientes con lesiones localizadas y al inicio de la enfermedad, pero raramente en pacientes con meningitis o cuadros diseminados que no han sido tratados, y en los que las pruebas para detectar antígenos son mucho más útiles. La prueba de aglutinación de látex para el antígeno capsular de *Cryptococcus neoformans*, es uno de los métodos más importantes en el diagnóstico de esta micosis. Suero, orina y desde luego LCR, pueden ser sometidos a la prueba (Colom, 2005).

2.3.4.- Aislamiento e identificación

El diagnóstico definitivo de *Cryptococcus neoformans* se consigue mediante el cultivo y aislamiento de las levaduras. Este aislamiento puede realizarse a partir de biopsias o aspirados de tejidos y ganglios, exudado nasal, LCR, orina y líquido sinovial. Cuando se realizan los cultivos a partir de muestras de la cavidad nasal, la interpretación de los resultados debe realizarse con precaución. En estudios realizados en Australia, se ha demostrado que el 14% de los perros y el 7% de los gatos son portadores asintomáticos de *C. neoformans*. Recientemente se ha descrito que también pueden ser portadores de *C. gattii*, aunque en un porcentaje menor (Castella, 2008).

Para el aislamiento de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, se recomienda utilizar el agar glucosado de sabouraud o el agar sangre, aunque ambas especies pueden crecer en la mayoría de los medios de cultivo. Si se procesan muestras de zonas estériles, tales como LCR o líquido sinovial, no se recomienda adicionar antibiótico al medio de cultivo, porque podría inhibir el crecimiento de algunas cepas. Nunca debe emplearse un medio con cicloheximida, ya que inhibe el crecimiento de las especies de *Cryptococcus* (Kaufmann, 1982).

El cultivo de *Cryptococcus neoformans* debe incubarse entre 25° C y 35° C. Tras 36-72 horas de incubación aparecen colonias de color blanco crema y muy brillantes por la formación de cápsula. Generalmente, las colonias de *Cryptococcus gattii* son más mucosas que las de *C. neoformans*. Para la identificación de la levadura deben tenerse en cuenta características morfológicas como la presencia de cápsula y un cuello de gemación estrecho, así como

características bioquímicas, tales como su capacidad para hidrolizar la urea y de reducir los nitratos a nitritos. También es útil la detección de la enzima fenol-oxidasa empleando un medio de agar con semillas de negrillo (*guizotia abyssinica*) y el medio de TOC (*Tween Oxygall Cafeic*) (Taylor, 2002; Wright, 2004).

Para la diferenciación entre *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* suele utilizarse el medio en agar CGB (L-canavanina-glicina-azul de bromotimol), basado en la utilización de la D-glicina como única fuente de carbono y la tolerancia a la L-canavanina, siendo también útil la prueba de la asimilación de D-prolina y D-triptófano como únicas fuentes de nitrógeno (Castella, 2008; Edberg, 1980).

2.4.-Tratamiento

Todos los pacientes con criptococosis, con excepción de algunos pocos que presentan lesiones fibrosas y calcificadas en pulmón (criptococomas), deben ser tratados (Kobayashi, 2005).

2.4.1.-Criptococosis pulmonar

Los pacientes que presentan algún grado de inmunodeficiencia deben ser tratados para evitar en lo posible el progreso o la diseminación de la enfermedad. Podemos usar anfotericina B o un compuesto azólico en particular fluconazol como tratamiento de principal opción. En todos aquellos pacientes en donde se sospeche, o se haya confirmado la micosis, deben ser investigados los signos de diseminación. Adicionalmente al examen clínico, se debe poner especial atención a las funciones del sistema nervioso central y hacer palpación para determinar una

posible hepato- esplenomegalia o lesiones dérmicas. LCR, sangre, orina y líquido prostático deben ser cultivados (Taylor 2002; Kobayashi, 2005).

2.4.2.-Meningitis e infección diseminada

Los pacientes que presentan meningoencefalitis deben ser investigados por signos de criptococosis diseminada. Adicionalmente al examen físico, los exámenes de laboratorio en sangre, orina y líquido prostático, deben ser repetidos a intervalos regulares hasta que el paciente se recupere (Bovers, 2006; García-Hermoso, 1997).

2.5.-Criptococosis en animales domésticos

La criptococosis es una micosis sistémica poco frecuente en los animales domésticos, con excepción de la aparición de brotes esporádicos en perros y gatos. La criptococosis en animales está causada por dos especies del género *Cryptococcus*: *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, hongos que en tejidos animales y en condiciones habituales de laboratorio presentan forma de levadura, con una cápsula de mucopolisacáridos que los caracteriza (Duncan, 2005).

El agente etiológico más frecuentemente aislado es *Cryptococcus neoformans*, aunque también *Cryptococcus gattii* ha sido aislado de distintas especies animales. Estos dos agentes tienen nichos ecológicos diferentes. *Cryptococcus neoformans* presenta una distribución mundial, aislándose habitualmente de las excreciones de palomas y otras aves, mientras que *C. gattii* se localiza en zonas

con clima tropical/subtropical, aislándose principalmente de materia vegetal de algunas especies de árboles (Jain, 2006).

La criptococosis se ha asociado con una gran variedad de animales domésticos y a diferencia de otras micosis sistémicas, es más frecuente en el gato que en el perro y otras especies animales. La infección se origina en la cavidad nasal, tras la inhalación de la levadura. En el gato y en el perro suele diseminarse al sistema respiratorio y al sistema nervioso central, como se comentará más adelante (Castella, 2008; Duncan, 2006).

En los animales domésticos como caballos, ovejas y cabras, la criptococosis suele afectar al sistema respiratorio, mientras que en las vacas suele ser una micosis localizada a nivel de la glándula mamaria. También se han descrito casos en animales salvajes como koalas, anacondas, hurones, marsopas y llamas, con manifestaciones clínicas muy variadas, predominantemente con afectación pulmonar y del sistema nervioso central (Riley, 1992).

Existen pocos casos descritos de criptococosis en aves. Clásicamente, las aves se suponen resistentes a la infección debido a su elevada temperatura corporal (41-43° C) que impide el desarrollo de la levadura. No obstante, en 1995 se describió un caso de criptococosis en un kiwi, un ave nocturna no voladora con una temperatura corporal más baja que el resto de aves. Precisamente su baja temperatura corporal, próxima a la de los mamíferos, explicaría su susceptibilidad a la infección por *Cryptococcus* (Pal, 1998; Malik, 2003).

2.5.1.-Criptococosis felina

La criptococosis es la micosis sistémica más frecuente en el gato, aunque su incidencia es baja. En un estudio sobre las micosis profundas en gatos en Estados Unidos, la criptococosis fue la micosis más frecuente, afectando al 0,044% de la población felina incluida en el estudio. Los gatos son especialmente susceptibles a la infección por *Cryptococcus neoformans* y en menor proporción por *Cryptococcus gattii*. En estudios realizados en Australia, en el 75% de los casos de criptococosis en perros y gatos se aisló *C. neoformans* como agente etiológico, mientras que en el 25% restante se aisló *C. gattii* (Malik, 1995).

No se ha descrito ninguna predisposición de edad, sexo o raza, aunque en algunos estudios apuntan que esta enfermedad es más frecuente en gatos machos de dos a tres años de edad y de raza siamesa (Malik, 1992).

Se mencionan algunos factores predisponentes tales como una infección previa por el Virus de la Leucemia Felina (FeLV) o por el Virus de la Inmunodeficiencia Felina (FIV), pero algunos autores indican que la prevalencia de infecciones por FIV/FeLV en gatos con criptococosis es similar a la de la población felina general, aquellos que no se presentan inmunodeprimidos. Si bien no está claro el papel de estas enfermedades en la criptococosis, sí pueden influir en la severidad y el pronóstico de la misma. Los gatos con FeLV o FIV suelen tener una afectación más generalizada y frecuentemente desarrollan sintomatología neurológica y ocular. Otros factores predisponentes son las neoplasias, la diabetes, intervenciones quirúrgicas y tratamientos con glucocorticoides (Flatland, 1996).

La vía de infección más frecuente es la inhalatoria, afectando inicialmente las vías respiratorias altas, principalmente la cavidad nasal. En la mayoría de gatos (50-

80%) la sintomatología más frecuente es la rinitis, con descarga nasal abundante unilateral o bilateral. Los síntomas suelen ser crónicos y en el 70% de los casos la cavidad nasal puede llegar a deformarse por la presencia de granulomas. También puede verse afectada la nasofaringe, produciendo estertores, disnea inspiratoria y tendencia a respirar con la boca abierta. Es frecuente un aumento del tamaño de los ganglios mandibulares y no suele aparecer sintomatología del tracto respiratorio inferior ni fiebre (Kluger, 2006).

La infección puede diseminarse al tejido subcutáneo paranasal. En un 20% de los gatos, la infección se disemina a través del plato cribiforme desde el tracto respiratorio al sistema nervioso central. En estos casos aparecen síntomas neurológicos tales como depresión, ataxia e incoordinación, pudiendo incluso producirse alteraciones oculares, siendo los signos más comunes la ceguera periférica y la retinitis (Davies, 1996; Ren, 2006).

En los casos más avanzados de criptococosis, pueden aparecer lesiones cutáneas (40-50%), que suelen afectar a la cara, cabeza y cuello, siendo estas lesiones, secundarias a una infección del plano nasal. Si se produce una diseminación vía hematogena, es frecuente la aparición de lesiones cutáneas multifocales y el aumento de uno o varios ganglios linfáticos periféricos (Malik, 1995; O'Brien, 2006).

2.5.2.- Criptococosis canina

La criptococosis canina suele afectar a perros de menos de cuatro años. No existe ninguna predisposición de sexo pero sí de raza, siendo más frecuente en el Dóberman, Pinscher, Pastor Alemán, Cocker Spaniel Americano, Gran Danés y Labrador. Se cree que el pastor alemán tiene predisposición genética que lo hace

susceptible no sólo a la criptococosis, sino también a otras micosis sistémicas como la aspergilosis (Malik, 1995).

En los perros, la vía de infección también es la inhalatoria. Generalmente el 50% de los perros suele presentar afectación de las vías respiratorias altas, pero la rinosinusitis suele ser subclínica y, por lo tanto, la sintomatología respiratoria suele pasar desapercibida (Duncan, 2005).

La diseminación multiorgánica es más frecuente en perros que en gatos. La criptococosis se disemina rápidamente al sistema nervioso central, por lo que la sintomatología nerviosa es frecuente (50-80% de perros). Los síntomas neurológicos son multifocales, causados por una meningitis y una progresiva meningoencefalomielitis, e incluyen entre otros, inclinación de la cabeza, nistagmos, parálisis facial, paresia, paraplejia o tetraplejia y ataxia. También suelen aparecer alteraciones oculares (20-40% de perros) que consisten en neuritis óptica, corioretinitis exudativa granulomatosa y hemorragia de retina asociada a pupilas dilatadas y ceguera. Además, pueden aparecer también lesiones cutáneas en el 10-20% de los perros, y al igual que en los gatos, es un marcador de diseminación hematogena. Algunos perros pueden presentar fiebre (Duncan, 2005; O'Brien, 2006).

2.6.-Epidemiología

Las especies de criptococos se hallan habitualmente formando parte de la micota ambiental. Se los ha aislado de numerosas fuentes y especialmente se los encuentra en suelos que contienen materia fecal de aves, debido a su capacidad de utilizar como fuente de nitrógeno la creatinina contenida en este tipo de excrementos. Debemos destacar, que si bien no existe evidencia de transmisión

directa entre animales y de los animales al hombre o viceversa, tanto el hombre como los animales se infectan de la misma fuente a través de la inhalación de aire contaminado. La puerta de entrada habitual la constituye la vía respiratoria. Se han citado también la vía percutánea y digestiva. El criptococo se halla en las secreciones y excreciones de animales enfermos (Escandón, 2005; Rosario, 2005).

2.7.-Tratamiento para animales

La principal mecanismo de acción de la anfotericina B es dañar la membrana de las células fungales, inhibiendo la síntesis de ergosterol, debe administrarse intravenosa o intraarticularmente porque no se absorbe por vía oral. Los imidazoles (ketoconazol, miconazol y clotrimazol) también pueden ser utilizados como terapia. Actúan a nivel de la membrana celular (ergosterol) y causan pérdida de cationes, aminoácidos y proteínas citoplasmáticas (Calvo, 2001; Tay, 2006).

2.8.-Etiología

2.8.1.-*Cryptococcus neoformans*

El género *Cryptococcus* está integrado por levaduras caracterizadas por ser, en lo general, sensibles a la actidiona, redondas y ocasionalmente ovaladas, capsuladas, y con pocas excepciones, no formadoras de pseudomicelio. Existen alrededor de 20 especies conocidas, pertenecientes al género *Cryptococcus*; sin embargo, aunque han sido registrados casos raros provocados por *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii*, por lo general, el agente etiológico de todos los casos de criptococosis humana es *Cryptococcus neoformans* (Baro, 1999).

2.8.2.-Taxonomía del estado anamorfo

Al *Cryptococcus neoformans* se le ha dividido en dos variedades, *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans* y *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii*. La reproducción asexual en *Cryptococcus neoformans* representa el estado anamórfico, el cual está caracterizado por la producción de células levaduriformes gemantes (propágulos asexuales), que típicamente desarrollan una gran cápsula compuesta por polisacáridos. Sobre la base de los determinantes antigénicos de la capsula polisacárida, han sido reconocidos principalmente cuatro serotipos: A, B, C, y D, y un quinto serotipo, el AD, que aparentemente corresponde a una mezcla entre los serotipos A y D.

En *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans*, se han integrado los serotipos A, D y AD, los que comparten características bioquímicas, epidemiológicas y clínicas, diferentes al par de serotipos B/C, integrantes de *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii*. Sin embargo, análisis recientes de la secuencia del gene URA5 y patrones obtenidos por DNA, sugieren diferencias significativas entre los serotipos A y D, por lo que si se reconocieran esas diferencias genotípicas se propone que el taxón *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans* este restringido a aislados del serotipo D y describir una nueva variedad, *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii* para aislado serotipo A. Además, en materia evolutiva, utilizando el análisis de la secuencia de nucleótidos del gene CAP59, se ha establecido que existe un 90% de similitud en las secuencias de los cinco serotipos, dividiendo filogenéticamente a *Cryptococcus neoformans* en tres grupos: el primero, integrado por los serotipos A y AD,

(revelando de esta forma que el serotipo AD está genéticamente más relacionado con el A que con el D); un segundo, conteniendo a los serotipos B y C (serotipos que mostraron gran similitud entre sí, lo cual indica que son genéticamente homogéneos y muy cercanamente relacionados) y el tercero, exclusivamente integrado por el serotipo D (Casali, 2003; Chaturvedi, 2000).

Finalmente, con el estudio de las secuencias de RNA, se ha determinado que los serotipos B y C tienen secuencias idénticas mientras que las de A y D son diferentes, por lo que, haciendo las comparaciones pertinentes, se ha concluido que, el serotipo D es más cercano al B/C que al A (Campbell, 2005; Campbell, 2006).

2.8.3.-Teleomorfos

El teleomorfo, estado sexual del hongo, esta caracterizado por la producción de *basidiosporas* (propágulos sexuales). *Filobasidiella neoformans* corresponde al teleomorfo de la variedad *neoformans* y *F. bacillispora*, lo es de *C. neoformans* variedad *gattii* como se muestra en el cuadro 1. El género *Filobasidiella* es un miembro de los *basidiomicetos*, con dos tipos sexuales: caracterizado por tener el micelio hialino, que consiste en hifas dicarióticas con conexiones en pinza y un basidio alargado, portando *basidiosporas* sésiles y en cadena y/o gemación basípeta (Latouche, 2002).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Cryptococcus neoformans* var. *spp.*

Clasificación taxonómica	Fase anamorfa	Fase teleomorfa
Phylum	<i>Deuteromycetes</i>	<i>Basidiomycota</i>
Orden	<i>Cryptococcales</i>	<i>Filobasidiales</i>
Familia	<i>Cryptococcaceae</i>	<i>Filobasidiaceae</i>
Género	<i>Cryptococcus</i>	<i>Filobasidiella</i>
Especie	<i>neoformans</i>	<i>neoformans</i>
Variedad	<i>Neoformans</i> o <i>gattii</i>	<i>Neoformans</i> o <i>bacillispora</i>

La diferencia más notable entre *Filobasidiella neoformans* y *Filobasidiella bacillispora*, está en el tamaño y forma de las basidiosporas. *F. neoformans* tiene basidiosporas ligeramente rugosas, de 1.8 a 2.5 μm de diámetro y con forma de poco globosas a elípticas; mientras que *F. bacillispora* tiene basidiosporas lisas, angostas, de 1 a 1.5 x 3 a 8 μm , en forma de bastón con o sin curvatura. Hasta el momento, la forma sexual solo se ha obtenido *in vitro*, aunque existen reportes de que, algunas formas “basidiales” han sido observadas a partir de material vegetal de árboles de eucalipto (Lacaz Cda, 2002).

2.9.-Fuentes naturales y distribución geográfica

C. neoformans variedad *neoformans* (serotipos A y D) tiene una amplia distribución mundial. Ha sido aislado a partir de varias fuentes naturales (tubérculos vegetales, frutas, jugos de frutas, madera, productos lácteos y suelo), pero es notoria su asociación con desechos aviarios (pericos, loros, canarios), especialmente con excrementos de paloma (Ruiz, 1981). Por otro lado, con base en los aislamientos ambientales de *C. neoformans* variedad *gattii* (serotipo B), se ha establecido que esta variedad tiene una asociación ecológica específica con

las especies de árboles de *Eucalyptus camaldulensis* y *E. tereticornis* (Currie, 1994; Rosario, 2008).

Se cree que la variedad *gattii*, ha sido exportada de Australia a varios países del mundo, por medio de semillas infectadas de *E. camaldulensis* conteniendo micelio dicariótico en latencia, puesto que la distribución geográfica del árbol coincide con la infección causada por dicha variedad (Krockenberger, 2002; Krockenberger, 2001). La variedad *gattii* ha sido aislada a partir de otras especies de eucaliptos, tales como *E. rudis* y *E. gomphocephala* (Filiu, 2002; Halliday, 2003), aunque también se ha asociado a excremento de koalas, pero esto se explica debido a que estos mamíferos se alimentan de retoños de *E. camaldulensis* (Krockenberger, 2002; Vilcins, 2002).

La asociación entre *C. neoformans* variedad *gattii* y el koala paraleliza con la bien conocida asociación entre *C. neoformans* variedad *neoformans* las palomas u otras aves domésticas, sin embargo, la diferencia es que el koala está geográficamente restringido, ocurre en número bajo y los excrementos no se acumulan debido a que se depositan en hábitats expuestos a la intemperie (Krockenberger, 2003), mientras que, las palomas tienen una amplia distribución mundial, ocurren en número alto, especialmente en áreas urbanas, y sus hábitos permiten grandes acumulaciones de heces infectadas en hábitats cubiertos. Hasta el momento, la fuente natural del serotipo C, es desconocida (Davel, 2003).

2.10.-Ecología y ciclo de vida

Se ha propuesto que *C. neoformans* puede ser un hongo semejante a un tizón o un hongo levaduriforme endo o epífito, el cual desarrolla una asociación biotrófica específica con una planta hospedera, las basidiosporas aéreas están presentes en el ambiente por períodos cortos de tiempo y son propágulos infecciosos para el humano y otros animales (Kidd, 2007).

Después de su diseminación, las basidiosporas pueden sintetizar material capsular y posteriormente transformarse en levaduras capsuladas; los criptococos en el suelo o los detritos vegetales expuestos a la intemperie, pueden permanecer viables por varios años. Los animales y aves que tienen una asociación con la planta hospedera pueden pasar los criptococos a través de su intestino y depositar levaduras capsuladas en sus heces; estos pueden acumularse en hábitats protegidos (cobertizos), los cuales podrían actuar como fuentes importantes para la dispersión de levaduras disecadas, las que también representan propágulos infecciosos (Fraser, 2003).

En el caso de la variedad *gattii*, se postula que las teleutosporas o micelio dicariótico 'hiberna' en los ovarios o anteridios de retoños desarrollados de *E. camaldulensis*. Con la floración de la planta hospedera, las estructuras germinan para producir basidiosporas, las cuales son liberadas en el ambiente. Las basidiosporas que quedan sobre el tejido meristemático de hospederos jóvenes, inician la formación del micelio dicariótico por conjugación de esporas compatibles, lo cual conduce a la infección del tejido. Las basidiosporas que no permanecen

sobre tejidos hospederos susceptibles, sintetizan material capsular y pueden posteriormente transformarse en levaduras capsuladas (Baro, 1999).

Es bien conocido que los criptococos son rápidamente eliminados del ambiente y de los detritos infectados por la acción de la intemperie, especialmente por los rayos solares y microorganismos tales como bacterias y amibas, pero los criptococos acumulados en cobertizos pueden permanecer viables durante largos periodos de tiempo. En concordancia, el hábitat natural de la variedad *neoformans* es también una planta. Se cree que el hábitat natural de *C. neoformans* variedad *neoformans* es más semejante a hierbas o cereales comunes, con los cuales las aves, especialmente las palomas, se alimentan. Estudios posteriores acerca de la interacción hospedero – parásito están en progreso para determinar donde ocurre la formación de los elementos hifales dicarióticos y basidios del hongo en los árboles hospederos. Finalmente, es necesario mencionar que tanto las basidiosporas como las levaduras, son células haploides, pero las levaduras son las únicas unidades vegetativas que crecen rápidamente sobre medios artificiales (Quintero, 2005).

2.11.-Características Bioquímicas

C. neoformans comparte con el resto de los miembros del género las siguientes características: son levaduras ureasa positivas, no reductoras de nitratos a nitritos, no fermentadoras de azúcares, pero es la única especie que crece bien a 37° C, y que, cuando crece sobre substratos que contienen compuestos di u orto polifénolicos, produce un pigmento parecido a la melanina. La enzima responsable

de la formación del pigmento ha sido denominada como laccasa, encontrándose como parte constitutiva unida a la membrana celular. La capacidad de formar melanina es una característica que ha sido ampliamente usada como prueba selectiva para identificar el hongo en el laboratorio (Vidotto, 2004).

Una característica que diferencia las cepas de *C. neoformans* patógenas de las no patógenas y otras especies de *Cryptococcus*, es su habilidad para formar un pigmento marrón o negro (melanina) a partir de componentes difenólicos. Este proceso llamado melanogénesis puede realizarse *in vitro* como una prueba adicional en la identificación de este hongo. La producción de melanina mediante la prueba de la L – DOPA - citrato férrico, es realizada por la enzima difenoloxidasasa (laccasa) que por oxidación convierte las catecolaminas (difenoles) tales como la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) en dopaquinona, siendo este el paso limitante; puesto que, presumiblemente, los siguientes pasos en la vía, tales como el rearreglo de dopaquinona a dopacromo y finalmente la autopolimerización a melaninas, son espontáneos. La asociación del fenotipo melanina y la virulencia del *C. neoformans*, ha sido reportada por diversos estudios que sustentan la hipótesis que el sistema fenoloxidasasa cataliza la producción de pigmentos como la melanina, que protege al hongo frente a los oxidantes generados por las células efectoras del hospedador. Mediante estudios con microscopía de transmisión electrónica, se determinó que la melanina de *C. neoformans* parece estar concentrada en el lado interno de la pared celular, localización que le permitiría interactuar con sustancias del lado extracelular y prevenir su penetración dentro de la levadura (Canelo, 2000).

Por otro lado, para poder hacer la diferenciación entre las dos variedades de *C. neoformans* se puede llevar a cabo cualquiera de las siguientes pruebas: 1. Desarrollo en agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (la variedad *gattii* es la única que crece en este medio); 2. Asimilación de D-prolina como única fuente de carbono (solo la variedad *gattii* se desarrolla en este medio) y; 3. Producción de ureasa posterior al crecimiento en un medio gelante (exclusivamente las ureasas de variedad *neoformans* continúan con actividad) (Canelo, 1999; Racicot, 1985).

2.12.-Factores de virulencia

Al igual que en otros hongos, son varios los procesos fisiológicos fúngicos que podrían figurar como factores de virulencia. En *C. neoformans* las características que más se han estudiado como factores de virulencia son la presencia de la capsula polisacárida y la producción de melanina. Otros parámetros que pudiesen estar relacionados con la patogenicidad de este hongo son: 1. El tipo sexual; 2. La biosíntesis de adenina; 3. La producción de manitol y; 4 La presencia de myristoil-transferas (Hernández, 2003).

2.13.-Características generales y medios de cultivo

Los *Cryptococcus* son levaduras redondas u ovals (3,5-8 μm), que 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 cápsula de naturaleza polisacaroídica que les confiere virulencia, protegiendo al hongo de la fagocitosis, y cuyo tamaño varía dependiendo de la cepa y del medio de cultivo que se utilice para aislar la levadura. Se pueden

observar por examen en fresco con tinta china, tinción negativa que tiñe toda la preparación excepto la cápsula (Baró, 1999; Quintero, 2005).

El *Cryptococcus* crece muy bien en todos los medios de cultivo, formando colonias mucosas, aunque con el tiempo pueden aparecer secas; el color es muy variable (crema, ocre, rosa, amarillo), variando a tonos más oscuros con la edad. Tienen metabolismo aerobio, por lo que no son fermentadoras, producen ureasa y utilizan varios hidratos de carbono. Las distintas especies de criptococos se diferencian entre si por una serie de características: crecimiento a 37° C, asimilación de la sacarosa, lactosa, galactosa, melobiosa, celobiosa, rafinosa, trealosa y dulcitol, utilización de KNO₃ y producción de ureasa y feniloxidasas. *Cryptococcus neoformans*, forma células redondas parecidas a levaduras que se observan en la Figura 1, dentro del hospedero o en ciertos medios de cultivo, cada célula está rodeada por una gran cápsula de polisacáridos (Escandón, 2005).



Figura 1. *Cryptococcus neoformans* con su cápsula y diámetro que puede ir de los 2 a los 20 μm . Observación con tinta china.

El hongo crece con facilidad en el medio de sabouraud u otros medios sencillos, a temperaturas de 20 a 37°C, y forma colonias lisas color crema pálido, como lo podemos observar en la Figura 2; algunos medios de cultivo usados para aislar a los agentes de las tiñas contienen cicloheximida, que inhibe el crecimiento de *C.neoformans*. Además, casi siempre crece a 37°C, desdobra la urea en 4 horas, no es fermentador, ni forma pseudofilamentos o son muy rudimentarios (Racicot, 1985)

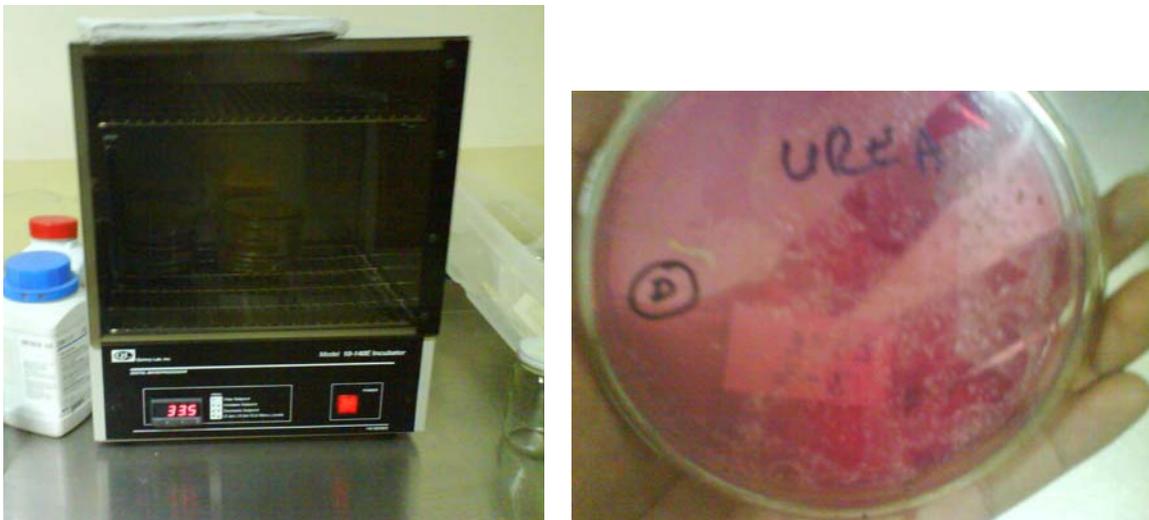


Figura 2. *Cryptococcus neoformans* en medio de Sabouraud a temperatura de 33.5°C, suele formar colonias cremosas, con pigmento amarillo y superficie lisa.

Hay cuatro serotipos de la cápsula del hongo, denominadas A, B, C y D. También hay dos formas de apareamiento sexual, que cuando se cultivan conjuntamente forman un estado diploide transitorio llamado *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* para los serotipos A y D, y *Filobasidiella neoformans*, var. *bacilliospora* para los serotipos B y C.

Los microorganismos que no se cultivan en condiciones de apareamiento se denominan *C. neoformans* var. *neoformans* para los serotipos A y D, y *C.*

neoformans var. *gattii* como se muestran en la Figura. 3; para los serotipos B y C; un medio simple y coloreado de color marrón distingue estas dos variedades (Baro, 1999).

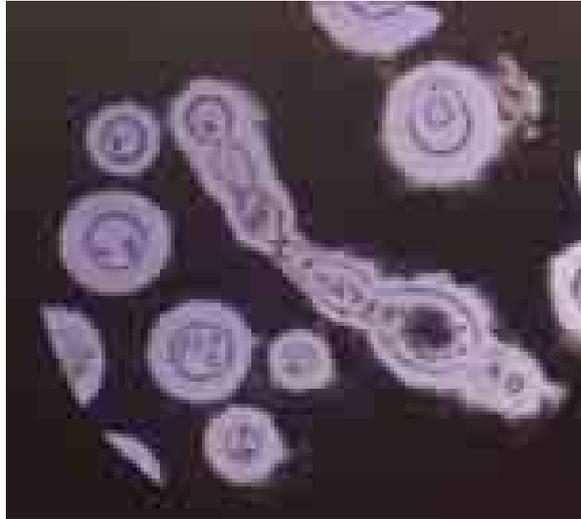


Figura 3. *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii* con formas de yemas y células ovaladas largas.

III HIPÓTESIS

Cryptococcus spp. se encuentra en las excretas de paloma (*Columba livia*) recuperadas en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, y su frecuencia y distribución dependen de la exposición de las heces a la radiación solar.

IV OBJETIVOS

4.1.-Objetivos

Determinar la presencia de la levadura *Cryptococcus spp.* en las excretas de palomas (*Columba livia*) en instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, así como la frecuencia en heces expuestas y no a la radiación solar.

Estimar, con base en la frecuencia de observación de la levadura en las heces recuperadas y la presencia de aparatos de ventilación forzada en el sitio, el grado de riesgo que por diseminación aérea representa en la Salud Pública y en el campo de la Medicina Veterinaria la levadura *Cryptococcus spp.*

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.-Localización y área de estudio

El muestreo se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, específicamente en las áreas de Biblioteca, Comedor, Centro de Investigación de la Reproducción Caprina (CIRCA) y Laboratorio de Anatomía.

La UAAAN Unidad Laguna, se encuentra ubicada en el predio de San Antonio de los Bravos, en la ciudad de Torreón, Coah., México, en el corazón de la Comarca Lagunera, sobre el periférico que conduce a Gómez Palacio, Dgo., y carretera a Santa Fe. Cuenta con una superficie de 37 ha y geográficamente esta ubicada en Latitud Norte 25° 33' 21.04'' y Longitud Oeste 103° 22' 25.43'' y 1124 m de elevación, como se puede observar en la Figura 4.



Figura 4. Localización de la Comarca Lagunera (INEGI, Carta Topográfica 150000, Matamoros G13D26, Coahuila y Durango, Edición 1999).

5.2.-Duración y recolección de muestras

El experimento tuvo una duración de siete meses, periodo comprendido de noviembre de 2008 a mayo de 2009, recolectándose 80 muestras por duplicado con 50g de excretas de palomas (*Columba livia*), encontradas en los techos y aparatos de aire de las instalaciones, con equipo personal como bata de laboratorio, gorro, cubre boca, guantes, gafas protectoras y durante la obtención de muestras, abatelenguas de madera, hisopos, papel encerado, frascos estériles para evitar la contaminación cruzada de las muestras, papel para envolver las muestras y protegerlas; cinta adhesiva y marcadores para identificarlas (número, lugar de recolección, fecha y ubicación). Las muestras fueron transportadas y almacenadas en el laboratorio a temperatura ambiente; posteriormente fueron analizadas.

5.2.1.-Lugar de recolección y distribución

En el edificio de la Biblioteca (Norte y Oeste), se identificaron 30 muestras para analizar cuatro medios de cultivo: Agar Dextrosa Papa, Sabouraud, Mycosel y Agar Papa Urea para determinar en cual crecían los hongos de interés para la investigación y así concluir la mejor opción para obtener resultados satisfactorios, en el cual el medio de cultivo no fuera un impedimento para obtenerlos.

- a) 12 muestras en todo el techo de biblioteca.
- b) 10 muestras en el techo del comedor.
- c) 16 muestras en el techo del Laboratorio de Anatomía.

d) 12 muestras en el suelo del Centro de Investigación de la Reproducción Caprina (CIRCA).

Como lo podemos observar en la siguiente Figura 5.

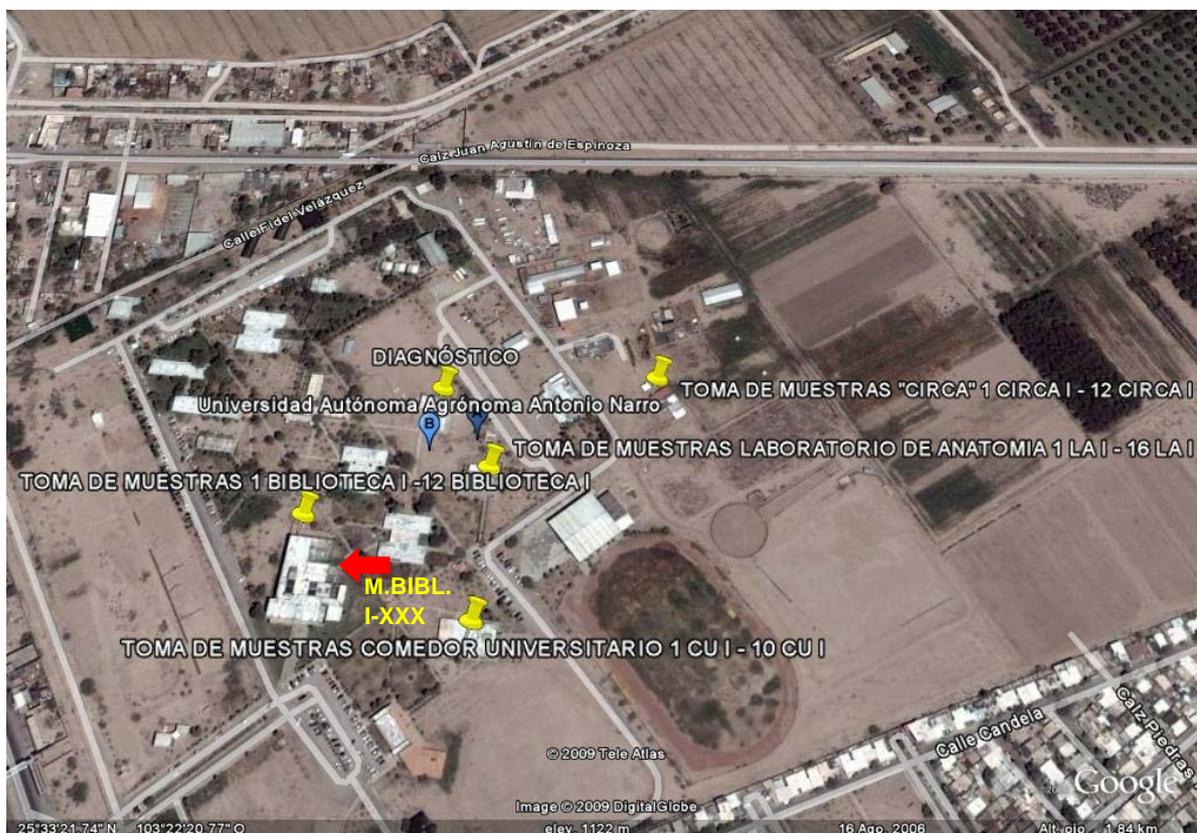


Figura 5. Localización de diversas áreas, de donde se tomaron las muestras en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna.

Uno de nuestros objetivos era determinar la prevalencia de *Cryptococcus spp.* para lo cual identificamos las muestras de acuerdo al lugar de donde fueron recolectadas tal como se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Localización y distribución de muestras

Sitio	Muestras		
	Número	Sol	Sombra
Biblioteca	42	20	22
Comedor	10	6	4
Laboratorio de anatomía	16	9	7
CIRCA	12	4	8

5.3.-Siembra, identificación y aislamiento

Se colocaron 5 g de excretas de palomas en un frasco de vidrio con 20 ml de solución salina fisiológica con: 0.25 ml de cloranfenicol y 0.2 ml de estreptomicina para inhibir el crecimiento de bacterias y para evitar la competencia con el crecimiento de hongos, dejándolas reposar por 10 minutos para posteriormente centrifugarlas a 2500 rpm durante 5 minutos y así obtener las excretas diluidas y obtener la muestra líquida.

Se depositaron 0.5 ml de la solución con una pipeta de 1 ml en cajas de Petri con medios de cultivo de Agar Dextrosa Papa, Sabouraud, Mycosel y Agar Papa Urea (previamente preparados y esterilizados), en el caso de las primeras 30 muestras de norte y oeste de biblioteca (total 120 cajas de Petri); por último se colocaron en la incubadora a 35.3°C por un periodo de 5 días.

Posteriormente se procedió a identificar las colonias que habían crecido y para identificar si se trató de *Cryptococcus neoformans* spp.

Se sembraron y/o aislaron las colonias sospechosas y se identificaron a través de la técnica en fresco con solución fisiológica salina.

Las colonias se observaron con el esteroscopio y las lamillas preparadas con las técnicas en fresco en el microscopio, primero a 10 aumentos y después a 40.

Las siguientes 12 muestras procesadas (biblioteca en toda la superficie del techo y aparatos de aire), fueron dobles en solo dos medios de cultivo en Agar Dextrosa Papa y Sabouraud reuniendo un total de 24 muestras; el proceso de siembra, aislamiento y identificación fue igual al anterior.

Por último las 10 muestras en el techo de biblioteca, 16 muestras en el techo del Laboratorio de Anatomía, 12 muestras en el suelo del Centro de Investigación de

la Reproducción Caprina (CIRCA), fueron sembradas en cada uno de los medios de Agar Dextrosa Papa, Sabouraud y Agar Papa Urea, obteniendo un total de 114 siembras como se observa en la Figura 6. El proceso de siembra, aislamiento e identificación fue igual a la primera técnica utilizada.



Figura 6. Métodos de preparación para sembrar las excretas de paloma (*Columba livia*), en Agar Dextrosa Papa y Sabouraud.

5.4.-Técnicas de Resiembra o Aislamiento

El total de siembras obtenidas fue de 258 de todas esas, se identificaron las colonias de *Cryptococcus neoformans* y se aislaron en cajas de Petri en tres diferentes medios Agar Dextrosa Papa, Sabouraud y Agar Papa Urea. Colocando una parte de la colonia, con el asa para sembrar hongos esterilizada con ayuda del mechero de bunsen e incubándolas a 35.3°C de 4-5 días, para identificarlas mediante las técnicas en fresco.

5.5.-Técnicas de identificación

5.5.1. -Frotis con tinta china para observar cápsulas

En una lámina portaobjeto colocar:

- Tinta china 1 gota
- Agua destilada o solución fisiológica 1 - 2 gotas
- Emulsificar la muestra.
- Colocar laminilla cubreobjeto.

Es un método de contraste. Permite visualizar la cápsula de polisacárido de *Cryptococcus neoformans*, mediante la presencia de un halo claro y nítido alrededor de la levadura.

5.5.2.-Prueba de la fenoloxidasa

Capacidad de *C. neoformans* de formar un pigmento marrón o negro, denominado melanina, a partir de compuestos difenólicos. La producción de este pigmento mediante la prueba de la L – dopa – citrato férrico, es realizada por la enzima fenoloxidasa. La reacción positiva se evidencia con la producción de un pigmento marrón oscuro o negro alrededor de la colonia de *C. neoformans*.

Procedimiento

- Inocular una a dos colonias de la levadura en estudio, sobre la superficie de cada cuadrado de papel Whatman N.º 1.
- Incubar en cámara húmeda a 28 °C de 3 a 18 h.
- Para la producción de un pigmento marrón o negro.

Interpretación

Positivo: *Cryptococcus neoformans*. **Negativo:** *Candida albicans*.

VI RESULTADOS

Durante el periodo de estudio se analizaron 80 muestras de deyecciones de palomas (*Columba livia*), recolectadas de diversas áreas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro UL como pisos, techos y aparatos de aire, de las que se hicieron un total de 258 siembras en los diferentes medios de cultivo, encontrando en 15 muestras levaduras de las cuales 10 correspondieron a *Cryptococcus neoformans var. spp.* y cinco a *Candida* tal como se muestra en la figura 7.

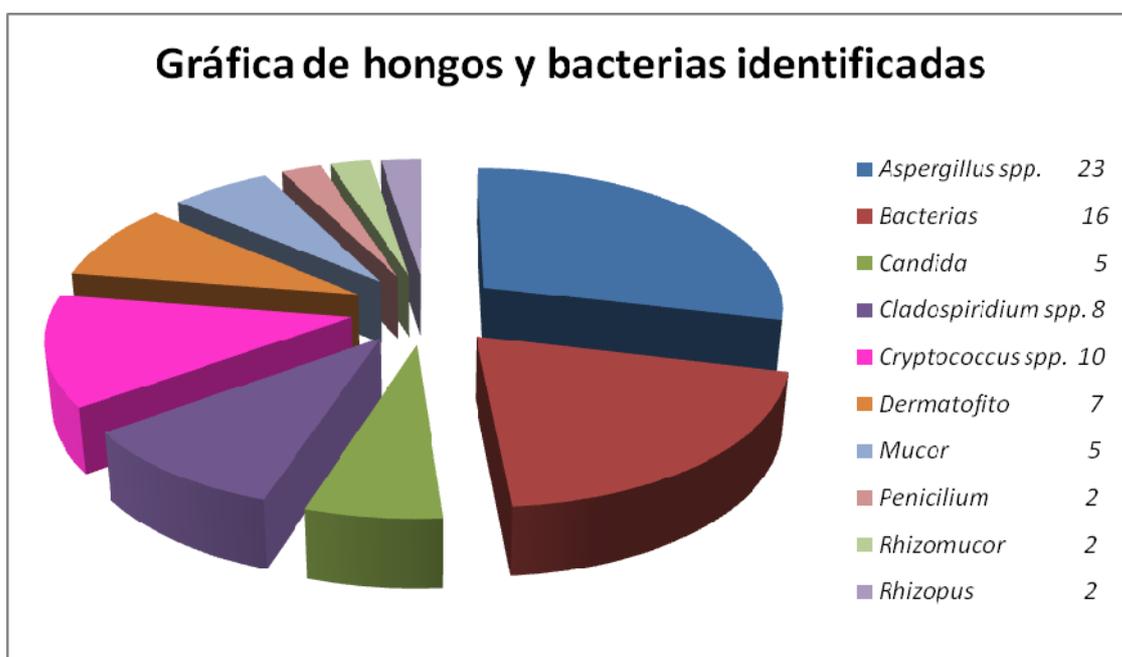


Figura 7. Frecuencia de los diversos microorganismos identificados en base a las 80 muestras analizadas.

Por lo tanto nos indica un porcentaje 12.5% de *Cryptococcus neoformans var. spp* en relación a las 80 muestras analizadas.

De las 10 muestras identificadas con *Cryptococcus neoformans var. spp.* tres (30%) fueron encontradas en áreas de biblioteca, tres (30%) en Centro de Investigación para la Reproducción Caprina (CIRCA), dos (20%) en el comedor universitario y dos (20%) más en el laboratorio de anatomía como se aprecia en la figura 8.

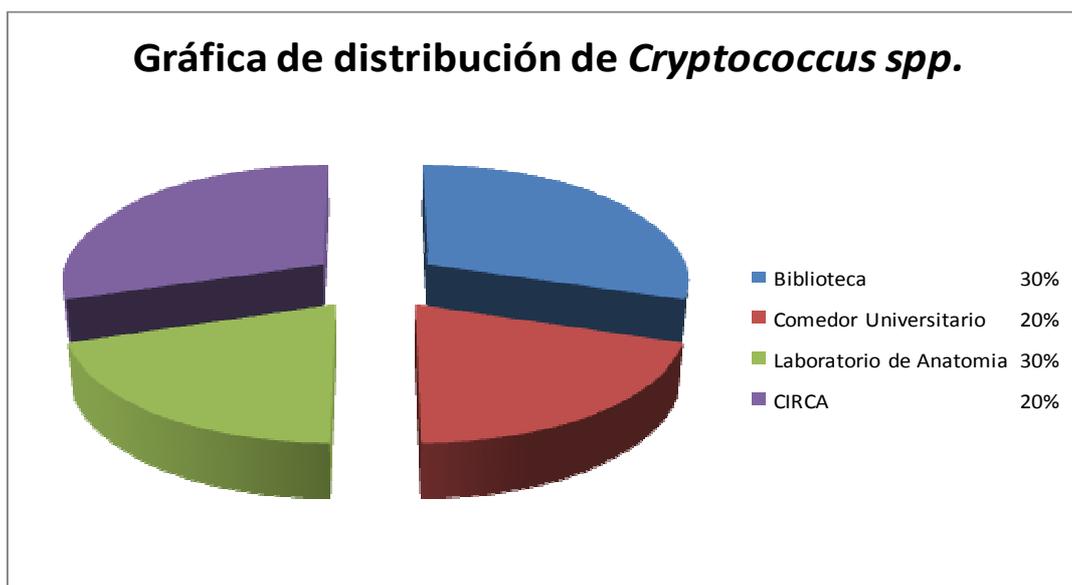


Figura 8. Distribución de *Cryptococcus spp.* en diversas áreas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro UL.

Una vez obtenidas las 10 muestras positivas, fue necesario calcular la prevalencia de *Cryptococcus spp.* tal como se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 3. Número de muestras positivas y porcentaje de prevalencia

Sitio	Muestras		Prevalencia
	Número	Positivos	
Biblioteca	42	3	7.14 %
Comedor	10	2	20.00 %
Laboratorio	16	2	12.50 %
CIRCA	12	3	25.00 %

Después de haber calculado la prevalencia en términos generales, fue necesario identificar la prevalencia, pero de acuerdo al número de positivos en sol y sombra, como podemos observarlo en el cuadro 4.

Cuadro 4. Muestras positivas y prevalencia al sol y sombra

Sitio	Número		Muestras Positivas		Prevalencia	
	Sol	Sombra	Sol	Sombra	Sol	Sombra
Biblioteca	20	22	1	2	2.38 %	4.76 %
Comedor	6	4	1	1	10.00 %	10.00 %
Laboratorio de anatomía	9	7	0	2	—	12.50 %
CIRCA	4	8	1	2	8.33 %	16.66 %

Durante el estudio se identificaron otro tipo de microorganismos que pueden ser de interés ante otras investigaciones, como podemos apreciarlos en el cuadro 5.

Cuadro 5. Registros de muestras analizadas e identificación de hongos

Muestra	Lugar	Localización	Identificado
1 BIBLIOTECA I	BIBLIOTECA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Aspergillus spp.</i>
2 BIBLIOTECA I	BIBLIOTECA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Aspergillus spp.</i>
3 BIBLIOTECA I	BIBLIOTECA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Rhizopus</i>
4 BIBLIOTECA I	BIBLIOTECA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Aspergillus spp.</i>
5 BIBLIOTECA I	BIBLIOTECA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Rhizomucor</i>
6 BIBLIOTECA I	BIBLIOTECA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Penicillium</i>
7 BIBLIOTECA I	BIBLIOTECA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Aspergillus spp.</i>
8 BIBLIOTECA I	BIBLIOTECA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Aspergillus spp.</i>
9 BIBLIOTECA I	BIBLIOTECA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Cryptococcus spp.</i>
10 BIBLIOTECA I	BIBLIOTECA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Cryptococcus spp.</i>
11 BIBLIOTECA I	BIBLIOTECA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Cryptococcus spp.</i>
12 BIBLIOTECA I	BIBLIOTECA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	Bacterias
1 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	Bacterias
2 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Mucor</i>

3 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Dermatofito</i>
4 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	Bacterias
5 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Candida</i>
6 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Aspergillus spp.</i>
7 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Aspergillus spp.</i>
8 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Aspergillus spp.</i>
9 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Cladosporidium</i>
10 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Aspergillus spp.</i>
11 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Cryptococcus spp.</i>
12 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Cryptococcus spp.</i>
13 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Candida</i>
14 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Candida</i>
15 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	Bacterias
16 LA I	LABORATORIO DE ANATOMIA	TECHO Y APARATOS DE AIRE	Bacterias
1 CU I	COMEDOR UNIVERSITARIO	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Cryptococcus spp.</i>
2 CU I	COMEDOR UNIVERSITARIO	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Mucor</i>
3 CU I	COMEDOR UNIVERSITARIO	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Candida</i>
4 CU I	COMEDOR UNIVERSITARIO	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Candida</i>
5 CU I	COMEDOR UNIVERSITARIO	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Cryptococcus spp.</i>
6 CU I	COMEDOR UNIVERSITARIO	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Aspergillus spp.</i>
7 CU I	COMEDOR UNIVERSITARIO	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Aspergillus spp.</i>
8 CU I	COMEDOR UNIVERSITARIO	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Aspergillus spp.</i>
9 CU I	COMEDOR UNIVERSITARIO	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Cladosporidium</i>
10 CU I	COMEDOR UNIVERSITARIO	TECHO Y APARATOS DE AIRE	<i>Cladosporidium</i>
1 CIRCA I	EXPERIMENTOS DE CIRCA	SUELO	<i>Mucor</i>
2 CIRCA I	EXPERIMENTOS DE CIRCA	SUELO	<i>Aspergillus</i>
3 CIRCA I	EXPERIMENTOS DE CIRCA	SUELO	<i>Aspergillus</i>
4 CIRCA I	EXPERIMENTOS DE CIRCA	SUELO	<i>Cryptococcus spp.</i>
5 CIRCA I	EXPERIMENTOS DE CIRCA	SUELO	<i>Cryptococcus spp.</i>
6 CIRCA I	EXPERIMENTOS DE CIRCA	SUELO	<i>Aspergillus</i>
7 CIRCA I	EXPERIMENTOS DE CIRCA	SUELO	<i>Rhizopus</i>
8 CIRCA I	EXPERIMENTOS DE CIRCA	SUELO	<i>Aspergillus</i>
9 CIRCA I	EXPERIMENTOS DE CIRCA	SUELO	<i>Rhizomucor</i>
10 CIRCA I	EXPERIMENTOS DE CIRCA	SUELO	<i>Penicillium</i>
11 CIRCA I	EXPERIMENTOS DE CIRCA	SUELO	Bacterias
12 CIRCA I	EXPERIMENTOS DE CIRCA	SUELO	<i>Cryptococcus spp.</i>

Últimas 30 Muestras Analizadas de diversas áreas de la biblioteca como suelo, escaleras, techo, aparatos de aire y tela protectora. Agrupadas en diferente registro por ser procesadas al último, para deducir si el clima influye sobre los resultados como se como se aprecia en el cuadro 6.

Cuadro 6. Últimos registros de muestras analizadas e identificación de hongos

MUESTRAS	LUGAR	IDENTIFICADO
1 NORTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA I	<i>Cladosporidium</i>
2 NORTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA II	<i>Cladosporidium</i>
3 NORTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA III	<i>Mucor</i>
4 NORTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA IV	Bacterias
5 NORTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA V	Bacterias
6 NORTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA VI	Bacterias
7 NORTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA VII	<i>Dermatofito</i>
8 NORTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA VIII	Bacterias
1 SUR	ÁREAS DE BIBLIOTECA IX	<i>Dermatofito</i>
2 SUR	ÁREAS DE BIBLIOTECA X	<i>Cladosporidium</i>
3 SUR	ÁREAS DE BIBLIOTECA XI	<i>Aspergillus spp.</i>
4 SUR	ÁREAS DE BIBLIOTECA XII	<i>Aspergillus spp.</i>
5 SUR	ÁREAS DE BIBLIOTECA XIII	<i>Aspergillus spp.</i>
6 SUR	ÁREAS DE BIBLIOTECA XIV	<i>Aspergillus spp.</i>
7 SUR	ÁREAS DE BIBLIOTECA XV	<i>Dermatofito</i>
8 SUR	ÁREAS DE BIBLIOTECA XVI	Bacterias
1 ESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XVII	Bacterias
2 ESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XVIII	Bacterias
3 ESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XIX	<i>Aspergillus spp.</i>
4 ESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XX	<i>Aspergillus spp.</i>
5 ESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XXI	<i>Mucor</i>
6 ESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XXII	<i>Dermatofito</i>
7 ESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XXIII	<i>Dermatofito</i>
1 OESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XXIV	<i>Aspergillus spp.</i>
2 OESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XXV	Bacterias
3 OESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XXVI	Bacterias
4 OESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XXVII	<i>Cladosporidium</i>
5 OESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XXVIII	<i>Cladosporidium</i>
6 OESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XXIX	<i>Dermatofito</i>
7 OESTE	ÁREAS DE BIBLIOTECA XXX	Bacterias

VII DISCUSIÓN

Como sabemos, existen estudios e investigaciones en *Cryptococcus neoformans spp.* y teniendo el conocimiento de que existe la presencia de una gran cantidad de palomas (*Columba livia*) y a sabiendas de que sus heces son un medio en el cual pueden persistir este tipo de hongos, aunado a las condiciones climáticas, tipo de instalaciones y a que la criptococosis es una enfermedad oportunista, es necesario analizar los resultados obtenidos, para determinar el riesgo que representa.

En biblioteca tenemos el 30% como resultado de la presencia de *Cryptococcus neoformans spp.*, Comedor Universitario el 20%, Laboratorio de Anatomía el 20%, Centro de Investigación para la Reproducción Caprina 30%, es importante mencionar que existen factores predisponentes como la presencia de una gran cantidad y variedades de especies animales, el humano mismo, las tolvaneras y presencia de heces en los aparatos de aire, no solo determinamos riesgos en los animales, también en los humanos (se han reportado casos de criptococosis en jóvenes sin que tengan sus sistema inmune deprimido). Las altas temperaturas de la Comarca Lagunera favorecen la eliminación de este tipo de microorganismos.

Se observó que los sitios (biblioteca, comedor universitario y laboratorio de anatomía), donde había una alta densidad de palomas se aisló *Cryptococcus neoformans var. spp.* con más frecuencia, quizá como un resultado directo de la mayor cantidad de excretas, que se pueden acumular en forma rápida y brindar al hongo las condiciones adecuadas para su crecimiento.

VIII CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos determinar lo siguiente:

- Este estudio corrobora la presencia de *Cryptococcus neoformans* var. *spp.* en heces de paloma (*Columba livia*).
- Se ha demostrado que hay una estrecha relación entre la paloma y la especie *Cryptococcus neoformans* variedad *spp.* y que esta es la portadora por excelencia de la levadura. No obstante, el hongo ha podido aislarse de otras muchas especies de aves. En cualquier caso, la mera presencia de las aves deben considerarse un riesgo sanitario. *Cryptococcus neoformans* es un saprofito del tubo digestivo de un buen número de especies aviarias, pero parece que son los excrementos de estos animales los que constituyen un hábitat importante para la levadura patógena. La elevada capacidad de supervivencia del microorganismo en estos sustratos, aún desecados e insolados, los convierte en potenciales fuentes de infección, aunque deben existir factores externos, que aún no conocemos bien, que influyen en la persistencia de *Cryptococcus* en este ambiente.
- Que el porcentaje de *Cryptococcus neoformans* *spp.* durante el periodo de estudio en las diversas áreas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro "UL" fue del 12.5%, con respecto a las 80 muestras representado un valor significativo, dado que son los primeros resultados obtenidos de la

universidad estos serán de gran ayuda en investigaciones futuras así poder realizar comparaciones e identificar variaciones.

- Es evidente que *Cryptococcus neoformans* spp. esta presente en la Universidad, solo que se ignoraba por falta de investigación y porque no se le ha prestado la importancia indicada a este tipo de microorganismos.

IX LITERATURA CITADA

- Baro, T., J. M. Torres-Rodriguez, et al. (1999). "Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain." J Clin Microbiol 37(4): 1170-2.
- Baroni Fde, A., C. R. Paula, et al. (2006). "Cryptococcus neoformans strains isolated from church towers in Rio de Janeiro City, RJ, Brazil." Rev Inst Med Trop Sao Paulo 48(2): 71-5.
- Barreto de Oliveira, M. T., T. Boekhout, et al. (2004). "Cryptococcus neoformans shows a remarkable genotypic diversity in Brazil." J Clin Microbiol 42(3): 1356-9.
- Belay, T., R. Cherniak, et al. (1996). "Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by dot enzyme assay." J Clin Microbiol 34(2): 466-70.
- Bovers, M., F. Hagen, et al. (2006). "Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*." FEMS Yeast Res 6(4): 599-607.
- Calvo, B. M., A. L. Colombo, et al. (2001). "Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela." J Clin Microbiol 39(6): 2348-50.
- Campbell, L. T. and D. A. Carter (2006). "Looking for sex in the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*." FEMS Yeast Res 6(4): 588-98.
- Campbell, L. T., J. A. Fraser, et al. (2005). "Clinical and environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Australia that retain sexual fecundity." Eukaryot Cell 4(8): 1410-9.
- Canelo, C., A. Navarro, et al. (1999). "Determinación de la Variedad de Cepas de *Cryptococcus neoformans* Aisladas en Pacientes con SIDA". Rev Med Exp XV (1-29):44-47.
- Casali, A. K., L. Goulart, et al. (2003). "Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul." FEMS Yeast Res 3(4): 405-15.
- Castella, G., M. L. Abarca, et al. (2008). "[Cryptococcosis and pets]." Rev Iberoam Micol 25(1): S19-24.
- Chaturvedi, S., B. Rodeghier, et al. (2000). "Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MAT α and MAT a pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies." J Clin Microbiol 38(5): 2007-9.
- Chee, H. Y. and K. B. Lee (2005). "Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from pigeon droppings in Seoul, Korea." J Microbiol 43(5): 469-72.

- Cogliati, M., M. C. Esposto, et al. (2001). "Origin of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* diploid strains." J Clin Microbiol **39**(11): 3889-94.
- Colom, M. F., S. Frases, et al. (2005). "First case of human cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Spain." J Clin Microbiol **43**(7): 3548-50.
- Currie, B. P., L. F. Freundlich, et al. (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): 1188-92.
- Davel, G., R. Abrantes, et al. (2003). "[1st environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Argentina]." Rev Argent Microbiol **35**(2): 110-2.
- Davies, C. and G. C. Troy (1996). "Deep mycotic infections in cats." J Am Anim Hosp Assoc **32**(5): 380-91.
- Duncan, C., C. Stephen, et al. (2005). "Follow-up study of dogs and cats with asymptomatic *Cryptococcus gattii* infection or nasal colonization." Med Mycol **43**(7): 663-6.
- Duncan, C., C. Stephen, et al. (2005). "Sub-clinical infection and asymptomatic carriage of *Cryptococcus gattii* in dogs and cats during an outbreak of cryptococcosis." Med Mycol **43**(6): 511-6.
- Duncan, C., C. Stephen, et al. (2006). "Clinical characteristics and predictors of mortality for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats of southwestern British Columbia." Can Vet J **47**(10): 993-8.
- Escandon, P., E. Quintero, et al. (2005). "[Isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B from detritus of Eucalyptus trees in Colombia]." Biomedica **25**(3): 390-7.
- Filiu, W. F., B. Wanke, et al. (2002). "[Avian habitats as sources of *Cryptococcus neoformans* in the city of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil]." Rev Soc Bras Med Trop **35**(6): 591-5.
- Flatland, B., R. T. Greene, et al. (1996). "Clinical and serologic evaluation of cats with cryptococcosis." J Am Vet Med Assoc **209**(6): 1110-3.
- Fraser, J. A., R. L. Subaran, et al. (2003). "Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada." Eukaryot Cell **2**(5): 1036-45.
- Garcia-Hermoso, D., F. Dromer, et al. (2001). "Are two *Cryptococcus neoformans* strains epidemiologically linked?" J Clin Microbiol **39**(4): 1402-6.
- Garcia-Hermoso, D., G. Janbon, et al. (1999). "Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection." J Clin Microbiol **37**(10): 3204-9.
- Garcia-Hermoso, D., S. Mathoulin-Pelissier, et al. (1997). "DNA typing suggests pigeon droppings as a source of pathogenic *Cryptococcus neoformans* serotype D." J Clin Microbiol **35**(10): 2683-5.

- Gokulshankar, S., S. Ranganathan, et al. (2004). "Prevalence, serotypes and mating patterns of *Cryptococcus neoformans* in the pellets of different avifauna in Madras, India." *Mycoses* **47**(7): 310-4.
- Halliday, C. L. and D. A. Carter (2003). "Clonal reproduction and limited dispersal in an environmental population of *Cryptococcus neoformans* var *gattii* isolates from Australia." *J Clin Microbiol* **41**(2): 703-11.
- Halliday, C. L., T. Bui, et al. (1999). "Presence of alpha and a mating types in environmental and clinical collections of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* strains from Australia." *J Clin Microbiol* **37**(9): 2920-6.
- Hernandez Idel, C., G. M. Machin, et al. (2003). "[Pigmentation of *Cryptococcus neoformans* strains on sunflower seed agar]." *Rev Cubana Med Trop* **55**(2): 119-20.
- Jain, N., L. Li, et al. (2006). "Phenotypic switching in a *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* strain is associated with changes in virulence and promotes dissemination to the central nervous system." *Infect Immun* **74**(2): 896-903.
- Kaufmann, C. S. and W. G. Merz (1982). "Two rapid pigmentation tests for identification of *Cryptococcus neoformans*." *J Clin Microbiol* **15**(2): 339-41.
- Kidd, S. E., P. J. Bach, et al. (2007). "*Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada." *Emerg Infect Dis* **13**(1): 51-7.
- Kluger, E. K., H. K. Karaoglu, et al. (2006). "Recrudescence of cryptococcosis, caused by *Cryptococcus gattii* (molecular type VGII), over a 13-year period in a Birman cat." *Med Mycol* **44**(6): 561-6.
- Kobayashi, C. C., L. K. Souza, et al. (2005). "Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiania, Goias State, Brazil." *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **47**(4): 203-7.
- Krockenberger, M. B., P. J. Canfield, et al. (2001). "An immunohistochemical method that differentiates *Cryptococcus neoformans* varieties and serotypes in formalin-fixed paraffin-embedded tissues." *Med Mycol* **39**(6): 523-33.
- Krockenberger, M. B., P. J. Canfield, et al. (2002). "*Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): serological evidence for subclinical cryptococcosis." *Med Mycol* **40**(3): 273-82.
- Krockenberger, M. B., P. J. Canfield, et al. (2002). "*Cryptococcus neoformans* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): colonization by C n. var. *gattii* and investigation of environmental sources." *Med Mycol* **40**(3): 263-72.
- Krockenberger, M. B., P. J. Canfield, et al. (2003). "*Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): a review of 43 cases of cryptococcosis." *Med Mycol* **41**(3): 225-34.
- Krockenberger, M. B., P. J. Canfield, et al. (2003). "*Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): a review of 43 cases of cryptococcosis." *Med Mycol* **41**(3): 225-34.

- Lacaz Cda, S., E. M. Heins-Vaccari, et al. (2002). "Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B, in an immunocompetent patient." Rev Inst Med Trop Sao Paulo 44(4): 225-8.
- Latouche, G. N., T. C. Sorrell, et al. (2002). "Isolation and characterisation of the phospholipase B gene of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*." FEMS Yeast Res 2(4): 551-61.
- Litvintseva, A. P., L. Kestenbaum, et al. (2005). "Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*." J Clin Microbiol 43(2): 556-64.
- Malik, R., D. I. Wigney, et al. (1992). "Cryptococcosis in cats: clinical and mycological assessment of 29 cases and evaluation of treatment using orally administered fluconazole." J Med Vet Mycol 30(2): 133-44.
- Malik, R., E. Dill-Macky, et al. (1995). "Cryptococcosis in dogs: a retrospective study of 20 consecutive cases." J Med Vet Mycol 33(5): 291-7.
- Malik, R., M. B. Krockenberger, et al. (2003). "Avian cryptococcosis." Med Mycol 41(2): 115-24.
- Nandhakumar, B., C. P. Kumar, et al. (2006). "Mustard seed agar, a new medium for differentiation of *Cryptococcus neoformans*." J Clin Microbiol 44(2): 674.
- O'Brien, C. R., M. B. Krockenberger, et al. (2006). "Long-term outcome of therapy for 59 cats and 11 dogs with cryptococcosis." Aust Vet J 84(11): 384-92.
- Pal, M. (1998). "*Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and munia birds." Mycoses 32(5): 250-2.
- Perfect, J. R. (2006). "*Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot." FEMS Yeast Res 6(4): 463-8.
- Quintero, E., E. Castaneda, et al. (2005). "[Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* in the department of Cundinamarca-Colombia]." Rev Iberoam Micol 22(2): 93-8.
- Racicot, T. A. and G. S. Bulmer (1985). "Comparison of Media for the Isolation of *Cryptococcus neoformans*." Appl Environ Microbiol 50(2): 548-549.
- Ren, P., D. J. Springer, et al. (2006). "Transcription factor STE12alpha has distinct roles in morphogenesis, virulence, and ecological fitness of the primary pathogenic yeast *Cryptococcus gattii*." Eukaryot Cell 5(7): 1065-80.
- Riley, C. B., J. R. Bolton, et al. (1992). "Cryptococcosis in seven horses." Aust Vet J 69(6): 135-9.
- Rosario, I., B. Acosta, et al. (2008). "[Pigeons and other birds as a reservoir for *Cryptococcus* spp]." Rev Iberoam Micol 25(1): S13-8.
- Rosario, I., M. Hermoso de Mendoza, et al. (2005). "Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons." Mycoses 48(6): 421-4.

- Ruiz, A., R. A. Fromtling, et al. (1981). "Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site." Infect Immun **31**(2): 560-3.
- Saracli, M. A., S. T. Yildiran, et al. (2006). "Genotyping of Turkish environmental *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolates by pulsed field gel electrophoresis and mating type." Mycoses **49**(2): 124-9.
- Severo, L. C., E. Z. I. Berta, et al. (2001). "Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*." Rev Iberoam Micol **18**(4): 200-1.
- Sorrell, T. C. (2001). "*Cryptococcus neoformans* variety *gattii*." Med Mycol **39**(2): 155-68.
- Steenbergen, J. N. and A. Casadevall (2000). "Prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (Serotype D) and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A) isolates in New York City." J Clin Microbiol **38**(5): 1974-6.
- Stepanovic, S., D. Vukovic, et al. (2002). "Ground red hot pepper agar in the isolation and presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*." Mycoses **45**(9-10): 384-8.
- Tay, S. T., T. Tanty Haryanty, et al. (2006). "In vitro susceptibilities of Malaysian clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* to five antifungal drugs." Mycoses **49**(4): 324-30.
- Taylor, M. B., D. Chadwick, et al. (2002). "First reported isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a patient in Singapore." J Clin Microbiol **40**(8): 3098-9.
- Trilles, L., B. Fernandez-Torres, et al. (2004). "In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*." J Clin Microbiol **42**(10): 4815-7.
- Vidotto, V., S. Aoki, et al. (2004). "A new caffeic acid minimal synthetic medium for the rapid identification of *Cryptococcus neoformans* isolates." Rev Iberoam Micol **21**(2): 87-9.
- Vilcins, I., M. Krockenberger, et al. (2002). "Environmental sampling for *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from the Blue Mountains National Park, Sydney, Australia." Med Mycol **40**(1): 53-60.
- Vogel, R. A. (1969). "Primary isolation medium for *Cryptococcus neoformans*." Appl Microbiol **18**(6): 1100.
- Wright, L. C., J. Payne, et al. (2004). "Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*." Biochem J **384**(Pt 2): 377-84.