

Aislamiento de la levadura *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* y var. *gattii*, serotipo C en el departamento del Atlántico, Colombia

Por

Luis Alberto Romero Pérez

Tesis sometida en cumplimiento parcial
de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

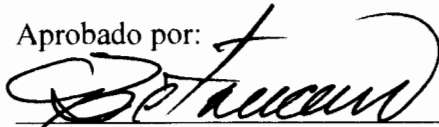
en

Biología

Universidad De Puerto Rico
Recinto Universitario De Mayagüez

2004

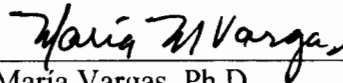
Aprobado por:



Carlos Betancourt, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Abril/28/04

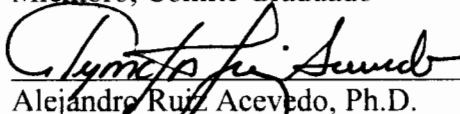
Fecha



María Vargas, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

30 abr 04

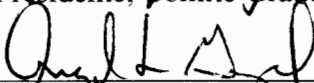
Fecha



Alejandro Ruiz Acevedo, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

3 mayo 2004

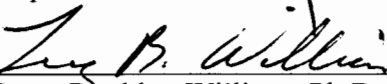
Fecha



Ángel González, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

10/may/2004

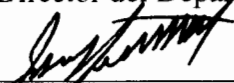
Fecha



Lucy Bunkley Willians, Ph.D.
Director del Departamento

10 May 2004

Fecha



José A. Mari Mutt, Ph.D.
Director de Estudios Graduados

10 may 2004

Fecha

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to determine the prevalence and distribution of the yeast *C. n. var. neoformans* and *var. gattii*, C in the Atlantic Department, Colombia, S.A. A total of 250 of feces samples from different pigeons (*Columba livia*) were collected from 13 areas of the Atlantic Department. Additionally, 34 samples of almond trees (*Terminalia catappa*) detritus were collected from Barranquilla, Colombia. Serial dilutions (1/10) were performed from initial mixtures using sterile saline with antibiotics and then inoculated on to Niger Seed Agar plates and incubated at 28 °C for 7 days. Yeasts were identified by: urease, capsule; phenoloxidase production; carbohydrate assimilation and growth at 37 °C. The yeast variety was determined using the canavanine-glycine-bromothymol blue medium incubated at 28 °C for 5 days. The serotyping of the *gattii* variety was performed using rabbit monoclonal antibodies. The variety *neoformans* was isolated from 19.4 % of the pigeon droppings collected within the nests. The prevalence of the variety *neoformans* in Atlantic Department was of 12 %; however in the south area of the department was isolated in 26,2 %. The *gattii* variety, serotype C was recovered from 17.6 % of almond trees detritus samples from the city of Barranquilla. It is recommended that a sanitary campaign be implemented to prevent the accumulation of pigeon feces and that the immunosuppressed population be informed of the risk of acquiring pigeon feces and detritus-borne yeast infections.

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue determinar la prevalencia y distribución de la levadura *C. n. var. neoformans* y *var. gattii* en el departamento del Atlántico, Colombia, S.A. Se procesaron 250 muestras de excretas de paloma (*Columba livia*) recogidas en trece áreas del departamento del Atlántico y 34 muestras de detritos de almendro (*Terminalia catappa*) recolectadas en Barranquilla, Colombia. Se realizaron diluciones 1/10 a partir de las mezclas iniciales preparadas en solución salina conteniendo antibióticos antibacterianos. Dichas mezclas se inocularon en platos Petri con el medio de cultivo Niger Seed Agar (NSA) y se incubaron a 28 °C por 7 d. Las levaduras se identificaron mediante las pruebas de ureasa, producción de fenoloxidasa, cápsula, asimilación de carbohidratos y crecimiento a 37 °C. La variedad se determinó usando el medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol incubando a 28 °C por 5 días. La serotipificación de la variedad *gattii*, se realizó con anticuerpos monoclonales de conejo. La variedad *neoformans* se aisló en un 19.4 % a partir de las muestras de excretas de paloma recolectadas dentro de los nidos. La prevalencia de la variedad *neoformans* en el departamento del Atlántico fue de un 12 %; no obstante, en el área sur del departamento la levadura se aisló en un 26.2 %. La variedad *gattii*, serotipo C se recuperó en un 17.6 % en la ciudad de Barranquilla a partir de detritos de almendro. Se recomienda emprender una campaña sanitaria que evite la acumulación de excretas de paloma e informar a la población inmunosuprimidas sobre los riesgos de contraer infecciones por levaduras en excretas de paloma y de detritos de almendro.

CONSENTIMIENTO

Por este medio autorizo a la Biblioteca del Recinto Universitario de Mayagüez a permitir copiar, en parte o su totalidad, este documento de trabajo realizado para la obtención de mi grado. La copia parcial o total del mismo será únicamente para propósito de investigación.

CONSENT

I do hereby authorize the library of the University of Puerto Rico at Mayagüez to copy partially or complete, this document for research purposes.

Luis Alberto Romero Pérez
Abril, 2004

DEDICATORIA

A mis padres, Adolfo Romero e Hilda Pérez; a mi esposa Erica, a mi hijo Luis Ángel, a mis hermanos, Raúl, Ana María, Martha y Adolfo. Gracias a su apoyo y estímulo permanente me permitieron culminar este proyecto.

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.

Al Dr. Alejandro Ruiz, mi consejero por haberme dado la oportunidad de trabajar con él en este proyecto y por sus valiosas sugerencias.

Al Dr. Carlos Betancourt y a la Dra. María Vargas por sus sugerencias y la revisión del manuscrito.

A Elizabeth Quintero por el procesamiento de las muestras de detritos de almendro en el Instituto Nacional de Salud de Bogotá, Colombia.

A los profesores Antonio Insignares y Rafael Borja por haberme dado la oportunidad de realizar la parte experimental en los laboratorios de Ciencias Biológicas y Microbiología de la Universidad del Atlántico, Barranquilla (Colombia).

A la señora Herminia Castellón, Directora del Departamento de Estadística del Hospital de Barranquilla por haberme facilitado los datos de criptococosis diagnosticados.

Al Dr. Raúl Macchiavelli y al profesor Kermin Hurtado por sus sugerencias en la parte estadística.

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

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	ii
1.0 INTRODUCCIÓN.....	1
2.0 REVISIÓN DE LITERATURA.....	4.
2. 1 Hábitat donde puede encontrarse y aislarse la levadura.....	4.
2.2 Características de la cápsula polisacárida.....	7
2.2.1 Componentes de la cápsula polisacárida.....	9
2.3 Principales serotipos de la levadura <i>Cryptococcus neoformans</i>	10
2.4 Características de la variedad <i>gattii</i>	14
2.5 Diferencias entre la variedad <i>neoformans</i> y la variedad <i>gattii</i>	16
2.6 Proceso de reproducción.....	18
2.7 Inmunidad celular.....	20
2.8 Proceso de mielinización.....	21
2.9 Determinación de la variedad.....	23
2.10 Características de la criptococosis.....	24
2.11 Tratamiento de la criptococosis.....	26
2.12 Diagnóstico de la criptococosis.....	28
3.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3. 1 Descripción general del departamento del Atlántico.....	29
3.2 Recolección y procesamiento de excretas de paloma (<i>Columba livia</i>).....	29
3.3 Recolección y procesamiento de muestras de almendro.....	32
3.4 Identificación de <i>C. neoformans</i> mediante pruebas bioquímicas.....	33
3.4.1 Tinción de cápsula o prueba de tinta china.....	33
3.4.2 Prueba de ureasa.....	33
3.4.3 Prueba de asimilación de Carbohidratos.....	34
3.4 Prueba de crecimiento a 37 °C.....	34
3.5 Procedimiento para identificar la variedad.....	34
3.6 Serotipificación de las cepas aisladas de las muestras de almendro.....	35

4.0 RESULTADOS.....	36
4.1 Principales resultados de las pruebas bioquímicas.....	36
4.2 Porcentaje de recuperación de la levadura en el área de estudio.....	39
4.3 Prevalencia la levadura <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> en el departamento del Atlántico en las áreas de estudio.....	40
4.4 Porcentaje general de aislamiento de la levadura al norte y sur del departamento del Atlántico, Colombia.....	43
4.5 Porcentaje de aislamiento de la variedad <i>neoformans</i> y <i>gattii</i> en la ciudad de Barranquilla.....	44
4.6 Frecuencia de la levadura de acuerdo a la ubicación de excretas.....	45
4.7 Prueba estadística Chi cuadrado de Pearson.....	45
5.0 DISCUSIÓN.....	45
6.0 CONCLUSIONES.....	58
7.0 RECOMENDACIONES.....	59
8.0 LITERATURA CITADA.....	60

LISTA DE FIGURAS

1. Ubicación del departamento del Atlántico en la República de Colombia y áreas donde se realizó la recolección de excretas de paloma.....	30
2. Colonias de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> en Níger Seed Agar (NSA).....	36
3. Observación de la cápsula polisacárida en <i>C. neoformans</i> (100X).....	37
4. Proceso metabólico de la urea por <i>Cryptococcus neoformans</i>	38
5. Crecimiento de <i>Cryptococcus neoformans</i> en medio de canavanina CGB.....	39
7. Porcentaje de prevalencia de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> de acuerdo a las áreas analizadas.....	40
6. Porcentaje de aislamiento en las áreas del departamento del Atlántico donde se aisló <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	41
8. Distribución de la levadura <i>C. neoformans</i> en las diversas áreas climáticas presentes del departamento del Atlántico y su precipitación luvial.....	42
9. Porcentaje de distribución de <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> de acuerdo a la ubicación de los municipios en el departamento del Atlántico.....	43
10. Porcentaje de prevalencia de <i>C. rypococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> y var. <i>gattii</i> en Barranquilla.....	44

APÉNDICE

1. Número de muestras recolectadas y porcentaje de aislamiento por área analizada en el departamento del Atlántico, Colombia.	76
2. Número y ubicación de muestras de las heces de paloma recogidas en el departamento del Atlántico.	77
3. Análisis estadístico del estudio mediante la prueba Chi cuadrado Pearson.	78
4. Relación entre los aislamientos de <i>Cryptococcus neoformans</i> en otras regiones de Colombia y el efectuado en el departamento del Atlántico.	80
5. Temperatura y precipitación de algunas áreas del departamento del Atlántico, donde se realizó el estudio.	81
6. Sitios donde se recogieron las excretas de paloma en Barranquilla.	82
7. Casos de criptococosis diagnosticados en el Hospital Universitario de Barranquilla, Colombia.	83
8. Relación entre la alta densidad poblacional de las palomas dentro de los nidos y el recuperamiento de la levadura a partir de las excretas.	84
9. Número de casos de VIH /SIDA diagnosticados durante el periodo de 1987 al 2003 en la ciudad de Barranquilla, Colombia.	85
10. Casos de pacientes VIH positivos diagnosticados en el departamento del Atlántico, Colombia durante el periodo 1998 al 2003.	86
11. Equipos utilizados para aislar la levadura <i>Cryptococcus neoformans</i>	87
12. Principales resultados de la prueba de asimilación de carbohidratos en la levadura <i>C.n. var. neoformans</i> y <i>C. n. var. gattii</i>	88

INTRODUCCIÓN

Cryptococcus neoformans (Sanfelice) Vuillemin es una levadura encapsulada y mucóide, la cual puede ocasionar criptococosis principalmente a pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos (Kwon-Chung, 1976; Mitchell y Perfect., 1995).

La criptococosis es una infección fúngica que se adquiere habitualmente por vía inhalatoria. Se inicia como una infección pulmonar capaz de diseminarse hasta el sistema nervioso central (SNC) por el cual presenta gran tropismo (Kurokawa et al., 1998); puede ser ocasionada por *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotipos A, D y AD) y *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C) (Mitchell y Perfect., 1995). Las preferencias de las dos variedades por sus respectivos hospederos están relacionadas con el estado inmune de éste (Mitchell y Perfect, 1995; Mitchell et al., 1995). *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* tiene predilección por individuos inmunosuprimidos y *C. neoformans* var. *gattii* afecta a hospederos normales o inmunocompetentes (Mitchell y Perfect, 1995). La diseminación hematogena del hongo causa lesiones en el corazón, hígado, tubo digestivo, próstata, riñones, glándulas suprarrenales, tiroides, ojos, huesos, piel, articulaciones y SNC (Staib, 1987).

Se ha señalado que los pacientes VIH positivos son más susceptibles a ésta y a otras infecciones que la población inmunocompetente (Mitchell y Perfect, 1995; Bunting et al., 1979); sin embargo, existen otras condiciones que pueden alterar la

inmunidad celular como las neoplasias linforeticulares, leucemia, diabetes, enfermedad Hodking, sarcoidosis y tratamientos prolongados con corticosteroides que predisponen al desarrollo de la criptococosis (Diamond y Bennett, 1974).

El propósito de esta investigación fue determinar la prevalencia y frecuencia de la levadura *Cryptococcus neoformans* en las excretas de palomas en el departamento del Atlántico, Colombia, S.A; por ser este el nicho en donde comúnmente se puede aislar el hongo. A su vez se propuso identificar la variedad a la cual pertenecen las cepas aisladas, analizar que factores inciden en su aislamiento y determinar si la época de verano es propicia para aislar la levadura. Otro de los objetivos planteados fue verificar si la variedad *gattii*, serotipo C podía ser aislada a partir de muestras de árboles de almendro (*Terminalia catappa*), porque se ha demostrado que la levadura puede estar presente en detritos de almendros y que puede también se ha aislado de pacientes VIH positivos causándole criptococosis. Finalmente se evaluo las siguientes hipótesis de investigación mediante la prueba de Chi cuadrado de pearson y se considero un $P < 0.05$ como significativo.

Ho: La levadura *Cryptococcus neoformans* puede ser aislada en gran proporción a partir de heces fecales de paloma (*Columba livia*) recolectadas en cualquiera de los municipios escogidos para realizar el estudio en el departamento del Atlántico (Colombia) durante época de verano.

Ha: La levadura *Cryptococcus neoformans* se puede aislar de las excretas de

paloma recolectadas en el departamento del Atlántico pero su frecuencia y distribución dependen de la influencia de las condiciones climáticas del área en que sean recogidas y del lugar donde se encuentren las muestras.

Los resultados de esta investigación se remitirán a los servicios epidemiológicos e inmunológicos del departamento del Atlántico para que orienten y capaciten esencialmente a las personas en especial a los pacientes inmunosuprimidos en la aplicación de medidas higiénicas que permitan eliminar la acumulación de excretas de paloma y así evitar un posible contagio. Por otro lado, también se notificarán a la anterior institución los logros alcanzados en el estudio realizado con detritos de almendro porque eventualmente pueden ser otro foco de contagio para personas inmunocompetentes e inmunocomprometidas, a pesar de que a nivel mundial se hayan reportado pocos casos de criptococosis ocasionados por la variedad *gattii*, serotipo C.

REVISIÓN DE LITERATURA

2. 1 Hábitat donde puede encontrarse y aislarse la levadura.

Sanfelice (1894) descubrió la levadura *Cryptococcus neoformans* a partir del jugo de melocotón o durazno y la llamó inicialmente *Sacharomyces neoformans*.

Cryptococcus neoformans es una levadura ovalada de distribución universal, perteneciente a los basidiomicetos (Rippon, 1982) y se encuentra en altas concentraciones en las excretas envejecidas y en suelos contaminados con excretas de aves (Ajello, 1958; Emmons, 1955). El primer aislamiento de la levadura a partir de las heces fecales de la paloma se debe a Emmons en 1951.

Staib (1963) indicó que las excretas de paloma (*Columba livia*) favorece el crecimiento de *C. neoformans* por el alto contenido de creatinina, ácido úrico, guanina y xantina. Sin embargo, el suelo y las excretas pueden ser ambientes hostiles para *C. neoformans* cuando están expuestas a la radiación solar, temperaturas extremas, condiciones anaerobias, baja humedad y extrema acidez (Ruiz et al., 1981; Ishaq et al., 1968). Las altas concentraciones del amoníaco en excretas frescas inhiben el crecimiento de la levadura, mientras las altas concentraciones de levaduras se encuentran en las excretas secas de paloma porque es un ambiente desfavorable para el crecimiento de la mayoría de los otros microorganismos (Litman y Borok, 1968). Se ha demostrado que en heces fecales de paloma que se encuentren a la sombra, ya sea

húmedas o desecadas, la levadura pueden resistir hasta dos años o más (Ishaq et al., 1968).

El hábitat natural de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* está asociado a palomares u otros lugares donde haya acumulación de excretas de aves; sin embargo, es posible que algunas aves ofrezcan mejores condiciones para la supervivencia y multiplicación de *C. neoformans* var. *neoformans* en sus excretas que otras (Kiestein, 1996). Estudios recientes han demostrado que en las heces fecales de paloma, pueden haber poblaciones genéticamente heterogéneas de *C. neoformans* serotipo A y D (García-Hermos et al., 1997). Esto fue inicialmente informado por Ansheng et al. (1993) quienes demostraron que en una muestra de excreta de paloma coexistieron cepas del serotipo A y AD. Las concentraciones de *C. n. var. neoformans* en excretas de paloma a menudo exceden de 10^6 organismos viables por gramo. Su alta concentración en este sustrato puede estar relacionada a la habilidad de asimilar los compuestos nitrogenados allí presentes (Ruiz et al., 1981). Las levaduras han sido aisladas repetidamente de los picos y patas de palomas; esto apoya la teoría de que la paloma puede actuar como un factor mecánico de propagación (Emmons, 1955; Emmons, 1951).

Cryptococcus neoformans var. *neoformans* se ha aislado de frutas, productos lácteos y vegetales (Pal y Mehrotra, 1984). Recientemente se reportó el aislamiento de esta variedad en los orificios de los troncos de árboles, donde se ha observado evidente degradación de lignina.

Los orificios de árboles proveen protección ya que las levaduras están menos expuestas a las condiciones climáticas (Lazera, 1996). La levadura se ha aislado de árboles tropicales como *Entandophragma spp*, Kinshasa, Zaire (Bauwens et al., 1986); *Syzygium jambolona* (Lazera et al., 1993) y de los orificios de los árboles de *Cassia grandis*, *Senna multifulga* y *Ficus microcarpa* (Lazera et al., 1996). Por otra parte, González et al. (1989) sostienen que los bioproductos de la descomposición de la madera, por acción de la fenoloxidasa son esenciales para el crecimiento de las levaduras, incluyendo a *Cryptococcus neoformans*. Igualmente, Lazera et al. (1996) sostienen que la xilosa, la celobiosa y otros productos de la degradación de la lignina son fundamentales para el crecimiento de *C. neoformans*. El crecimiento saprófito de *C. neoformans var. gattii* en los árboles de *Eucalyptus camaldulensis* se debe a que ellos contienen grandes cantidades de lignina y compuestos polifenoles (Pfeiffer y Ellis, 1993).

Estudios experimentales sostienen que las células levaduriformes bajo condiciones de privación de nutrientes y de una baja humedad en el suelo pueden perder la cápsula o provocar una reducción de tamaño de célula (Farhi et al., 1970). La levadura se ha aislado de una variedad de especies de aves como pericos, pollos, loros, gorriones y en una poca concentración en muestras de suelo (Littman y Borok, 1968; Levitz, 1991; Bauwens et al., 1986).

Cryptococcus neoformans var. neoformans se ha aislado de las excretas de loros y gallinas aprovechando el ambiente salino, alcalino y rico en nitrógeno donde

comparte hábitat con *Rhodotorula* y *Geotrichum* (Rippon, 1982). En 1995, Hill, reportó un caso de criptococosis en el ave kiwi (*Aptesis australis mantelli*) producido por cepas de serotipo B e indicó que la infección probablemente se debió a la baja temperatura corporal de su cuerpo, la cual es similar a la de los mamíferos.

Bunting et al. (1979) demostraron que *Acanthamoeba polyphaga* puede fagocitar y matar hasta un 99 % de las células de *C. neoformans* en cultivos mixtos; sin embargo, algunas cepas de *C. neoformans* pueden desarrollar pseudohifas para evadir el efecto letal de la fagocitosis. Resultados similares, usando la especie *Acanthamoeba palestinensis*, fueron reportados por Ruiz (1981) y Neilson et al. (1978). Por otro lado, existen bacterias aisladas en el tracto digestivo intestinal de la paloma que tienen actividad anticriptococal como: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales inhiben en medios de cultivo el crecimiento de la levadura (Ruiz et al., 1981; Abou-Gabal y Atia, 1978).

2.2 Características de la cápsula polisacárida.

Las cepas de *Cryptococcus neoformans* presentes en el medio ambiente a menudo no son encapsuladas y están encogidas o reducidas (Ruiz, 1981). Se ha demostrado que la hiperosmolaridad es por lo menos uno de los factores que suprimen la formación de la cápsula (Dykstra et al., 1977).

Farhi et al. (1970) reportaron que las células de *C. neoformans* aisladas del suelo

son relativamente pequeñas y poco encapsuladas. Cuando hay desecación, se reduce el tamaño de la cápsula, presentando un diámetro de 1 μm , el cual permite que las células sean fácilmente inhaladas y puedan depositarse directamente en los alvéolos pulmonares (Bulmer, 1990). Existen cepas acapsulares las cuales tienden a producir colonias con morfología seca, porque pierden la habilidad de sintetizar la cápsula (Dykstra et al., 1977; Kozel y Cazin, 1971). Sin embargo, estas cepas tienen la capacidad de sintetizar galactoxilomanano (Van de Moer et al., 1990).

El polisacárido capsular suprime la formación de anticuerpos (Murphy y Cozad, 1972); inhibe la fagocitosis (Bulmer y Sans, 1967); la migración de leucocitos (Drouhet y Segretain, 1951) y suprime la producción de linfocitos T supresores (Rippon, 1982). La cápsula polisacárida es relevante a la taxonomía de la levadura y su detección en los fluidos corporales ha permitido el diagnóstico rápido y la evaluación del pronóstico de la enfermedad (Kozel et al., 1991; Kozel, 1989). El tamaño de la cápsula está determinado por las características genotípicas de cada cepa y por las diferentes condiciones ambientales. La síntesis capsular depende de las altas concentraciones de dióxido de carbono y la disponibilidad de hierro reducido (Granger et al., 1985); los medios hipertónicos suprimen la síntesis capsular (Jacobson et al., 1989); así mismo, las altas concentraciones de glucosa, cloruro de sodio y tiamina (Jacobson et al., 1989; Dystra et al., 1977)

El polisacárido capsular es sintetizado en el citoplasma y luego es exportado a la parte externa de la pared (Sakaguchi et al., 1993; Takeo et al., 1973); se caracteriza por

ser hidrofílico y estar cargado negativamente debido a la presencia de ácido glucorónico (Kozel et al., 1980).

Las células encapsuladas se caracterizan por iniciar la activación del complemento a través de la vía alternativa. La activación comienza por la deposición de fragmentos opsónicos (C3) sobre la superficie celular (Goldstein y Rambo, 1962), facilitando el proceso de fagocitosis por parte de los macrófagos y neutrófilos (Kozel et al., 1984). Las cepas encapsuladas no activan la vía clásica del complemento, debido a la ausencia de anticuerpos específicos contra el glucuronoxilomanano en el suero humano (Haupt et al., 1994).

2.2.1 Componentes de la cápsula polisacárida.

Las cápsula polisacárida se caracteriza por estar formada por los siguientes componentes: el glucuronoxilomanano es un esqueleto lineal constituido por (1-3) α -D mananopirano, sustituido por β -D xilopiranosil, ácido β -D glucupiranosilurónico y grupos 0-acetilos Cherniak y Sundstrom, 1994). Otros autores sostienen que el glucuronoxilomanano representa el 88 % del material capsular y está constituido por ácido glucorónico, xilosa y manosa. Generalmente, se detecta en los fluidos corporales de la mayoría de los pacientes con criptococosis (Diamond et al., 1974).

El galactoxilomanano está compuesto de galactosa, glucosa, xilosa y manosa (James y Cherniak, 1992) y las mananoproteínas están formadas por manosa, galactosa

y xilosa (Cherniak y Sundstrom, 1994) y se caracterizan por tener una carga neutral al igual que el galactoxilomanano.

James y Cherniak (1992) determinaron que la cápsula, esta formada por manosa, xilosa, ácido glucorónico y grupos O-acetil. Los diferentes grados de acetilación de las cadenas laterales determinan la presencia de serotipos cuya complejidad estructural aumenta del serotipo D al A, al B, al C (Ikeda et al., 1991; Cherniak et al., 1994). Recientemente Cherniak et al. (1995) indicaron recientemente que el glucuronoxilomanano de los serotipos aislados de especímenes clínicos, pueden cambiar durante el curso de la infección.

La estructura capsular de la levadura es un inmunógeno pobre, tanto en el hombre como en los modelos experimentales con animales y la producción de anticuerpos específicos ocurre solamente en una parte de los pacientes con criptococosis y los niveles son usualmente bajos (Kozel et al., 1989; Dromer et al., 1993).

2.3 Principales serotipos de la levadura *Cryptococcus neoformans*.

Los serotipos se encuentran agrupados en 2 variedades: *C. n. var. neoformans* (serotipos A, D y AD) y *C. n. var. gattii* (serotipos B y C) (Dromer et al., 1993). La determinación de los serotipos se realiza con el suero inmune de conejo porque éstos presentan una fuerte respuesta de anticuerpos frente al polisacárido capsular (Gordon y Casadevall, 1995; Gadebush, 1958). Los anticuerpos anticriptococcus en el suero

reaccionan específicamente con los factores antigénicos presentes en el glucuronoxilomanano, el principal componente de la cápsula polisacárida de cada serotipo (Eckert, 1987).

Ikeda et al. (1982) por medio de pruebas de aglutinación en laminilla con absorción recíproca, caracterizaron los patrones antigénicos de cada serotipo y demostraron que el factor antigénico 1 era común para los serotipos A, B, C y D, mientras el determinante antigénico 2 era compartido por los serotipos A, B y D. Por otra parte, también indicaron que los serotipos A y D poseen un factor común 3 y los serotipos B y C poseen un determinante antigénico común 4. Además, sostuvieron que cada serotipo (A, B, C y D) presentan otro determinante antigénico específico, los cuales fueron designados como 7, 6, 5 y 8, respectivamente. Ikeda et al. (1982) establecieron que el serotipo A posee los factores antigénicos 1, 2, 3 y 7; el serotipo D los factores antigénicos 1, 2, 3 y 8; el serotipo B presenta los determinantes antigénicos 1, 2, 4 y 5, mientras que el serotipo C tiene los determinantes antigénicos 1, 4 y 6.

El serotipo A es el más aislado en el mundo en pacientes con y sin SIDA; el serotipo B es más frecuente que el serotipo C en Estados Unidos, siendo este último más frecuente en California y el serotipo D es común en Francia, Italia y Dinamarca (Bennett et al., 1984; Dromer et al., 1986).

El serotipo AD es una cepa genotípicamente intermedia entre el serotipo A y D que se diferencia por la composición química de la cápsula polisacárida y por la

reacción de aglutinación con antisuero (Ikeda et al., 1982). A nivel molecular se ha determinado que cepas de serotipo AD contienen genomas aneuploides o diploides y que este serotipo es el resultado de un cruce genético entre cepas haploides de serotipos A y serotipo D (Lengeler et al., 2001)

Los serotipos A y D presentan diferencias genéticas, pero se ha demostrado que ellos se pueden cruzar produciendo el estado teleomorfo *Filobasidiella neoformans* *Kwon-Chung var. neoformans* (Kwon-Chung, 1975). El serotipo D se puede diferenciar del serotipo A empleando un medio que contenga creatinina, dextrosa, bromotimol azul y timina. El serotipo D metaboliza la timina originando ácido- β -butírico el cual causa un color anaranjado en el medio; mientras las colonias de serotipo A permanecen color crema porque no utilizan la timina (Irokanulo et al., 1994). Por otra parte, Cleare y Casadevall (1998) observaron un patrón anular de inmunofluorescencia cuando los anticuerpos monoclonales de inmunoglobulina M (Mab) 13 F1 se acoplan a la cápsula de las cepas serotipos A y un patrón punteado cuando se adhieren a las cepas de serotipos D.

El serotipo A contiene mayor cantidad de xilosa en la cápsula polisacárida que el serotipo D (Cherniak y Sundstrom, 1994); los aislamientos recuperados de *Cryptococcus neoformans* a nivel mundial en pacientes con sida son serotipo A; el serotipo D es más prevalente en Francia, Italia y Dinamarca (Aulakh et al., 1981; Bennett et al., 1984).

Las infecciones ocasionadas por el serotipo D están relacionadas con el uso de corticosteroides y pacientes de edad avanzada. Este serotipo se caracteriza por producir infecciones a nivel de piel (Dromer et al., 1996). Además, en los aislamientos clínicos y ambientales de serotipo A solamente se ha identificado el tipo de acoplamiento “ α ” ; mientras en el serotipo D aparecen los tipos de acoplamientos “ α ” y “a” (Franzot et al., 1999). En 1999, Franzot, apoyados en aspectos clínicos, moleculares y biológicos indicaron que el serotipo A es significativamente diferente del serotipo D y propusieron que debería ser llamado *C. neoformans var. grubii*. Además, Guébo et al. (1993) también reportaron que las secuencias del dominio D2 de la subunidad larga de r RNA de los serotipos A y D son significativamente diferentes

Bennett et al. (1978) indicaron que los serotipos B y C asimilan ácido málico y ácido fumárico, pero que los serotipos A y D no tienen la capacidad de asimilarlos. Esto se debe a que los serotipos B y C poseen un sistema de transporte que facilita la rápida utilización de algunos intermediarios del ciclo de Krebs en comparación a los serotipos A y D. Los serotipos B y C se diferencian fisiológicamente de los serotipos A, D y AD porque utilizan los aminoácidos triptófano y prolina como fuente de nitrógeno (Mukamurangwa et al., 1995). A pesar que las infecciones con serotipo C son raras, Bagaerts et al. (1993), notificaron un caso de infección en paciente VIH positivo en Rwanda, África. Por otro lado, otros cuatro casos han sido reportados en Soweto, África (Karstedt et al., 2002). Los pacientes se caracterizaron por presentar meningitis y conteaje de células CD4 menor de 50 células por μL .

2.4. Características de la variedad *gattii*.

Cryptococcus neoformans var. *gattii* se aísla frecuentemente en Australia, Brasil, Cambodia, Hawaii, Sur de California, México, Paraguay, Tailandia, Vietnam, Nepal y países de África (Kwon-Chung y Bennett, 1984); sin embargo, algunos casos de criptococosis han sido reportados en países donde los árboles de eucalipto no se han adaptado a las condiciones ambientales, como en Malasia (Keah et al., 1994).

El nombre de *C. n. var. gattii* fue propuesto por Vanbreuseghem y Takashio en 1970. La nomenclatura de esta variedad se basó en la morfología atípica de un aislamiento de la levadura en el fluido cerebrospinal de un niño con meningitis en África (Gatti y Eeckels, 1970); éste presentó células elongadas y redondas en los tejidos y en animales en experimentación (Vanbreuseghem y Takashio, 1970). El primer aislamiento de la variedad *gattii* fue realizado en Australia por Ellis y Pfeiffer (1990) quienes lo aislaron a partir de muestras de corteza, hojas y flores localizados debajo del árbol *Eucalyptus camaldulensis*. Concluyeron que existe una asociación específica entre *C. n. var. gattii* y *E. camaldulensis* y que la dispersión de las partículas infectantes de *C. n. var. gattii*, parece ocurrir al final de la primavera concordando con la floración del árbol (Ellis y Pfeiffer, 1990).

El primer aislamiento ambiental de *C. n. var. gattii* reportado fuera de Australia, fue realizado por Pfeiffer y Ellis (1991) quienes aislaron la levadura a partir de *E. camaldulensis* en Front Point, Estados Unidos. Este aislamiento apoya la hipótesis de

que el hongo ha sido exportado de Australia a otros países, probablemente por semillas contaminadas por plantas jóvenes de *Eucalyptus sp.*

En 1992, Pfeiffer y Ellis, aislaron la levadura *C. n. var. gattii* de *Eucalyptus tereticornis*, el cual presenta una distribución global similar a la de *Eucalyptus camaldulensis*. Hasta el momento todos los aislamientos de la variedad *gattii* aislados a partir de *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* han sido caracterizados como serotipos B. Igualmente, *C. n. var. gattii* se ha relacionado con la presencia de *Eucalyptus* de diferentes especies: *blakelyi*, *gomphocephala* y *rudis* (Ellis y Pfeiffer, 1990). En Latinoamérica, *Cryptococcus neoformans var. gattii* se ha aislado en Uruguay a partir de un panal de avispas, *Polybia occidentales* (Gezuele et al., 1993); a partir del guano de murciélago en Brasil (Lazera et al., 1993) y en México a partir de *E. tereticornis* (Agüero et al., 1996). También ha sido aislado de la madera en descomposición del árbol *Moquilea tomentosa*, Brasil (Lazera et al., 2000) y de algunas muestras extraídas de los orificios de los árboles *Guettarda acreana* y *Erythina jambolanum* (Fortes, 1999).

Pfeiffer y Ellis (1991) observaron que la ocurrencia de las infecciones por *C. n. var. gattii* en los pacientes con SIDA se desarrollan si estos se exponen a las partículas aerotransportadas durante el florecimiento de árboles de *E. camaldulensis*. A nivel mundial solo se ha informado de cuatro casos de SIDA asociados a criptococosis causada por la variedad *gattii* a saber, en Zaire (Kapenda, 1987), Canadá (St Germain et al., 1988), Estados Unidos (Clancy et al., 1990) y Brasil (Rozenbaum, 1992).

Rozenbaum et al. (1994) señalaron que los pacientes inmunocompetentes afectados por la variedad *gattii* son más sintomáticos que los pacientes inmunocomprometidos infectados por la variedad *neoformans*; en estos pacientes el líquido cefalorraquídeo tiene proteínas de 450 mg/dL y pleocitosis. Además, señalaron que los papiledemas son más frecuentes en los pacientes inmunocompetentes. Por el contrario, los niveles del antígeno son altos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes inmunocompetentes afectados con la variedad *gattii* (Speed y Dunt, 1995).

2.5 Diferencias entre la variedad *neoformans* y la variedad *gattii*.

Cryptococcus neoformans var. *neoformans* crece bien a 37 °C y sus colonias llegan a ser viables en un período de 2 a 3 días. Los aislamientos de *C. n. var. gattii* crecen pobremente a 37 °C y pueden tomar hasta 4 o 5 días para formar colonias visibles (Kwon-Chung et al., 1992). En 1997, Boekhout, sostuvo que la var. *gattii* y *neoformans* difieren en su cariotipo. El tamaño estimado del genoma de *C. n. var. gattii* es entre 12 y 18 Mb y el de *C. n. var. neoformans* es entre 15-27 Mb. Así mismo, Boekhout et al. (1997) sustentan que *C. n. var. neoformans* y *C. n. var. gattii* pueden ser separados en diferentes especies debido a que se han observado divergencias a través de tipificación molecular, como la diferencia en la secuencia de los nucleótidos en el gen URA5. Sin embargo, Guého et al. (1993) y Fell et al. (2000) indicaron, a través de un análisis del r RNA, que entre las dos variedades no hay divergencias ya que existe un 99 % de homología en sus secuencias.

La criptococosis ocasionada por la variedad *neoformans* ocurre mundialmente, mientras que la criptococosis ocasionada por la variedad *gattii* prevalece en las áreas tropicales y subtropicales (Kwon-Chung y Bennet, 1984). La variedad *neoformans* tiene fuerte predilección por individuos inmunosuprimidos, especialmente los pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Por el contrario, *C. n. var gattii* ataca hospederos normales o inmunocompetentes (Mitchell y Perfect, 1995; Speed y Dunt, 1995; Rozenbaund et al., 1992). Uno de los principales problemas de la criptococosis ocasionada por la variedad *gattii* es la pérdida de la visión. En Papua, Nueva Guinea, se ha descrito que la pérdida total de la visión ocurre en 31 % de los pacientes afectados con la variedad *gattii* (Lalloo et al., 1994).

Rex et al. (1993) sostuvieron que la pérdida visual es de 0.8 % en los pacientes inmunocompetentes y de 1.1 % en los pacientes con SIDA y que la pérdida de la visión se produce por infiltración micótica del nervio óptico, desencadenándose una inflamación a nivel de los nervios ópticos. En 1993, Cohen y Glasgow, propusieron que la pérdida de la visión en pacientes con SIDA infectados con criptococosis se debe a una infiltración micótica del nervio óptico, tractos ópticos y quiasma óptico; aracnoiditis adhesiva, toxicidad por anfotericina B y a la hipertensión intracraneana. Por otro lado demostraron la presencia de blastoconidias en el iris, cuerpo ciliar, coroides, retina, nervios ópticos, vaina del nervio óptico y tractos ópticos.

La presencia de criptocomas pulmonares es otra de las características de la afección por la *var.gattii* (Mitchell et al., 1995). Generalmente, la criptococosis

pulmonar ocasionada por la *var. gattii* requiere cirugías y tratamientos prolongados de terapia antimicótica (Mitchell y Perfect, 1995; Speed y Dunt, 1995). La capacidad de *C. neoformans* de utilizar catecolaminas neurológicas proporciona una explicación del neurotropismo del organismo (Rhodes et al., 1982; Kwon-Chung y Rhodes, 1986).

Cryptococcus neoformans var. neoformans, es sensible a la L-canavanina y a bajas concentraciones de cicloheximida; es incapaz de utilizar la glicina, D-prolina y D-triptófano como fuente de nitrógeno (Mitchell y Perfect., 1995). Por otro lado, también existen importantes diferencias clínicas entre estas dos variedades, relacionadas con la patogenicidad y la respuesta al tratamiento (Speed y Dunt, 1995). Se ha determinado que *C. n. var. gattii* tiene bajos niveles de termotolerancia en comparación a la variedad *neoformans*, posiblemente tenga como vectores de propagación huéspedes que no excedan en temperaturas entre 35 °C a 37 °C como los insectos, koalas, murciélagos y otros animales (Ellis y Pfeiffer, 1990). En 1999, Connolly et al. reportaron la presencia de *C. var. gattii* en la cavidad nasal de koalas debido a que las hojas de *E. camaldulensis* y *E. tereticornis* son la principal fuente de alimento de estos animales (Hindell y Lee, 1990). Datos recientes también sugieren que ambas variedades pueden colonizar el epitelio respiratorio de perros y gatos (Malik et al., 1997).

2.6 Proceso de reproducción.

Kwon-Chung (1975) demostró los estados perfectos o sexuales, en los diferentes serotipos de *C. neoformans*. Sostiene que este basidiomiceto se reproduce como

resultado de la conjugación de células levaduriformes sexuales de tipos “ α ” y “a” al ser mezclados en medios de cultivo apropiados a 25-37 °C. Bajo estas condiciones se forman hifas dicarióticas con conexiones tipo puente, basidias no septadas y basidiosporas. Las esporas haploides (basidiosporas) se forman en la superficie basal de las basidias en forma de cadenas basipetales las cuales se originan por sucesivas divisiones mitóticas. Posteriormente las eventuales basidiosporas pueden germinar formando células levaduriformes y de esta manera se completa su ciclo de vida (Kwon-Chung, 1976; Kwon-Chung, 1980).

Estudios realizados demostraron que cepas con el tipo de acoplamiento sexual “alfa” es aislado con mayor frecuencia que el tipo “a” de muestras clínicas y de excreta de paloma. También se han reportado que algunas cepas homotálicas de *F. neoformans* pueden producir basidiosporas sin apareamiento (Kwon-Chung, 1976; Kwon-Chung, 1980). En 1976, Kwon-Chung, demostró que *F. bacillispora* produce basidiospora alargadas (1-1.8 x 3.8 μm) de pared lisa; mientras las basidiosporas de *F. neoformans* son globosas u ovaladas (1.8-3x 2.5 μm) de diámetro y de pared áspera.

El estado teleomorfo de la levadura *Cryptococcus neoformans* ha sido clasificada en la familia *Filobasidiaceae* y en el orden *Ustilaginales*. Sin embargo, *Filobasidiella* presenta grandes diferencias con respecto a otros géneros pertenecientes a los *Ustilaginales*; no tiene teliosporas, falta septa en el basidio y forma basidiosporas en cadenas basipetales (Kwon-Chung, 1976).

La forma perfecta del hongo, presenta hifas dicarióticas delgadas con conexiones en ganchos y basidios subglobosos sin septas localizados en el ápice de las hifas. Los basidios miden de 10 a 70 μm de ancho y tienen 4 hileras de basidiosporas terminales sésiles y posición catenulada. Estas basidiosporas nunca se han encontrado en aislamientos hechos en excretas ni de árboles de eucaliptos (Ordóñez, 1992). Las basidiosporas de *Filobasidiella neoformans* son propágulos infecciosos de 1.8 x 2.5 μm de diámetro que le permiten fácilmente aerolizarse y depositarse en los pulmones y son más resistentes a la desecación que las células levaduriformes (Wickes et al., 1996).

2.7 Inmunidad celular.

En individuos inmunocompetentes, *C. neoformans* puede ser inhibido por una variedad de células como los macrófagos alveolares (Levitz y DiBenedetto, 1989), células microgliales (Blasi et al., 1995), neutrófilos y monocitos (Miller y Mitchell., 1991), células naturales asesinas (Murphy y McDaniel, 1982), astrocitos (Lee et al., 1994) y células polimorfonucleares que destruyen las células levaduriformes por mecanismos intracelulares y extracelulares (Bulmer y Sans, 1967). Se ha demostrado que las IgG del suero humano pueden fijarse a la superficie de las levaduras no encapsuladas facilitando la fagocitosis. Cuando la levadura es capsulada se produce también la fijación de las IgG, pero los componentes de la cápsula actúan sobre la fracción constante (Fc) de la Ig y neutraliza el efecto opsonizante de la fagocitosis (Connat et al., 1972).

Levitz et al. (1999) sostienen que los macrófagos después de ingerir levaduras encapsuladas, necesariamente no la destruyen; la levadura puede residir y sobrevivir en el fagolisosoma, debido al incremento de material capsular que altera la membrana fagolisosomal, destruyendo a los macrófagos (Goldman et al. 2000; Flesh, 1989). En 1982, Fromtling y Shadomy, sostuvieron que la supresión de la inmunidad celular es un factor crítico en la aparición de la criptococosis. Los niveles de las células CD4 determinan el grado de severidad y la capacidad de respuesta a los antibióticos por parte del paciente. Por otro lado Vander Hast et al. (1997) objetaron que normalmente la infección sistémica se presenta cuando el número de linfocitos CD4 es inferior a 150 μ L

2.8 Proceso de melinización.

Cryptococcus neoformans produce melanina usando una amplia variedad de compuestos como los ortodifenoles, aminofenoles, aminobencenos y catecolaminas, incluyendo 3-4 dihidroxifenilalanina (Dopa) y la dopamina (Chasakes y Tyndall, 1975; Ito, 1993). El proceso de melinización trae como resultado el engrosamiento de la pared celular (Feldmesser et al., 2001). La melanina es una estructura heterógena, dependiente de substratos y del microambiente en la cual se sintetiza (Ito y Wakamatsu., 1989); protege a *C. neoformans* en su ambiente natural contra la radiación ultravioleta (Wang y Casadevall, 1994) o contra agentes oxidantes (Frese y Sthal, 1992).

Nurudeen y Ahearn (1979) encontraron que la glucosa era un fuerte represor de

la enzima fenoloxidasa en concentraciones de 0.55 mg. Posteriormente, Jacobson y Emery (1991) y Williamson (1994) demostraron que el tiempo de mielinización es variable y que depende de la concentración de glucosa presente en el medio y la temperatura de incubación. La fenoloxidasa tiene la capacidad específica de oxidar por lo menos cuatro substratos difenólicos que están presentes en cantidades significativas en el cerebro: dopa, norepinefrina, epinefrina y dopamina (Hadesman et al., 1993; Sherman, 1973).

La enzima contribuye a la virulencia de la levadura protegiéndola en el fagosoma, oxida el hierro, inhibe la formación del radical hidroxilo (Liu et al., 1999); puede degradar la lignina por lo cual se sugiere que la levadura puede estar presente en los árboles y ser aislada de la madera (Pulverer, 1971). Mediante estudios de microscopía de transmisión electrónica se determinó que la melanina de *C. neoformans* parece estar concentrada en el lado interno de la pared celular, lo cual le permite interactuar con sustancias del lado extracelular y prevenir su penetración al interior de la levadura (Wang et al., 1995). La melanina provee protección contra péptidos microbicidas como las defensinas y proteginas (Doering et al., 1999) y de la ingestión por células fagocíticas (Wang et al., 1995).

Las características antioxidantes de la melanina protegen a *C. neoformans* en su ambiente natural contra los organismos ameboides libres tales como *Acanthamoeba polyphaga* la cual puede matar a dichos organismos por mecanismos oxidativos (Bunting et al., 1979). La melanogénesis es regulada por factores genéticos y

fenotípicos (Casadevall y Perfect, 1988; 1994; Kwon-Chung et al., 1982; Rhodes et al., 1982). La actividad de la fenoloxidasa depende de la concentración de glucosa, iones Fe^{+3} y Cu^{+2} , presencia de glutamina y asparagina. Sin embargo, los iones como Mg^{+2} y Ca^{+2} y compuestos como NH^{+4} y NH_3 no interfieren con la actividad de la fenoloxidasa (Casadevall y Perfect, 1988; Polacheck et al., 1982). La fenoloxidasa es una enzima que se sintetiza en la fase estacionaria del crecimiento, cuando toda la glucosa se ha consumido porque las grandes cantidades de glucosa reprimen la actividad de la fenoloxidasa (Polancheck et al., 1982). Posteriormente, estudios realizados por Kwon-Chung et al. (1992) demostraron que una concentración mayor de 0.1 % de glucosa en los medios de cultivos inhiben la síntesis de la melanina.

2.9 Determinación de la variedad.

Kwon-Chung et al. (1982) propusieron un medio de cultivo que permitía la diferenciación de ambas variedades con alta especificidad. Se basa en la capacidad de la variedad *gattii* de resistir y crecer en presencia de canavanina y utilizar glicina como una fuente de carbono y nitrógeno. El sulfato de Canavanina ayuda a la tipificación de ambas variedades y el azul de bromotimol sódico actúa como indicador. En un estudio realizado por Canelo et al, en 1999, encontró que un 30 % de las cepas serotipo A son sensibles a 5 mg/L de canavanina y el 100 % de las cepas serotipo D son sensibles a esta concentración (Canelo et al., 1999). El 100 % de las cepas de *C. neoformans var. gattii* (serotipos B y C) resisten la canavanina hasta una concentración de 960 mg/L y asimilan glicina, transformándola en amonio, el cual alcaliniza el medio haciendo tornar

el indicador hacia un color azul cobalto (Kwon-Chung et al., 1982; Polacheck y Kwon-Chung, 1986).

La L-canavanina es un inhibidor metabólico de las enzimas que contienen L-arginina, se caracteriza por alterar su estructura terciaria y cuaternaria y por consiguiente la actividad biológica. La resistencia de *C. n. var. gattii* se ha atribuido a la presencia de un sistema capaz de degradar la L-canavanina y convertirla en compuestos no tóxicos (Polacheck y Kwon-Chung, 1986).

2.10. Características de la criptococosis.

La criptococosis es la cuarta causa de infección en pacientes de SIDA y se manifiesta en cerca de un tercio de estos pacientes (Powderly, 1993; Argüero y Garza, 1996). La incidencia de infección criptocócica en ellos ha sido estimada entre un 6 a 15 % en los Estados Unidos, Europa Occidental y Australia; Sin embargo, en África meridional el cuadro meníngeo ocurre en 15 a 30 % (Mitchell y Perfect, 1995). En 1959, Littman, notificó el primer caso de criptococosis en humanos directamente atribuido a la contaminación por excretas de paloma. A pesar de que el tracto respiratorio es la puerta de entrada de *C. neoformans*, las lesiones pulmonares son raras en pacientes con criptococosis. Cuando ocurren se presentan en forma de nódulos o neumonitis intersticial.

Cryptococcus neoformans tiene predilección por afectar el sistema nervioso

central ocasionando aracnoiditis difusa o lesiones ocupativas parenquimatosas (Dismukes, 1988; Liu, 1953). La aracnoiditis se caracteriza por la formación de un denso exudado leptomeningeo, compuesto de levaduras, fibras colágenas, linfocitos y células plasmáticas. Los pequeños vasos sanguíneos leptomeningeos suelen atraparse en dicho exudado inflamatorio con el subsiguiente desarrollo de cambios angeíticos y oclusión de luz, produciendo infartos cerebrales (Saul et al., 1986; Sung et al., 1991).

La diseminación hematógica del hongo puede causar lesiones en el corazón, hígado, riñones, suprarrenales, ojos, huesos, piel y próstata (Staib, 1987) y el 50 % de los pacientes pueden presentar rigidez de nuca (Stockstill y Kauffman, 1983). La próstata y el tracto urinario pueden ser nichos asintomáticos colonizados por *C. neoformans*, debido a la ineficacia del tratamiento antimicótico en esta área corporal (Arasted et al., 1996); la infección osteoarticular produce lesiones discretas que destruyen el tejido óseo primordialmente las prominencias de los huesos largos, huesos del cráneo y vértebras (Rippon, 1982). A medida que la enfermedad avanza se presentan crisis convulsivas, infartos cerebrales, alteraciones en los nervios craneales, disminución de la visión e hipertensión endocraneal (Ofner y Baker, 1987; Tan, 1988)

Los torulomas pueden presentarse en pacientes inmunocompetentes con meningitis, estas lesiones pueden ser únicas o múltiples y se localizan en cualquier parte del sistema nervioso central y son originados por la especie *Cryptococcus neoformans var. gattii* (Lui, 1953; Selby y Lopes, 1973). Los torulomas o criptococomas se caracterizan por ser lesiones anulares hipercaptantes y rodeadas de edema (Arrington et

al., 1984). Algunos pacientes presentan pseudoquistes gelatinosos, los cuales son un grupo de pequeñas lesiones quísticas (Popovich et al., 1990; Caldemeyer et al., 1997).

La meningitis empieza de forma insidiosa, con fiebre, cefalea, náuseas, cambios en el comportamiento y fotofobia (Salaki et al., 1984; Dismukes, 1988). Se puede tratar con anfotericina B a razón de 0.7 mg/kg/día asociada con flucitosina, a razón de 100 mg/día o itraconazol a razón de 400 mg/día durante ocho semanas (Vander Hast et al., 1997). La levadura *C. neoformans* tiene predilección por el SNC produciendo aracnoiditis difusa o lesiones ocupativas parenquimatosas (Dismukes, 1988; Liu, 1993).

2.11. Tratamiento de la criptococosis.

La principal función de la anfotericina B es dañar la membrana de las células fungales, inhibiendo la síntesis de ergosterol (Brajtburg et al., 1990; Georgopapadakou et al., 1987). Mediante esta inhibición se crean canales que producen la pérdida de potasio intracelular y otras moléculas constituyentes del medio intracelular lo que trae consigo un desequilibrio electrolítico en el interior de la célula, deshidratación y la muerte (Terrell y Hermans, 1987; Graybill y Craven, 1983; Sarosi, 1990). La anfotericina B debe administrarse intravenosa o intraarticularmente porque no se adsorbe por vía oral. Tiene acción tóxica severa, probablemente debido a sus efectos sobre las membranas de las células del paciente. En los túbulos renales y los glomérulos pueden presentarse nefrocalcinosis externa. Durante el tratamiento el paciente puede presentar fiebre, escalofríos, anorexia y vómitos. (Velez et al., 1984). No obstante los

niveles de anfotericina B en los tejidos y fluido cerebro espinal tiene baja acción fungicida (Dugoni et al., 1989; Collette et al., 1991).

Otro compuesto usado en el tratamiento de la criptococosis es la 5-fluorocitosina, la cual interfiere con la síntesis de ácidos nucleicos ADN y ARN. La citosina aminasa convierte el compuesto inicial en 5-fluorouracilo el cual se incorpora al ARN cambiando el código genético. Luego se convierte en fluorodeoxiuridina que inhibe la síntesis de ADN. El fracaso de la terapia con 5-fluorocitosina es que en muchos casos da lugar a la aparición de mutantes resistentes (Vélez et al., 1984). Sin embargo, estudios realizados por Barchiesi et al. (1999) señalan que la adición de iatraconazol, previene el desarrollo de células resistentes a la fluorocitosina debido a que el iatraconazol destruye la membrana celular, facilitando la penetración de la 5-fluorocitosina.

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. Por otra parte, estos compuestos inhiben las enzimas oxi y peroxioxidativas permitiendo la acumulación del H_2O_2 provocando la muerte celular (Vélez et al., 1984). También puede usarse el fluconazol combinado con anfotericina B, debido a que este azol no se acumula en la membrana del hongo permitiendo que la anfotericina B se una al ergosterol de la membrana celular desestabilizándola (Saag y Dismukes, 1988; Scheven y Schewegler., 1995). Se ha demostrado in vitro que el uso de anfotericina B y fluconazol reduce la

carga negativa de la levadura. Esto reduce la repulsión electrostática entre la célula levaduriforme y las células fagocíticas, permitiendo que el proceso de fagocitosis sea más efectivo (Nosanchuk et al., 1999).

Cryptococcus neoformans produce manitol el cual contribuye al edema cerebral e inhibe la función fagocítica. Además, este poliol actúa como fuente de energía y puede proteger a la levadura del estrés oxidativo y osmótico (Wong et al., 1990)

2.12. Diagnóstico de la criptococosis.

La criptococosis se puede diagnosticar mediante la presencia de antígeno utilizando la prueba de aglutinación de partículas látex (LCAT). En este procedimiento se añade antisuero de conejo hiperinmune a una suspensión de partículas látex, la cual se mezcla con diluciones de suero o líquido cefalorraquídeo y se coloca en un portaobjetos. La aglutinación de partículas látex se considera como una reacción positiva (Rippon, 1982). La aglutinación del látex se puede utilizar para supervisar el curso y la respuesta de la enfermedad al tratamiento por la determinación serial de los niveles de antígeno (Duppont et al., 1992).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción del lugar de estudio

El departamento del Atlántico se encuentra localizado geográficamente al Norte de la República de Colombia. Está situado en las siguientes coordenadas: 10° 16' 27" (sur de San Pedrito) y 11° 6' 52" (punta Augusta) latitud norte; 74° 42' 47" (margen izquierda del río Magdalena) y 75° 17' 20" (Punta de Juan Moreno) de longitud occidental. Por el norte y noroeste lo baña el mar Caribe; al oriente el río Magdalena; al suroeste y oeste limita con el departamento de Bolívar.

3.2 Recolección y procesamiento de muestras de excreta de paloma (*Columba livia*).

Durante la época de verano, desde el 30 de enero al 18 de febrero de 2003 se recolectaron 20 muestras de las heces fecales de la paloma *Columba livia*, fuera y dentro de los nidos en cada una de las siguientes áreas del departamento del Atlántico (Colombia): Sabanalarga, Galapa, Santo Tomás, Baranoa, Manatí, Usiacurí, Sabanagrande, Barranquilla, Repelón, Campeche, Ponedera y Campo de la Cruz. En Palmar de Varela donde solamente se recogieron 10 muestras (Figura 1).

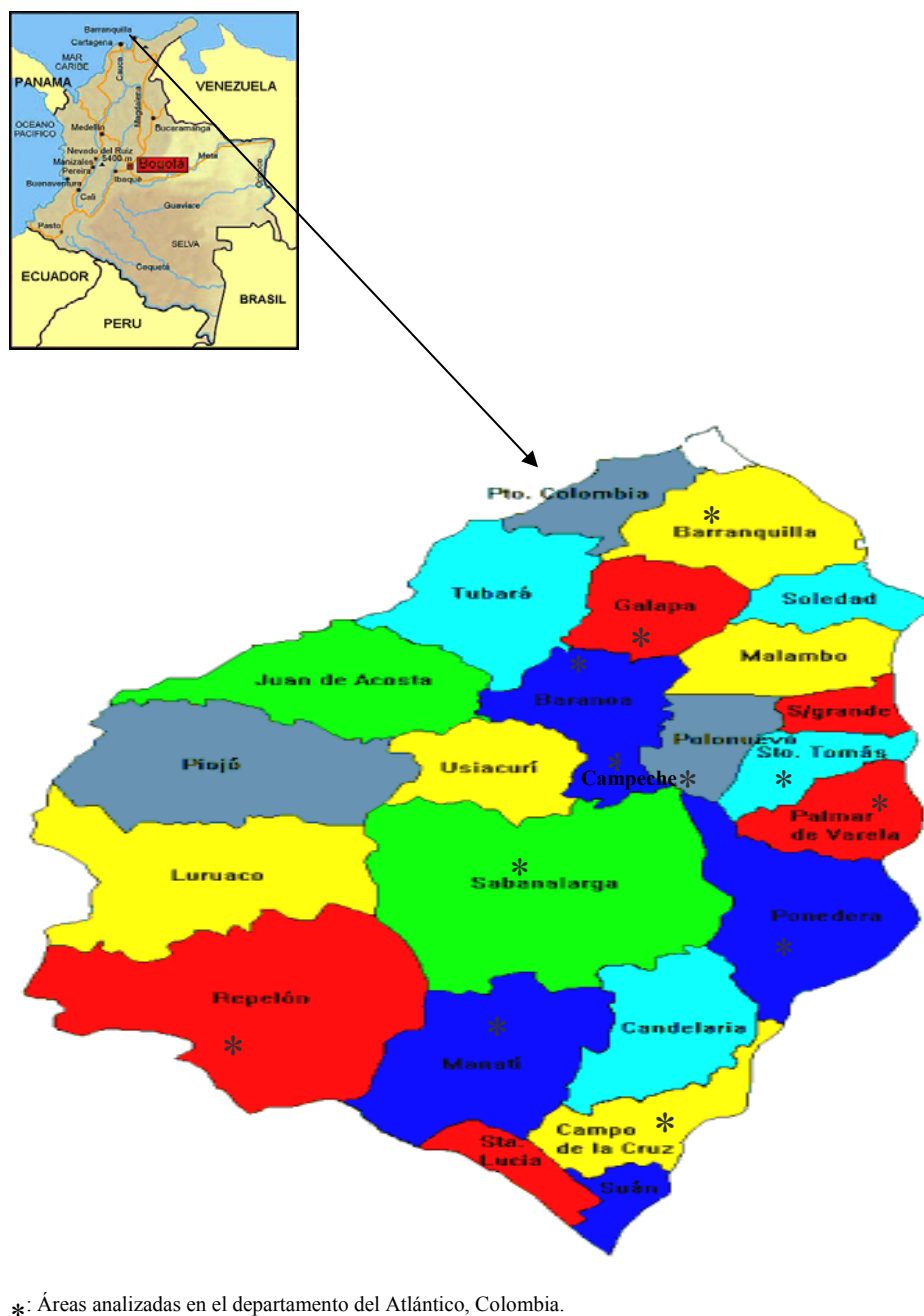


Figura 1. Ubicación del departamento del Atlántico en la República de Colombia y las áreas en donde se realizó la recolección de excretas de paloma para el aislamiento de la levadura *Cryptococcus neoformans*. (Tomado:<http://sabanalarga.galeon.com/id31.html>).

Se recolectaron 250 muestras de excreta de paloma se tomaron fuera y dentro de los nidos con cucharas plásticas estériles con la finalidad de evitar la contaminación cruzada de las muestras. En cada bolsa plástica se depositaron entre 5 y 10 gr. de excreta. Las bolsas fueron rotuladas indicando el lugar de recolección, fecha y ubicación de las heces fecales. Las muestras fueron transportadas y almacenadas en el laboratorio a temperatura ambiente durante 15 días; posteriormente fueron analizadas según el método de Ruiz et al. (1989) y Vélez (1987).

Un gramo de heces fecales de paloma se trituró en un mortero dentro de un gabinete microbiológico y se depositó en una botella que contenía 99 mL de solución salina estéril 0.85 % con penicilina y cloranfenicol. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 20 min. Se tomó un mL de sobrenadante de cada frasco y se vertió en tubos de ensayo los cuales contenían 9 mL de solución salina estéril y antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias (Staib, 1962). Dichas mezclas fueron homogenizadas manualmente durante 5 minutos y se dejaron reposar por 15 minutos. De cada una de las suspensiones se tomó 0.1 mL y se inoculó en platos Petri conteniendo “Niger Seed Agar” (NSA). Los platos se dejaron en el gabinete de seguridad biológica por espacio de 20 min. con la finalidad de que el líquido en exceso se absorbiera en el medio de cultivo. Las placas se rotularon, se sellaron con parafina, se incubaron a 28 °C por una semana, examinándose diariamente para detectar las colonias color café o marrón.

El medio de (NSA) se preparó pulverizando e hirviendo 50 grs de semilla (*Guizotia abyssinica*) en 200 ml de agua destilada por 25 min. El extracto de dicha

mezcla se obtuvo filtrando a través de una gasa estéril y se depositó en un Erlenmeyer de 1 L. Luego se le adicionó: 1 gr de glucosa, 1 gr de fosfato diácido de potasio, 1 gr de creatinina y 15 grs de Bacto Agar ajustándose el pH a 6.5 esterilizándolo en autoclave. Posteriormente, cuando el medio tenía aproximadamente una temperatura de 45 a 50 °C se le adicionó 1 gr de bifetil disuelto en 20 mL de alcohol absoluto y 10 mL de solución “stock” de antibióticos penicilina y cloranfenicol (Staib y Seeliger, 1968).

3.3 Recolección y procesamiento de muestras de almendro (*Terminalia catappa*).

Se recolectaron 34 muestras de detritos de almendro, en el parque Almendra Tropical de Barranquilla durante el mes de abril del 2003. Se tomaron 5 grs de las muestras de detritos de almendros y se diluyeron en 25 mL de solución estéril fosfato salina (PBS) con un pH 7.2. La mezcla se filtró con gasa estéril y se dejó reposar por 1 hora. Posteriormente, al extracto se le adicionó una solución de antibióticos 0.5 mL de penicilina y 0.5 mL de estreptomina. Se tomó 0.1 mL del sobrenadante y se inoculó en platos petri con NSA. Los platos se incubaron a 28 °C por 10 d. Dichas muestras fueron procesadas en el Instituto Nacional de Salud de Bogotá, Colombia.

Las colonias con pigmentación marrón o café fueron aisladas y sembradas en otros platos Petri con NSA, con el fin de obtener colonias puras. Luego se transfirieron a platos Petri con agar glucosado de Sabouraud (SDA) y se incubaron por 48 h a 25 °C para realizar las pruebas de confirmación (Moore y Jaciow, 1979).

3.4 Identificación de *Cryptococcus neoformans* mediante pruebas bioquímicas.

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para confirmar la presencia de la levadura, *Cryptococcus neoformans* (Miranda, 1984; Ruiz et al., 1989; Vélez, 1987), con algunas modificaciones.

3.4.1 Tinción de cápsula o prueba de tinta china.

Se colocó una porción de levadura *Cryptococcus neoformans* en un portaobjeto y se le añadió una gota de tinta china y agua estéril. Se realizó un frotis extendiéndolo por toda la laminilla usando otro portaobjeto y se dejó secar por espacio de 3 min. (Warren y Hazen, 1995). Posteriormente los frotis se observaron con el microscopio de luz y se tomaron fotografías utilizando un microscopio Olympus (BX 50).

3.4.2 Prueba de ureasa.

Inicialmente se preparó un caldo de urea Christensen y se esterilizó por filtración. se depositaron aproximadamente 3 mL de caldo en tubos de ensayo esterilizados y en cada uno de ellos se inoculó una porción de levadura de un cultivo de 48 horas en SDA. Posteriormente los tubos se incubaron a 28 °C por 7 d (Seeliger, 1956). La presencia de un color fucsia determina que la enzima ureasa metabolizó la urea y la utilizó como fuente de nitrógeno.

3.4.3 Prueba de asimilación de Carbohidratos.

Se preparó un medio de cultivo con agar Noble y 3 gr del carbohidrato a examinar (inositol, melibiosa y lactosa) y se esterilizó en autoclave por espacio de 30 min. Las cepas se estriaron en los platos Petri con medio de cultivo con el respectivo hidrato de carbono y se incubaron a 25 °C por 48 horas (Betancourt et al., 1998). El crecimiento de la levadura en el medio que contenía carbohidrato indica que el hongo asimiló el carbohidrato.

3.4.4 Prueba de crecimiento a 37 °C.

Una porción de un cultivo de 48 horas se inoculó en tubos de ensayos con SDA y se incubaron a 37 °C por 72 horas (Betancourt et al., 1998). El crecimiento de la levadura indica que puede fabricar las enzimas calcineurina A y la enzima superóxido dismutasa.

3. 5 Identificación de la variedad.

Se preparó el medio de agar de canavanina glicina azul de bromotimol (CGB). En un matraz de 1 L se adicionó 880 ml de agua destilada, 20 mL de solución B; dicha mezcla se preparó disolviendo 0.4 gr de azul bromotimol en 100 ml de agua destilada. Posteriormente se le adicionó 20 gr de Bacto Agar y se esterilizó la solución a 121 °C y 15 Lb. de presión por 30 min. Luego se preparó la solución A, mezclando 100 mL de agua destilada, 1 gr de fosfato de potasio ácido, 1 gr de tiamina y 30 mg de L-canavanina

sulfatada y se esterilizó por filtración (Kwon-Chung et al., 1982); esta mezcla fue vertida en el matraz que contenía la solución B y se sirvió en cada plato Petri 15 mL de medio (CBG).

Una porción de un cultivo de 48 horas de cada cepa de *C. neoformans* creciendo en (SDA) se inoculó y estirió en platos Petri conteniendo el medio de cultivo agar de canavanina glicina bromotimol azul. Posteriormente los platos se incubaron durante 5 días a 25 °C observándose diariamente con la finalidad de observar que especie alcalinizaba el medio al utilizar la glicina como fuente de nitrógeno.

3.6 Serotipificación de las cepas aisladas de las muestras de almendro.

Se tomó una porción de un cultivo de 48 h en agar glucosado de Sabouraud de *Cryptococcus neoformans* y se realizó una dilución de la levadura correspondiente al número 5 en la escala MacFarland. Posteriormente 15 µL de cada muestra y se mezclaron en una placa de vidrio con 15 µL de los antisueros correspondientes (Ikeda et al., 1982), para observar si ocurría el proceso de aglutinación y así determinar la presencia de los determinantes antigenicos.

RESULTADOS

4.1 Principales resultados de las pruebas bioquímicas.

Las colonias de *Cryptococcus neoformans* aisladas a partir del medio Níger Seed Agar se caracterizaron por presentar forma ovalada y variación en tamaño. Todas las cepas presentaron actividad fenoloxidasa, caracterizándose todas las cepas por presentar una pigmentación que oscilaba entre café a marrón (Figura 2).

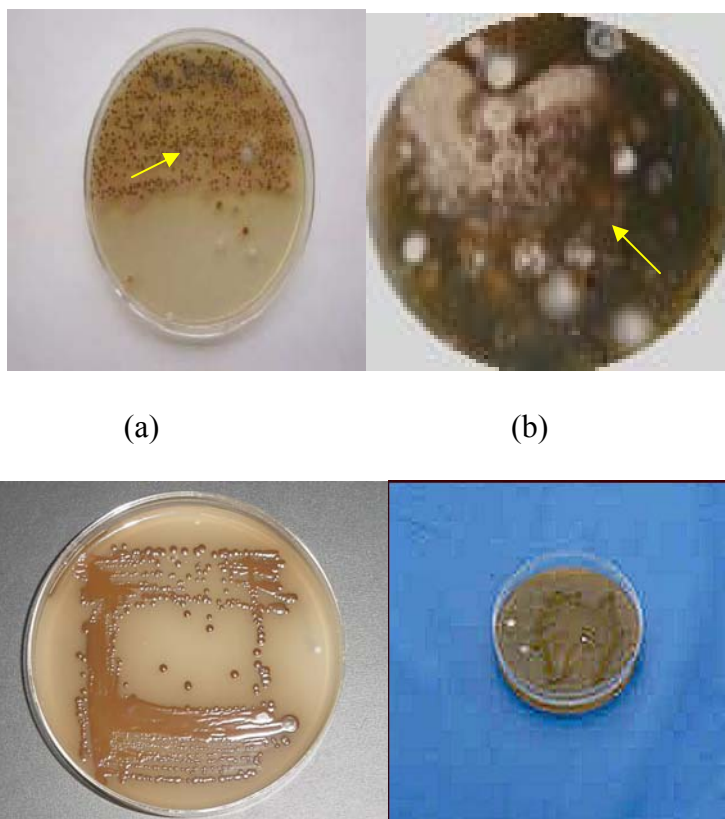


Figura 2. Colonias de *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* creciendo en Níger Seed Agar (NSA). (a) tomado de: <http://www.soeh.ubc.ca/Bartlett.pdf>, presentando actividad fenoloxidasa.

En la prueba de tinta china, el 100 % de las cepas se caracterizaron por presentar cápsulas polisacáridas de diversos tamaños, generalmente pequeñas, observándose en algunas la formación de gemas (Figura 3).

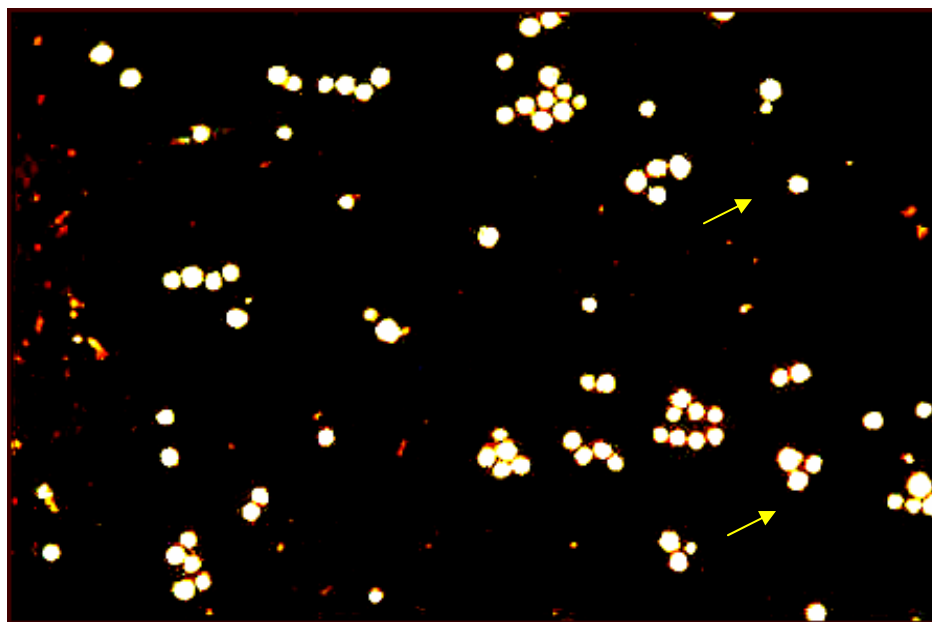


Figura 3. Observación de la cápsula polisacárida en *C. neoformans* y presencia de inicial del proceso de gemación (100X).

El 100 % de las cepas aisladas se caracterizaron por ser ureasa positivas entre el 4 y 5 día de incubación, presentándose un color fucsia, pero con cierta variación en cuanto a su intensidad en los tubos observados (Figura 4)

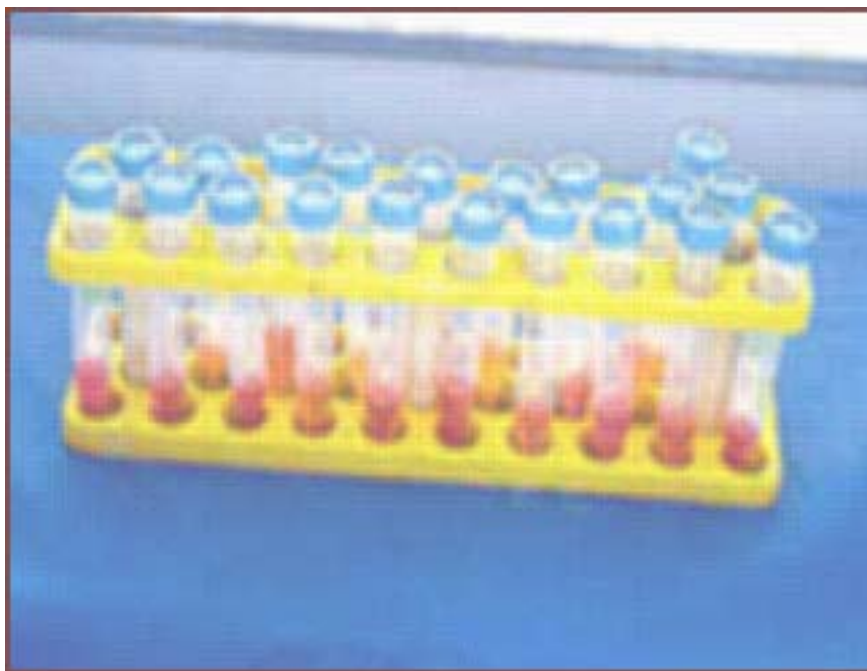


Figura 4. Proceso metabólico de la urea por *Cryptococcus neoformans* utilizando la enzima ureasa.

El 100 % de las levaduras aisladas a partir de excretas de paloma fueron tipificadas como *var. neoformans* porque se caracterizaron por ser sensibles a la canavanina. Después de cinco días de incubación a 28 °C, el color amarillo del medio glicina canavanina bromotimol azul permaneció inalterable y no hubo un crecimiento significativo de la levadura; sin embargo, las cepas aisladas a partir de los detritos de almendro crecieron y alcalinizaron el medio CGB, clasificándose todas las cepas como *Cryptococcus neoformans var. gattii* (Figura 5).

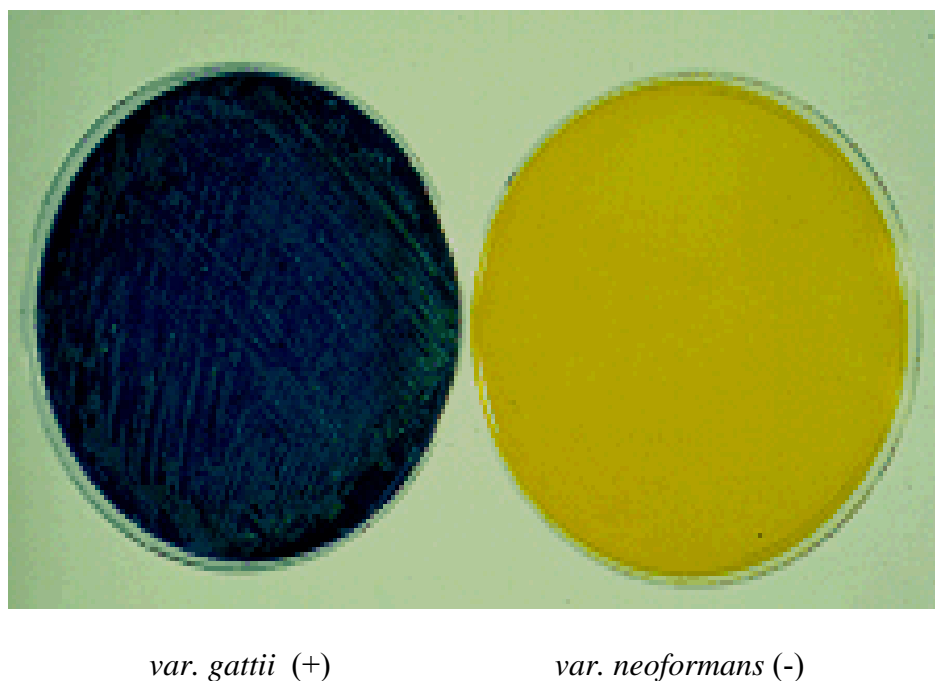


Figura 5. Presentación del crecimiento de *Cryptococcus neoformans* en medio de CGB tomado de [www: mycology.adelaide.edu/au/mycology/myco](http://www.mycology.adelaide.edu.au/mycology/myco).

En la prueba de asimilación de carbohidratos todas las levaduras aisladas a partir de las excretas de paloma, se caracterizaron por asimilar inositol como fuente de carbono, pero no asimilaron lactosa (Apéndice 12).

4.2 Porcentaje general de recuperación de la levadura en el área de estudio.

La levadura *C. n. var. neoformans* se aisló significativamente en un 61.5 % de las áreas estudiadas en el departamento del Atlántico. En el 38.5 % de las áreas restantes no

hubo aislamiento, destacamos que el 52 % de las muestras recolectadas en estos municipios fueron recogidas fuera de los nidos (Figura 6).

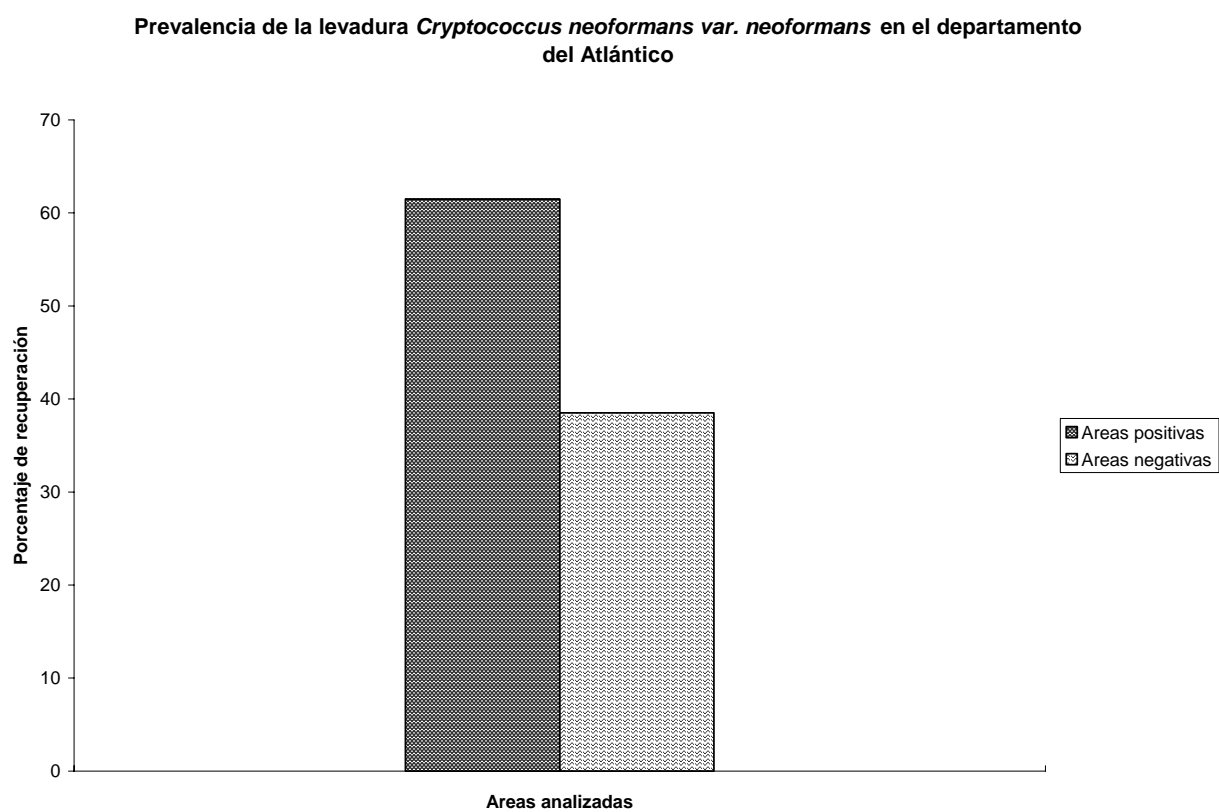


Figura 6. Porcentaje de prevalencia de la levadura *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* de acuerdo a las áreas analizadas.

4.3 Prevalencia la levadura *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* en el departamento del Atlántico en las áreas de estudio.

De las 250 muestras de excreta de paloma (*Columba livia*) recogidas dentro y fuera de los nidos durante la época de verano, se logró aislar la levadura *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* en un 12 % (Apéndice 1 y Figura 7).

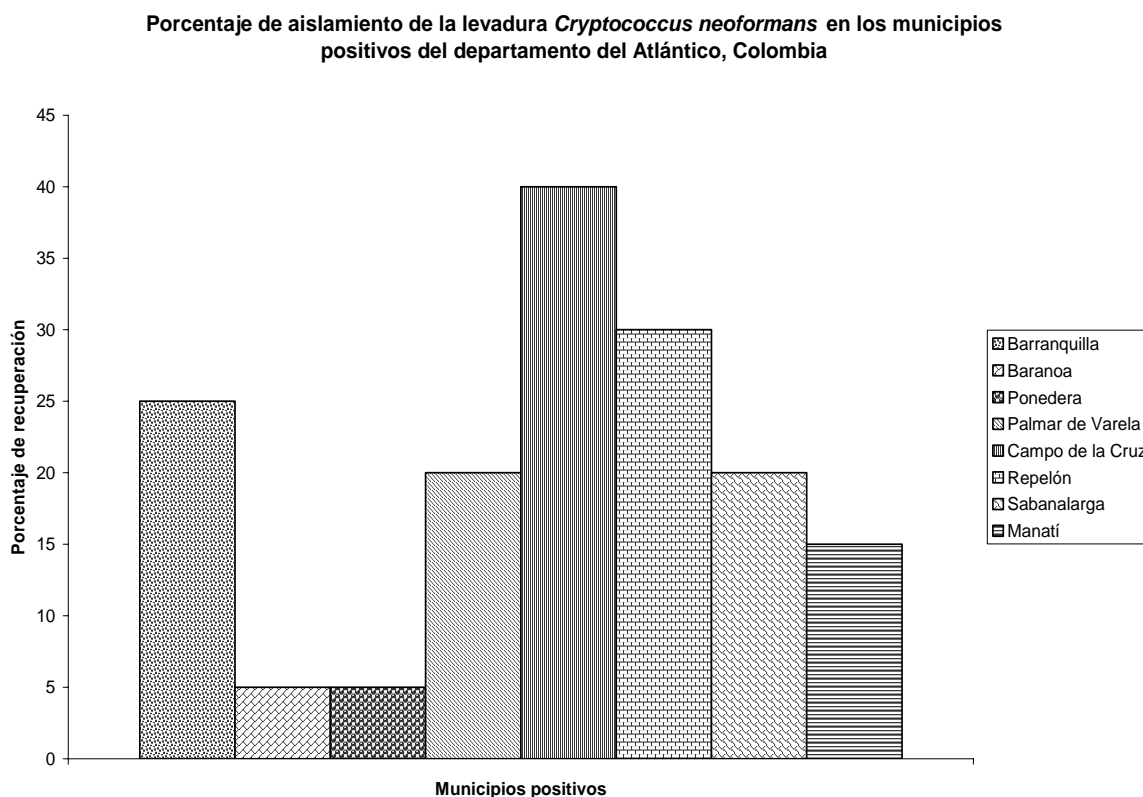


Figura 7. Porcentaje de aislamiento en las áreas del departamento del Atlántico donde se aisló la levadura *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*.

Por otro lado, se observó una mayor distribución de la levadura *C. n. var. neoformans* en las poblaciones ubicadas en el área semihúmeda, en el al sur del departamento del Atlántico(Figura 8).

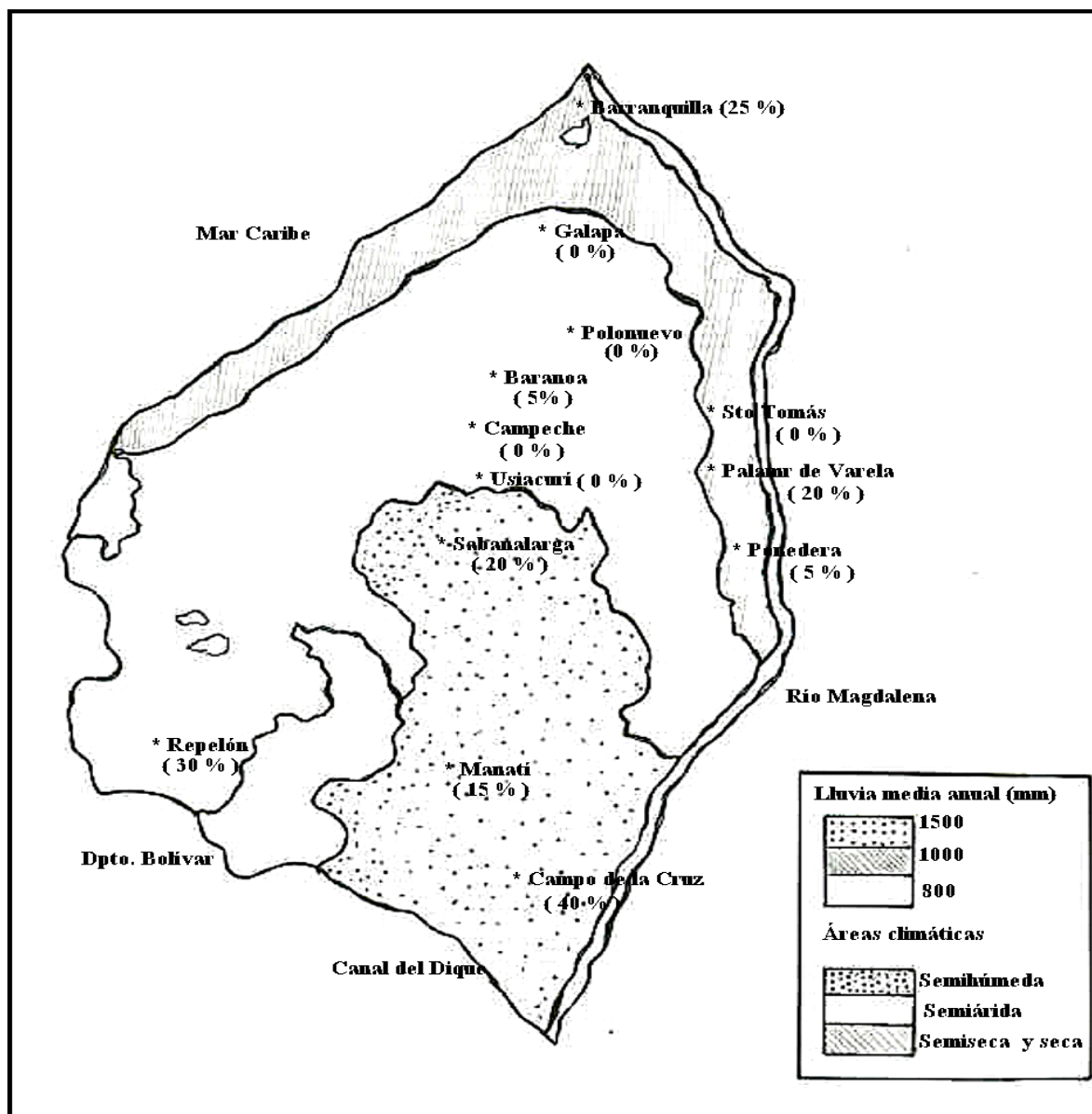


Figura 8. Distribución de la levadura *C. neoformans* en las diversas áreas climáticas presentes del departamento del Atlántico, Colombia y su precipitación pluvial (Tomado y modificado de IGAC, 1994).

4.4 Porcentaje general de aislamiento de la levadura al norte y sur del departamento del Atlántico, Colombia.

Comparando el porcentaje de recuperación de la levadura entre las poblaciones ubicadas al norte y sur del departamento donde se realizó el estudio, observamos que existe una diferencia significativa en cuanto al porcentaje de aislamiento. En el área sur se obtuvo un porcentaje de un 26.2 %, mientras que hacia norte se logró un 12 % (Figura 9).

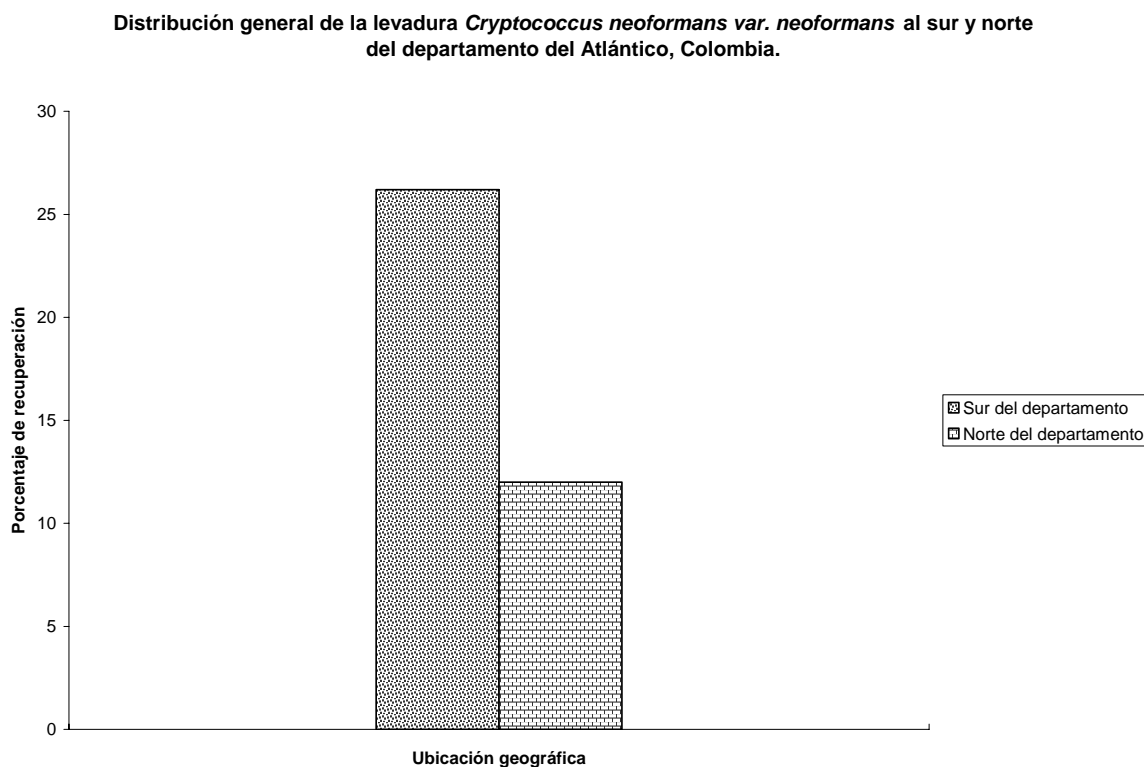


Figura 9. Porcentaje general de distribución de la levadura *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* de acuerdo a la ubicación de los municipios en el departamento del Atlántico, Colombia.

4.5 Porcentaje de aislamiento de la variedad *neoformans* y *gattii* en la ciudad de Barranquilla

La levadura *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotipo C se recuperó en un 17.4 % a partir de 34 muestras de detritos de almendro y la variedad *neoformans* en un 25 % a partir de las excretas de palomas recolectadas en Barranquilla (Figura 10). Así mismo, el 100 % de las cepas aisladas a partir de detritos de almendros, serotipificadas con anticuerpos monoclonales específicos de conejo correspondieron al patrón de aglutinación del serotipo C.

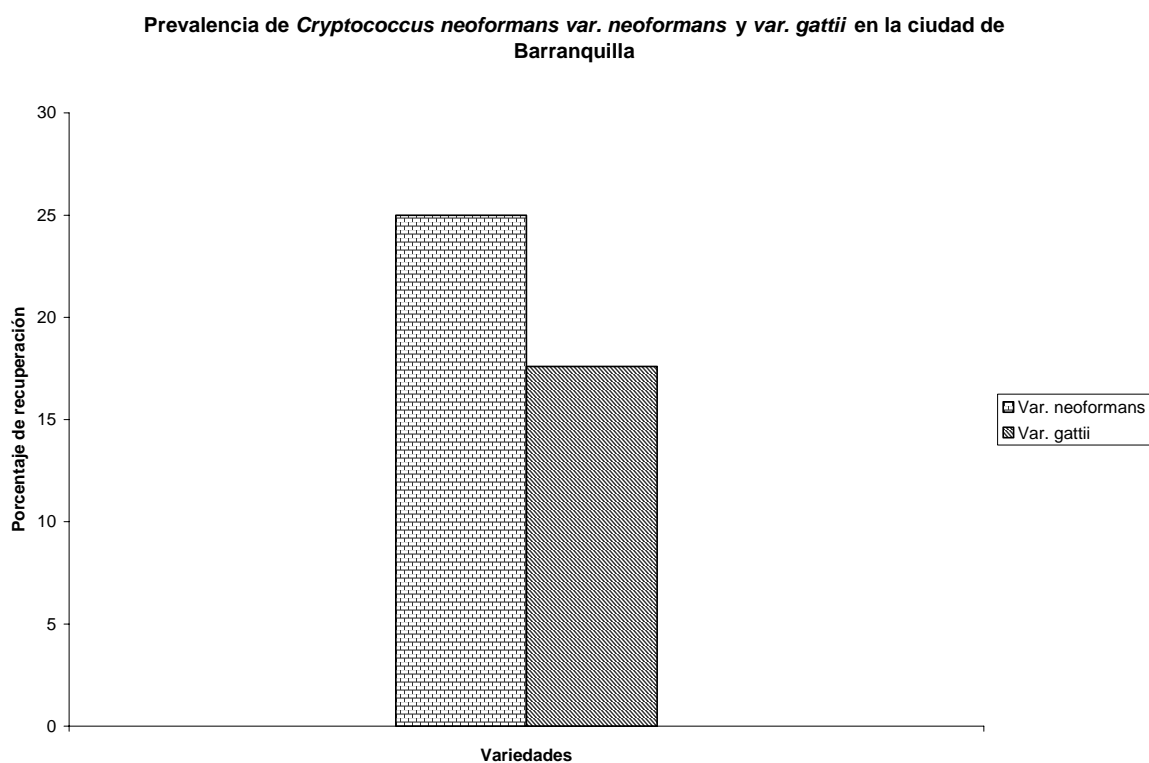


Figura 10. Porcentaje de prevalencia de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* y variedad *gattii* en Barranquilla, Colombia.

4.6 Frecuencia de la levadura de acuerdo a la ubicación de excretas dentro y fuera de los nidos.

La levadura *Cryptococcus neoformans var. neoformans* se recuperó en un 19.4 % a partir de las 154 muestras de excretas recolectadas dentro de los nidos, mientras que en las otras 96 muestras de excretas recogidas fuera del nido no hubo aislamiento (Apéndice 2)

4.7 Prueba estadística Chi cuadrado de Pearson.

Los datos obtenidos a partir del análisis estadístico mediante la prueba Chi cuadrado de Pearson verifican la hipótesis alterna, es decir la presencia de la levadura en el área de estudio depende de factores climatológicos y del sitio donde se recolecten las muestras, existiendo una diferencia significativa entre los aislamientos de la levadura realizados fuera y dentro de los nidos (X: 41.67; P: 0.0002), (Apéndice 3).

DISCUSIÓN

Las formas de las levaduras se caracterizaron por ser redondas u ovaladas. La regulación de la forma de las células es un proceso muy complejo influenciado por ciertos factores como presión osmótica, temperatura y nutrición (Nosanchuck et al., 1999). Además, existen ciertos genes específicos que regulan la forma en algunos tipos de células de levaduras (Drgonova et al., 1996).

Todas las cepas aisladas se caracterizaron por la presencia de actividad fenoloxidasa. La pigmentación marrón se originó debido a que esta enzima causa la oxidación del ácido cafeico (ácido 3, 4 dihidroxitranscinámico) presente en el extracto de las semillas *Guizotia abyssinica* (Strachan et al., 1971) produciéndose un pigmento parecido a la melanina.

La prueba de tinta china se caracterizó porque el tinte utilizado no penetró en la cápsula debido a la repulsión electrostática existente entre las cargas negativas del colorante y la estructura polisacárida. Esto provocó el depósito de partículas de carbono alrededor de la cápsula (Harley y Prescott., 1999). La presencia de la carga negativa en la levadura se le atribuye a la presencia del ácido glucorónico (Kozel et al., 1980) y a la presencia de melanina (Nosanchuk y Casadevall., 1977). Durante la observación de las cápsulas se presenciaron diversos tamaños ya que esta característica fenotípica puede ser alterada por las diferentes condiciones ambientales, como la concentración de gas carbónico, temperatura, pH y las características genotípicas de cada cepa.

En la prueba de urea, la enzima ureasa hidrolizó el enlace nitrógeno y carbono presente en la amida, formando gas carbónico, agua y fundamentalmente, amonio el cual incrementa el pH del medio produciendo el color fucsia

El medio de CGB se utilizó para distinguir la variedad y serotipo de las cepas aisladas. Las cepas aisladas a partir de las excretas de paloma no crecieron en L-canavanina, porque este compuesto se caracteriza por inhibir su crecimiento, evitando la síntesis de proteínas y la síntesis de RNA (Vecchiarelli, 2000).

La canavanina se caracteriza por inhibir las enzimas que contienen L-arginina, alterando su estructura terciaria y cuaternaria y por consiguiente su actividad biológica. Por lo tanto deduzco que todas las cepas aisladas pertenecen a la variedad *Cryptococcus neoformans var. neoformans* (serotipos A o D). Caso contrario, las cepas aisladas a partir de los detritos de almendros crecieron en el medio de CGB. Esta resistencia de *C. neoformans var.gattii* a la canavanina se le atribuye a la presencia de un sistema enzimático capaz de degradar la canavanina y convertirla en compuestos no tóxicos (Polacheck y Kwon Chang, 1986).

La prueba de asimilación de carbohidratos se realizó para medir la capacidad de la levadura para utilizar en forma aerobia los carbohidratos como fuente de carbono, siendo este un criterio ampliamente utilizado como la base de la diferenciación taxonómica de las especies (Phaff et al., 1978).

Esta característica depende de factores de permeabilidad de la membrana y de la presencia de sistemas enzimáticos específicos que favorecen la degradación de los carbohidratos. Las reacciones metabólicas que se requieren para obtener este proceso involucran una cadena de varias enzimas que son controladas por genes estructurales. Para que una levadura pueda hidrolizar azúcares se necesitan genes inductores de una permeasa específica para cada azúcar, que facilite la entrada del azúcar a la célula, y cuando éste ha sido hidrolizado se necesita otro gen que codifique la represión de esa permeasa. Si las levaduras presentan cambios en la permeabilidad de la membrana y en uno o varios de los genes estructurales que controlan las reacciones enzimáticas, no serán capaces de utilizar los carbohidratos como fuente de energía (Lodder, 1988; Phaff et al., 1978). Posiblemente *Cryptococcus neoformans* no asimila lactosa porque no tiene la capacidad de sintetizar la enzima β - galactosidasa o lactasa, la cual actúa sobre el disacárido hidrolizándolo en galactosa y glucosa. De igual forma, no asimila melibiosa por no sintetizar melibiasa o α - galactosidasa.

Los resultados revelan una frecuencia inferior de aislamiento comparados con los reportes de otras investigaciones llevadas a cabo en Colombia. En la revisión de la literatura nacional se reporta la presencia de la levadura *Cryptococcus neoformans* a partir de excretas de palomas (*Columba livia*). En Medellín, Mira et al. (1968) reportaron el aislamiento del hongo en un 18.8% de las muestras analizadas; Ordóñez y Castañeda (1994) también informaron el hallazgo de la levadura en un 53.8% a partir de 52 muestras de excretas de palomas en varias ciudades de Colombia (Bogota, Cali y Cúcuta) y

Caicedo et al. (1996) reportaron en Cali un aislamiento de un 49.6 % a partir de excretas de paloma (Apéndice 4).

Esta discrepancia en cuanto al porcentaje de aislamiento de la levadura puede ser por las diferencias climatológicas presentes en cada una de las áreas donde se han llevado a cabo donde se realizaron los diversos estudios. Por ejemplo, en Medellín la temperatura promedio es de 15 °C con una humedad relativa del 94 % y en Cali la temperatura es de 24 °C y una humedad relativa del 98 %. Además, en estas regiones las precipitaciones pluviales varían de 1500 mm hasta los 3500 mm. Posiblemente, estos factores climáticos son más favorables para el crecimiento de la levadura, comparados con las condiciones climáticas que presentan cada uno de los municipios del departamento del Atlántico (Apéndice 5).

Este es el primer aislamiento de *C. neoformans* a partir de excretas de paloma (*Columba livia*) que se realiza en el departamento del Atlántico, Colombia. Los datos demuestran que *C. neoformans* prevalece en el departamento, pero con una distribución variada en cada municipio (Figura 7 y 8). Sin embargo, el porcentaje de aislamiento de la levadura (12 %) está de conformidad con los datos divulgados en la literatura científica mundial. Algunos autores reportan un rango de recuperación comprendido entre el 0 a 24 % (Lazera et al., 1993; Swine et al., 1986; Ruiz et al., 1989); mientras otros autores sostienen que el rango de aislamiento de *C. neoformans* a partir de las excretas de paloma está comprendido entre el 6 % y 87.5 % (Lazera et al., 1993; Castañon-Olivares y López-Martínez, 1994).

La recuperación de la levadura a partir de las excretas localizadas dentro de los nidos mostró un porcentaje significativo de aislamientos en un 19.4 %, siendo nula la recuperación de las levaduras a partir de las 94 muestras recolectadas fuera del nido. Probablemente esto se deba a las condiciones ambientales a las que estaban sometidas las excretas localizadas fuera de los nidos, fundamentalmente el bajo grado de humedad presente durante la época de verano, la radiación solar y la competencia con otros microorganismos los cuales son letales para el crecimiento del hongo, primordialmente sobre las muestras recogidas del suelo (Apéndice 6).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran una estrecha distribución del hongo en nuestro medio, no obstante su presencia nos indica que hay probabilidad que los individuos inmunosuprimidos sean infectados con la levadura, produciéndose en ellos criptococosis. Así lo indican los reportes estadísticos ofrecidos por el Hospital Universitario de Barranquilla (Apéndice 7).

Posiblemente uno de los factores que incidió en el bajo porcentaje de aislamiento de la levadura (12 %) fue la baja precipitación pluvial y humedad relativa que se presenta en el departamento del Atlántico durante el periodo de verano (diciembre- abril). La poca precipitación se debe a los vientos alisios del noroeste que impiden la formación de nubes en el sector y a la baja altimetría del área geográfica. Estos factores determinan que en la región se den tres tipos de áreas climáticas, siendo una de ellas la zona semihúmeda, al sur del departamento, donde se logró el mayor número de aislamientos. En esta área la humedad relativa aumenta considerablemente debido a la evaporación de las aguas de las

ciénagas, del embalse del Guájaro y el canal del dique que circundan el sector. Esta condición pudo haber incidido en una mayor prevalencia de la levadura en el sector sur del departamento 26, 25 % comparado con el 12 % de aislamiento del resto de las áreas estudiadas. Estudios in vitro han señalado que una gran humedad relativa es fundamental para el crecimiento de la levadura (Ishaq, 1968; Ruiz, 1981) y en esta zona los valores de la humedad relativa fluctúan entre el 77 y 88 % (IGAC, 1994).

En los municipios de Usiacurí, Ponedera, Polonuevo, Campeche y Galapa los aislamientos fueron escasos debido a que estas poblaciones están ubicadas en un área donde la precipitación pluvial es escasa y por consiguiente la humedad relativa es baja. Además, el 52.1 % de las muestras de excretas fueron recolectadas fuera de los nidos lo cual pudo provocar que sobre ella incidieran una serie de factores adversos como radiación solar la cual es letal para el crecimiento de la levadura a pesar que se ha demostrado que la levadura puede sintetizar manitol, inositol, la enzima superóxido dimutasa, melanina y la cápsula polisacárida que ayudan al crecimiento de la levadura cuando las condiciones ambientales son estresantes.

Uno de los factores que incidieron en la recuperación de la levadura *Cryptococcus neoformans var. neoformans* fue que el 61.6 % de las muestras fueron recolectadas dentro de los nidos, las cuales estaban protegidas de las condiciones ambientales adversas. La gran frecuencia de aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en nidos (19.4 %) fue significativa con respecto a los otros lugares donde se recolectaron las muestras de excretas (Apéndice 2). Estos resultados son afines a los alcanzados por Caicedo et al.

(1996) a partir de excretas recolectadas dentro de los nidos.

En los nidos las heces se acumulan y permanecen durante largo tiempo protegidas de la radiación solar, lo cual favorece a la supervivencia y crecimiento de la levadura. Estudios recientes indican que *C. neoformans* puede sintetizar melanina o pigmentos parecidos que protegen a la levadura de las extremas temperaturas y radiación solar y degradación enzimática de microorganismos presentes en las excretas y suelo (Nosanchuk y Casadevall. 1997). Así mismo, se ha observado que un alto acumulo de heces dentro de los nidos constituye un elemento importante para mantener el hongo en la naturaleza. (Silva y Luiza., 1963). No obstante, el tiempo de almacenamiento de las excretas pudo haber incidido en la recuperación de la levadura en los nidos. Algunos autores proponen que la levadura puede permanecer hasta por lo menos dos años en las heces fecales; es factible que un período mayor a lo propuesto incida en que las fuentes de nitrógeno pierdan su viabilidad provocando desaparición de la levadura.

Se observó que una alta densidad de palomas en los nidos (Apéndice 8) es una condición indispensable que puede incidir en el aislamiento de la levadura ya que se pueden acumular gran cantidad de excretas en forma rápida y brindar al hongo las condiciones adecuadas para su crecimiento. Esto concuerda con lo expresado por Emmons en 1955 y Swinne, en 1975 quienes sostuvieron que la acumulación diaria de heces, la alta población de palomas en los nidos y una insuficiente aeración favorece el incremento de la frecuencia de *C. neoformans* en el aire, dentro de los nidos. Sin embargo, se observó una distribución variable de *C. neoformans* en las heces de paloma

recolectadas dentro de los nidos debido a que variaciones como el pH, el ácido úrico y la concentración de creatinina pueden incidir en la recuperación de la levadura (Hubalek, 1975).

Se analizaron únicamente excretas secas porque en las excretas frescas existe una alta proliferación de microorganismos, la cual puede aumentar durante las deyecciones de los pichones. Está demostrado que las excretas tienen una alta población de bacterias que pueden alcalinizar el medio inhibiendo el crecimiento de *C. neoformans* y más aún cuando el proceso de secamiento de las excretas ocurre lentamente. Esto favorecería el crecimiento y la proliferación de microorganismos inhibidores afectando el aislamiento de la levadura. Sin embargo, bajo condiciones naturales el rápido secamiento de las excretas de paloma suprime la multiplicación de las bacterias (Walter y Yee, 1968) creando la posibilidad de aislar el hongo a partir de excretas secas (Swinne-Desgain, 1974; Gugnani y Njok-Obi, 1973). Este estudio se confirma una vez más que la variedad *gattii*, no prevalente en las excretas de paloma, ya que esta variedad tiene una baja tolerancia por los altos niveles de creatinina (Baro et al., 1998).

Del 61.5 % (8/13) de los municipios analizados en el departamento del Atlántico, Barranquilla presentó la mayor incidencia de casos de criptococosis (Apéndice 7) debido a que en esta área es donde se encuentra la mayor tasa de individuos afectados con el virus de inmunodeficiencia humana (Apéndice 9). Las cifras estadísticas del Hospital Universitario de Barranquilla (HUB), Colombia, revelan que la criptococosis se ha incrementado notoriamente a partir del año 2002 en esta ciudad debido a que esta

condición está relacionada esencialmente con el aumento de pacientes VIH positivos. A pesar de que la mayor frecuencia de aislamiento de la levadura se observó al sur del departamento (26.2 %) no existe ningún informe de casos de criptococosis en esta zona, debido a la poca incidencia de casos de pacientes VIH positivos (Apéndice 10) la cual es una de las principales causas imprescindibles para que una persona se infecten con la levadura.

Dentro de los casos diagnosticados de criptococosis en el HUB, no se informó la variedad, sin embargo, infiero que pueden ser *C. neoformans var. neoformans* ya que fue la especie que predominó en el 100 % de los aislamientos de excretas de paloma y comúnmente es la que causa la infección criptococócica en individuos VIH positivos. No obstante, el aislamiento de *C. n. var. gattii*, a partir de detritos de almendro en Barranquilla hace necesario que se realicen otros estudios para verificar si existe una la relación entre las cepas aisladas clínicamente y los aislamientos en estos ambientes. Esto constituiría una herramienta útil en el reconocimiento de las posibles fuentes de contaminación y la conducta terapéutica a seguir en el tratamiento de la infección.

De los casos diagnosticados de criptococosis en el HUB los pacientes procedían: uno de Polonuevo, dos de Soledad, uno de Palmar, uno de Baranoa y el resto en Barranquilla (Apéndice 7). De los anteriores lugares de procedencia solamente en Polonuevo no se pudo aislar la levadura y en el municipio de Soledad, donde no se realizó el estudio. Es recomendable analizar esta área en estudios futuros ya que después del municipio de Barranquilla es la que presenta la mayor proporción en cuanto a la

diagnos de criptococosis y pacientes VIH positivos en el departamento del Atlántico. La presencia de la levadura se diagnóstico en su mayor parte en pacientes VIH positivo, lo cual confirma que esta condición es uno de los factores más preponderantes para el contagio.

Destaco que la mayoría de los casos de criptococosis se diagnosticaron entre los meses de agosto a diciembre del 2002. En un futuro es importante realizar otros estudios para determinar la prevalencia de la levadura durante el periodo de invierno. Estudios realizados por Choundhry et al. (1967) sostienen que el crecimiento y supervivencia de la levadura es mayor durante esta época de invierno por las bajas temperaturas y la alta humedad. La recuperación de *C. neoformans* a partir de las excretas de paloma en el departamento del Atlántico corroboran que los nichos aviarios sirven de reservorio saprofítico para este hongo patógeno y que estos pueden ser una posible fuente de infección para los colombicultores de esas zonas.

El primer aislamiento ambiental de la variedad *gattii* se realizó en Australia a partir de *E. camaldulensis* (Ellis y Pfeiffer, 1990). Generalmente, la variedad *gattii* puede aislarse de áreas tropicales y subtropicales (Kwon-Chung y Bennett, 1984; Bennett et al., 1977). Sin embargo, se han obtenido aislamientos en áreas templadas en México, Sur América (Bava y negrón, 1992; Gezuele et al., 1993), España, Portugal e Italia (Martins et al., 1996; Montagna et al., 1997).

A través de esta investigación se logró recuperar por primera vez la *var. gattii*, serotipo C en un 17.4 % a partir de detritos de almendro (*Terminalia catappa*) en la ciudad de Barranquilla. Estos resultados corroboran los hallazgos realizados por Callejas et al (1998), quienes realizaron el primer aislamiento ambiental del serotipo C a partir de detritos de almendro en la ciudad de Cúcuta, Colombia. Posiblemente, bioproductos tales como la celobiosa y la xilosa obtenidos mediante la biodegradación de la lignina por medio de la fenoloxidasa permitan el crecimiento saprofítico de la levadura en este tipo de substrato o puedan existir otros compuestos orgánicos e inorgánicos necesarios para la supervivencia del hongo en medio ambiente (Callejas et al., 1998).

Estos resultados corroboran lo expresado por Staib et al. (1972) quienes indicaron que las hojas y los tallos en descomposición eran una fuente importante para el crecimiento de *C. neoformans*. Sin embargo, el hecho de que la recuperación se haya realizado a partir de estos árboles no indica que sea el nicho natural de esta levadura. Es necesario realizar otras investigaciones para determinar si la recuperación de la levadura está relacionada con los detritos de almendro y la época de verano o si puede recuperarse durante otros meses. Este hallazgo es de suma importancia a nivel epidemiológico y ecológico ya que podría ser una fuente de contagio, a pesar del poco conocimiento que se tiene de casos de criptococosis ocasionados por el serotipo C, solamente. A nivel mundial se han diagnosticados casos de criptococosis por esta variedad enfermedad en pacientes VIH positivos en Soweto, África (Kartaes et al., 2002; Bogaerts et al., 1993).

El aislamiento ambiental de *C. neoformans* var. *gattii* a partir de detritos de almendros y los otros aislamientos realizados anteriormente por otros autores a partir de árboles de *Eucalyptus*, *Moquilea tomentosa* y *Guettarda acraneana* podrían sugerir que el habitat natural para la variedad *gattii* sería en plantas y madera en descomposición. Parece que existe una asociación específica entre la variedad *gattii* y los árboles de almendros ya que los resultados de las dos investigaciones no revelan el aislamiento de la variedad *neoformans*. Se abre la posibilidad de realizar un estudio a gran escala a nivel de estos árboles ya que presentan una gran distribución en la ciudad de Barranquilla y en el resto del departamento, con el fin de establecer si estas plantas sirven de hospederos a estos microorganismos.

La prevalencia de ambas variedades en la ciudad de Barranquilla (Figura 10) y los casos diagnosticados de criptococosis en esta población crea la posibilidad de que las personas inmunosuprimidas como también las inmunocompetentes puedan contagiarse al entrar en contacto con los substratos donde fueron aislados los microorganismos, especialmente porque las muestras para ambos estudios proceden de parques recreativos donde asisten a menudo muchas personas.

CONCLUSIONES

Cryptococcus neoformans var. *neoformans* está presente en el departamento del Atlántico.

La baja humedad relativa y la poca precipitación pluviales durante la época de verano no son favorables para el crecimiento de la levadura en gran proporción.

La levadura *C. neoformans* var. *gattii* puede aislarse a partir de los detritos de árboles de almendro.

La prevalencia de *C. neoformans* en el medio ambiente es fuertemente influenciada por la presencia de heces de paloma y cuando están protegidas de las radiaciones ultravioleta y de las temperaturas extremas.

Cryptococcus neoformans produce criptococosis en pacientes VIH positivos.

La criptococosis es una enfermedad oportunista que predomina en el departamento del Atlántico en individuos VIH positivos.

RECOMENDACIONES

1. Utilizar la concentración de bifenil de 0.1 g//L propuesta por Shields y Ajello (1966), en lugar de la de 1 g/L, utilizada en este estudio.
2. Medir la humedad relativa y temperatura en cada lugar donde se recolecten las muestras.
3. Realizar el estudio en diversas épocas del año tanto para cualquier tipo de aislamiento que se quiera realizar.
4. Realizar estudios a nivel clínico y compararlos con los aislamientos ambientales mediante técnicas moleculares con el fin de establecer si existe una relación entre ellas.
5. Efectuar la serotipificación de las cepas aisladas.
6. Investigar la relación existente entre la levadura y otros tipos de excretas fundamentalmente las provenientes de las estaciones avícolas las cuales son numerosas en el departamento.
7. Realizar el estudio a partir de muestras de almendro en otras localidades del departamento del Atlántico, Colombia.

8. LITERATURA CITADA

- Abou-Gabal, M y M. Atia. 1978. Study of the role of pigeons in the dissemination of *Cryptococcus neoformans* in nature. *Sabouraudia*. 16: 63-68.
- Ajello, L. 1958. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soil. *Am. J. Hyg.* 67: 72-77.
- Ansheng, L. K., K. Nishimura, H. Tagachi, R. Tanaka, W. Shaoxi y M. Miyaji. 1993. The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinically sourced isolates in China. *Mycopathol.* 124: 1-5.
- Arastéd, K., F. Staib, G. Grosse, U. Futh y M. L'Age. 1996. Cryptococcosis in HIV infection of man: an epidemiological and immunological indicator. *Zbl. Bakt.* 284: 153-163.
- Arguero, L. B., G. D. Garza y Z. M. Torres. 1996. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans var. gattii* de *Eucalyptus tereticornis*. *Rev. Iberoam. Micol.* 13: 27-28.
- Arrington, J. A., F. R. Murtagh, C. R. Martinez y H. N. Schnitzlein. 1984. CT of multiple intracranial cryptococcoma. *Am. J. Neuroradiol.* 5: 472-473.
- Aulakh, H. S., S. E. Straus y K. J. Kwon-Chung. 1981. Genetic relatedness of *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*) and *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus bacillispora*) determined by DNA base composition and sequence homology studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 31: 97-103.
- Bava, A. J. y R. Negroni. 1992. Características epidemiológicas de 105 casos de criptococosis diagnosticados en República de Argentina entre 1981-1990. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 34: 335-340.
- Barchiesi, F., D. Gallo, F. Caselli, L. Falconi, D. Arzeni, A. Giacometti y G. Scalise. 1999. In vitro interactions of itraconazole with flucytosine against clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J. Antimicrobial. Chemotherapy.* 44: 65-70.
- Baro, T., M. J. Torre-Rodríguez, M. H. De Mendoza, Y. Morera y C. Alía. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans var. gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 36: 458-461.
- Bauwens, L., D. Swinne, C. De Vroey y W. de Meurichy. 1986. Isolation of *Cryptococcus neoformans var. neoformans* in the aviaries of the Antwerp Zoological Garden. *Mykosen.* 29: 291-294.

- Blasi, E., R. Barluzzi. R. Mazzolla. B. Tancini. S. Saleppico. M. Puliti. L. Pitzurra y F. Bistoni. 1995. Role of nitric oxide and melanogenesis in the accomplishment of anticryptococcal activity by the BV-2 microglial cell line. *J. Neuroimmunol.* 58: 111-116.
- Bennett, J. E., K. J. Kwon-Chung y D. Howard. 1984. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* 105: 582-586.
- Bennett, J. E., K. J. Kwon-Chung y T. S. Theodore. 1978. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouradia.* 16: 167.
- Bennett, J. E. y K. J. Kwon-Chung. 1988. Correlates of Serotype in *Cryptococcus neoformans* In: Drouhet E. Cole G. T, de Repentigny L. Latgé J. P. And Dupont B. *Fungal Antigens. Isolation, purification, and detection.* New York, Plenum Press. 265-271.
- Betancourt, C., O. Lozada y B. Ortiz. 1998. Introducción a la Micología Médica. Mayagüez, Puerto Rico. 168-169 pp.
- Boekhout, T., A. A. C. Van Belkum, H. A. Leenders, P. Verbrugh, D. Mukamurangwa, D. Swinne y W. A. Scheffers. 1997. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans*: taxonomic and epidemiological aspects. *Int. J. Sist. Bacteriol.* 47: 432-442.
- Bagaerts, J., H. Taelman, J. Batungwanago. P. Van de Perre y D. Swinne. 1993. Two cases of HIV-associated cryptococosis due to variety *gattii* in Rwanda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87: 63-64.
- Brajtburg, J., W. C. Powderly, G. S. Kobayashi y G. Medoff. 1990. Amphotericin B: Current understanding of mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother.* 34: 183-188.
- Bulmer, G. S. 1990. Twenty five years with *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol.* 103: 111-122.
- Bulmer, G. S. y M. D. Sans. 1967. *Cryptococcus neoformans*. II. Phagocytosis by human leukocytes. *J. Bacteriol* 94: 1480-1483.
- Bunting L., J. B. Neilson. y G. S. Bulmer. 1979. *Cryptococcus neoformans*: a gastronomic delight of a soil ameba. *Sabouraudia.* 17: 225-232.
- Caldemeyer, K. S., V. P. Mathews, M. K. Edwards-Brown y R. R. Smith. 1997. Central nervous system cryptococcosis: Parenchymal calcification and large gelatinous pseudocyst. *Am. J. Neuroradiol.* 18: 107-109.
- Callejas, A., N. Ordóñez. M. C. Rodríguez y E. Castañeda. 1998. First Isolation of

Cryptococcus neoformans var. *gattii*, serotype C from the environment in Colombia. Med. Mycol. 36:341-344.

Caicedo, L. D., M. I. Alvarez, C. E. Llanos y D. Molina. 1996. *Cryptococcus neoformans* en excretas de paloma del perímetro urbano de Cali, Colombia. Biomédica. 27: 106-109.

Canelo, C., A. Navarro. M. Guevara, F. Urcia, S. Zurita y J. Casquero. 1999. Determinación de la variedad de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de pacientes con sida. Rev. Med. Exp. 11: 44-47.

Casadevall, A y J. R. Perfect. 1998. *Cryptococcus neoformans*. Washington DC: ASM. Press.

Castañeda, A., S. Huérfano, M. C. Rodríguez y E. Castañeda. 2001. Recuperación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotipo C a partir de detritos de almendro. Biomédica 21: 70-74.

Castañon-Olivares, L. R. y R. López-Martínez. 1994. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in México City. Mycoses. 37: 325-327.

Chasakes, S. y R. L. Tyndall. 1975. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* from para and ortho diphenols: effect of the nitrogen source. J. Clin. Microbiol. 1: 509-514.

Cherniak, R. y J. B. Sundstrom. 1994. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. Minireview. Infect. Immun. 62: 1507-1512.

Cherniak, R. L., C. Morris, T. Belay, E. D. Splitzer y A. Casadevall. 1995. Variation in the structure of glucuronoxylomannan in isolates from patients with recurrent cryptococcal meningitis. Infect. Immun. 63: 1899- 1905.

Choundhry, M. S., G. M. Bulmer y G. Frances. 1967. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. Department of Microbiology. 3:81-90.

Clancy, M. N., J. Fleismann, D. H. Howard, K. J. Kwon-Chung y R. Y. Shimiku. 1990. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a patient with AIDS in Southern California. J. Infect. Dis. 161:809.

Cleare, W. y A. Casadevall. 1988. The different binding patterns of two immunoglobulin M monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* serotype A and D strains correlate with serotype classification and differences in functional assays. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5: 125-129.

- Cohen, D. B. y B. J. Glasgow. 1993. Bilateral optic nerve cryptococcosis in sudden blindness in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Ophthalmology* 100: 1689-1694.
- Collette, N., P. Van der Auwera, F. Meunier, C. Lambert, J. P. Sculier y A. Coune. 1991. Tissue distribution and bioactivity of amphotericin B administered in liposomes to cancer patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 27: 535-548.
- Connant, N. F., D. T. Smith, R. D. Baxter y J. L. Callaway. 1972. *Micología Interamericana, México.* 740-742 pp.
- Connolly, J. H., M. B. Krockenberger, R. Malik, P. J. Canfield, D. I. Wigney y D. B. Muir. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of the koala (*Phassolarctos cinereus*). *Med. Mycol.* 37: 331-338.
- Diamond, R. D., J. E. May, M. A. Kane y J. E. Bennett. 1974. The role of the classic and alternate complement pathways in host defenses against *Cryptococcus* infection. *J. Immunol.* 112: 2260.
- Dismukes, W. E. 1988. Cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 157: 624-628.
- Doering, T. L., J. D. Nosanchuk, W. K. Roberts y A. Casadevall. 1999. Melanin as a potential cryptococcal defense against microbicidal proteins. *Med Mycol* 37: 175-181.
- Drgonona, J., T. Drgon, K. Tanaka, R. Kollar, G. C. Chen, R. A. Ford, C. S. M. Chan, Y. Takai y E. Cabib. 1996. Rho 1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* 272: 277-279.
- Dromer, F., E. Guebo, O. Ronin y B. Dupont. 1993. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. *J. Clin. Microbiol.* 31: 359-363.
- Dromer, F., S. Mathoulin, B. Dupont y A. Laporte. 1996. Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey. *Clin. Infect. Dis.* 23: 82-90.
- Drouhet, E y G. Segretain. 1951. Inhibition de la migration leukocytaire in vitro par un polyside capsulaire de *Torulopsis Cryptococcus neoformans*. *Inst. Pasteur* 81: 674.
- Dugoni, B. H., B. J. Guglielmo y H. Hollander. 1989. Anfotericini B concentrations in cerebral spinal fluid in patients with AIDS and cryptococcal meningitis. *Clin. Pharmacol.* 8: 220-221.
- Duppont, B., J. R. Graybill, D. Armstrong, R. Laroche y J. E. Touzé. 1992. Infecciones fungicidas in patients de Sida. *J. Vet. Med. Mycol.* 30: 19-28.

- Dykstra, M. A., L. Friedman y J. W. Murphy. 1977. Capsulate size of *Cryptococcus neoformans* control and relationship to virulence. *Infect. Immun.* 16: 129-135.
- Eckert, F. T. y T. R. Kozel. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* 55: 1895-1899.
- Ellis, D. H y T. J. Pleiffer. 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1642-1644.
- Emmons, C. W. 1951. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J. Bacteriol.* 62: 685-690.
- Emmons, C. W. 1955. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am. J. Hyg.* 62: 227-232.
- Farhi, F., G. S. Bulmer y J. R. Tacker. 1970. *Cryptococcus neoformans* IV. The not-so encapsulated yeast. *Infect. Immun.* 1: 525-531
- Feldmesser, M., Y. Kress y A. Casadevall. 2001. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol.* 147: 2355-2365.
- Fell, J. W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Seorzetti y A. Statzell-Tallman. 2000. Biodiversity and systematic of basidiomycetous yeast as determined by large subunit r RNA. D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1351-1371.
- Flesch, I. E. A., G. Schwamberger y S. H. E. Kaufman. 1989. Fungicidal activity of IFN-gamma activated macrophages. *J. Immunol.* 142: 3219-3224.
- Fortes, S., M.R. Lazera, C. C. Macedo, M. M. Becerra, F. M. Nishikawa y B. Wanke. 1998. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* e moco de árvore viva pa Amazônia dados preliminares da liha de Maricá. Roraima, Brasil. II Congresso Brasiler de Micologia, Rio de Janeiro. 184(Abstract G47).
- Franzot, S. P., I. F. Salkin y A. Casadevall. 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status of *C. neoformans* serotypes A isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37: 838-840.
- Frese, D. y U. Sthal. 1992. Oxidative stress and aging in the fungus *Polospora anserine*. *Mech. Ageing. Dev.* 65: 227-288.
- Fromtling, R. A y H. T. Sahamody. 1982. Immunity in criptococosis: An overview. *Mycopathol.* 77: 183.
- Gadebush, H. H. 1958. Active immunization against *Cryptococcus neoformans*. *J.*

Infect. Dis. 102: 219-226.

García-Hermos, D., S. Mathoulin-Pelissie, B. Couprie, O. Ronin, B. Dupont y F. Dromer. 1997. DNA typing suggests pigeon droppings as a source of pathogenic *Cryptococcus neoformans* serotype D. J. Clin. Microbiol. 35: 2683-2685.

Gatti, F. y R. Eeckels. 1970. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (Vuillemin). Par 1. Description of the disease and of the strain. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 50: 689-694.

Georgopapadakou, N. H., B. A. Dix , S. A. Smith. J. Freunde y P. T. Funke. 1987. Freunde Berger J. Funke P T. Effect on antifungal agents on lipid biosynthesis and membrane integrity in *Candida albicans*. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 46-51.

Gezuele, E., L. Calegari, D. Sanabria y E. Gcivila. 1993. Isolation in Uruguay *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a nest of the wasp *Polybia occidentalis*. Rev. Iberoam. Micol. 10: 7-9.

Goldman, D. L., S. C. Lee, A. J. Mednick, L. Montella y A. Casadevall. 2000. Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to criptococcal polysaccharide. Infect. Immun. 68: 832-838.

González A. E., A. T. Martínez, G. Almendros y J. Grinbergs. 1989. A study of yeast during the delignification and fungal transformation of wood into cattle feed in Chilean rain forest. Antoine. Van. Leeuwenhoek. 55: 221-236.

Gordón, M. A. y A. Casadevall. 1995. Serum y therapy of criptococcal meningitis. Clin. Infect. Dis. 21:1477-1479.

Granger, D. L., J. R. Perfect y D. T. Durack. 1985. Virulence of *Cryptococcus neoformans*: Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. J. Clin. Invest. 76: 508-516.

Graybill, J y P. Craven. 1983. Antifungal agents used in systemic mycoses activity and therapeutic use. Drug, 25: 41-62.

Gugnani, H., R. Sanohu y S. Shone. 1976. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in Avian excreta in India. Mycosen. 19: 183.

Guébo, E., L. Improvisi, R. Cheisten y G. S. de Hoog. 1993. Phylogenetic relationships of *Cryptococcus neoformans* and some related basidiomycetous yeast determined from partial large subunit r-RNA sequences. Antoine Van Leeuwenhoek 63: 175-189.

- Gezuele, E., L. Caleguri, D. Sanabria, G. Davel y E. Civila. 1993. Isolation in Uruguay of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from nest of wasp *Polybia occidentalis*. Rev. Iberoam. Micol. 66: 287-293.
- Hadesman, R., R. H. Wiesner, V. L. W. Go y G. M. Tyce. 1993. Concentrations and pigmentary disorders. (eds). N. Levine, CRC Press, Ann Arbor 33-59.
- Harley, J. P. y L. M. Prescott. 1999. Laboratory Exercises. Mac GrawHill, pp. 19-20.
- Hill, F. I., A. J. Woudeyer, y M. A. Lintott. 1995. Cryptococcosis in a North Island Brow Kiwi (*Apteryx australis mantelli*) in New Zeland. J. Med. Vet. Mycol. 33: 305-309.
- Hindell, M. A. y A. K. Lee. 1990. Tree preferences of the koala, In: Lee A. K, Handasyle K. A., Sanson, G. D. (eds). Biology of the koala. Sydney Beatty and Sans, pp. 117-121
- Haupt, D. C., G. S. T. Pfrommer, B. J. Young, T. A. Larson y T. R. Dosel. 1994. Occurrences, immunoglobulin classes, and biological activities of antibodies in normal human serum that are reactive with *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. Infect. Immun. 64: 2336-2338.
- Hubalek, W. 1975. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitat. Z. Folia. Parasitol. 22:73-79.
- IGAC, 1994. Atlántico, características geograficas.Santa fé de Bogotá. Pp. 33-42.
- Ishaq, C., G. S. Bulmer y F. G. Felton. 1968. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. Mycol. Appl. 35: 81-90.
- Ikeda, R., T. Shinoda, Y. Fukazawa y L. Kaufman. 1982. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 16: 22-29.
- Ikeda, R., H. Matsuyama, A. Nishikawa, T. Shinoda y Y. Fukazama. 1991. Comparation of serological characteristics of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* setotype A-D and *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. Microbiol. Immunol. 35(2): 25-138.
- Irokanudo, E. A., C. O. Akueshi y A. A. Makinde. 1994. Differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotypes A and D using creatinine dextrose bromothymol blue tyamine medium. Br. J. Biomed. Sci. 51: 100-103.
- Ito, S. y K. Wakamatsu. 1989. Melanin chemistry and melanin precursors in melanoma. J. Invest. Dermatol. 92: S261-S265.

- Ito, S. 1993. Biochemistry and physiology of melanin. In: Pigmentation and Pigmentary disorders. N. Levine (ed.). CRC Press, Ann Arbor, pp. 33-59.
- Jacobson, E. S., M. J. Tanager y P. L. Quynn. 1989. Effect of hypertonic solutes upon the polysaccharide capsule in *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses* 32: 14-23.
- Jacobson, E. S. y H. S. Emery. 1991. Temperature regulation of the cryptococcal phenoloxidase. *J. Med. Vet. Mycol.* 29: 121-124.
- James, P. G. y R. Cherniak. 1992. Galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immunol.* 60(3): 1084-1088.
- Jong, S. C., G. S. Bulmer y A. Ruiz. 1982. Serologic grouping and sexual compatibility of airborne *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol.* 79: 185-188.
- Kapenda, K. 1987. Meningitis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Zairean AIDS Patient. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6: 320-321.
- Karstedt, A. S., H. H. Crewe-Brown y F. Dromer. 2002. Cryptococcal meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotipo C, in AIDS patients in Soweto, South Africa. *Med. Mycol.* 40: 7-11.
- Keah, K. C., S. Parameswari y Y. M. Cheong. 1994. Serotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Malaysia. *Trop. Biomed.* 11: 205-207.
- Kieistein, P. 1996. Studies on the ecological behavior of *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses* 36: 113-117.
- Kozel, T. R. y J. Jr. Cazin. 1971. Nonencapsulated variant of *Cryptococcus neoformans*. I. Virulence studies and characterization of soluble polysaccharide. *Infect. Immun.* 3: 287-294.
- Kozel, T. R., E. Reiss y R. Cherniak. 1980. Concomitant but not causal association between surface charge and inhibition of phagocytosis by cryptococcal polysaccharide. *Infect. Immun.* 29: 295-300.
- Kozel, T. R. 1989. Antigenic structure of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides. En: Kurstak E. (ed.), *Immunology of Fungal Diseases*. New York, Marcel Dekker. pp. 144-154.
- Kozel, T. R., B. Highison y C. Stratton. 1984. Localization on encapsulated *Cryptococcus neoformans* of serum components opsonic for phagocytosis by macrophages and neutrophils. *Infect. Immun.* 43: 574-579.
- Kurokawa, C. M., M. F. Sugizaki y M. T. Peracoli. 1998. Virulence factors in fungi

systemic mycoses. Rev. Med. Trop. 40(3): 125-135.

Kwon-Chung, K. J. 1975. A new genus *Filobasidiella*, the perfect state of *Cryptococcus neoformans*. Mycol. 67: 1197-1200.

Kwon-Chung, K. J. 1976. Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans* the sexual state of *Cryptococcus neoformans*. Mycol. 68: 821-833.

Kwon-Chung, K. J. 1980. Nuclear genotypes of spores chains in *Filobasidiella neoformans* (*Cryptococcus neoformans*). Mycol. 72: 418-422.

Kwon-Chung, K. J., I. Polacheck y J. E. Bennet. 1982. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A y D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B y C). J. Clin. Microbiol. 15: 535-537.

Kwon-Chung, K. J., I. Polacheck y T. J. Popkin. 1982. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence. J. Bacteriol. 150(3):1414-1421.

Kwon-Chung, K. J. y J. E. Bennet. 1984. Epidemiologic differences between the two varieties of *C. neoformans*. Am. J. Epidemiol. 120: 123-130.

Kwon-Chung, K. J. y J. C. Rhodes. 1986. Encapsulation and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun. 51: 218-223.

Kwon-Chung, K. J., J. C. Edman y B. L. Wickes. 1992. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun. 60: 602-605.

Kwon-Chung, K. J. y J. E. Bennett, 1992. Criptococosis. (ed.). Medical Mycology. Philadelphia, Lea and Febiger. pp. 397-416.

Laloo, D., D. Fisher, S. Naraqi, I. Laurenson, P. Temu y A. Sinha. 1994. Cryptococcal meningitis (*C. neoformans* var. *gattii*) leading to blindness in previously healthy Melanesian adults in Papua New Guinea. J. Med. 87: 343-349.

Lazera, M. S., B. Wanke y M. M. Nishikawa. 1993. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. J. Clin. Med. Vet. Mycol. 31: 449-454.

Lazera, M. S., F. D.A. Pires. L. Camillo-Coura M. M. Nishikawa. C. F. Becerra y L. Trilles. 1996. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. J. Med. Vet. Mycol. 34(2): 127-131

Lazera, M. S., M. A. S. Colcavanti, L. Trilles, M. M. Nishikawa y B. Works. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a Pottery tree hollow. Med. Mycol. 36: 119-122.

- Lee, S. C., D. W. Dickson, C. F. Brosnan y A. Casadevall. 1994. Human astrocytes inhibit *Cryptococcus neoformans* growth by a nitric oxide-mediated mechanism. *J. Exp. Med.* 180: 365-369.
- Lengeler, K. B., G. M. Cox y J. Heitman. 2001. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect. Immun.* 69: 115-122.
- Levitz, S. M. y D. J. DiBenedetto. 1989. Paradoxical role of capsule in murine bronchoalveolar macrophage-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 142: 659-665.
- Levitz, S. M. 1991. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *Rev. Infect. Dis.* 13: 1163-1169.
- Levitz, S. M., S. M. Nong, K. F. Seetoo, T. S. Harrinson, R. A. Speizer y E. R. Simmons. 1999. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect. Immun.* 142: 4225-4237.
- Littman, M. y S. Schneirson. 1959. *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City. *American. J. Hyg.* 69: 49-59.
- Littman, M. L. y R. Borok. 1968. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 35:922: 933
- Liu, C. T. 1953. Intracerebral cryptococcosis granuloma. *J. Neurosurg.* 10: 686-689.
- Liu, L., R. P. Tewari y P. R. Williamson. 1999. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 67: 6034-6039.
- Lodder, J. 1998. *The Yeasts: A taxonomic study*. 3th Edition. American Elsevier Publishing Company. pp. 34-113.
- Madrenys, A., C. De Vroey, C. Raes-Wuytack y J. M. Torres-Rodríguez. 1993. Identification of the perfect state of *Cryptococcus neoformans* from 195 clinical isolates including 84 from AIDS patients. *Mycopathol.* 123(2): 65-68
- Malik, R., D. I. Wigney, M. R. Muir y D. N. Love. 1997. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. *J. Med. Vet. Mycol.* 35: 27-31.

- Martins, H. M., F. M. Bernando y M. L. Martins. 1996. *Cryptococcus spp.* asociated with *Eucalyptus* trees in Lisboa, Portugal, abstr. 7. 1. In abstracts of the Third Meeting of the European Confederation of Medical Mycology, Lisbon, Portugal. 89-94.
- Miller, M. F y Mitchell, T. G. 1991. Killing of *Cryptococcus neoformans* strains by human neutrophils and monocytes. *Infect. Immun.* 59: 24-28.
- Mira, C. A., R. Anzola. A. Martínez, R. Llinas, C. Valencia y A. Restrepo. 1968. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de materiales contaminados con excretas de palomas en Medellín, Colombia. *Antioquia Med.* 18: 33-40.
- Miranda, L. R. 1984. Genus 5. *Cryptococcus* Kutzing emend. Phaff et Spencer. In: Kreger-Van Rij N. W. J. (ed.), *The yeast: A taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 845-872.
- Mitchell, T. y J. Perfect. 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS- 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 515-548.
- Mitchell, D. H., T. C. Sorrell, A. M. Allwort. Ch. Healt, A. R. Macgregor y K. Papanoum. 1995. Cryptococcal disease of the CNS in immunocompetent host; influence of cryptococcal variety on clinical manifestations and outcome. *Clin. Infect. Dis.* 20: 611-616.
- Molina, Y., S. E. T. Douglas y L. S. Kling. 1999. *Yeast* 15: 1657-1667.
- Montagna, M. T., A. M. Tortorano, L. Fiore, M. A. Viviani y S. Barbuti. 1997. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en Italy. Note I. Premier cas autochtone de meningite á serotype B chez un sujet VIH positif. *J. Mycol. Med.* 7: 90-92.
- Moore, G. S. y D. M. Jaciow. 1979. *Mycology for the Clinical Laboratory*. Reston, VA; Reston Publishing Co. pp. 283-300.
- Murphy, J. W. y G. C. Cozad. 1972. Immunological unresponsiveness induced by capsular polysaccharide assayed by the hemolytic plaquetechique. *Infect. Immun.* 5: 896.
- Murphy, J. W. y M. D. McDaniel. 1982. In vitro reactivity of natural killer (NK) cells against *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 128: 1477-1483.
- Mukamurangwa, P., C. Raes-Wuytack y Ch. De Vroey. 1995. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can be separated from var. *neoformans* by its ability to assimilate D-tryptophan. *J. Med. Vet. Mycol.* 33: 419-420.
- Neilson, J. B., R. A. Fromting y G. S. Bulmer. 1977. *Cryptococcus neoformans* size range infectious particles from aerosolized soil. *Infect. Immun.* 17: 634-638.

- Nosanchuk., J. D. y A. Casadevall. 1997. Cellular charge of *Cryptococcus neoformans* from the capsular polysaccharide, melanin, and monoclonal antibody binding. *Infect. Immune.* 65: 1836-1841.
- Nosanchuk, J. D., S. A. Franzot. y A. Casadevall. 1999. Amphotericin B and fluconazole affect cellular charge, macrophage phagocytes, and cellular morphology of *Cryptococcus neoformans* at subinhibitory concentrations. *Ant. Agents. Chemother.* 43: 233-239.
- Nurudeen, T. A. y D. G. Ahearn. 1979. Regulation of melanin production by *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 10: 724-729.
- Ofner, S. y R. S. Boker. 1987. Visual loss in criptococcal meningitis. *J. Clin. Neurophthalmol.* 7: 45-48.
- Ordóñez, N. y E. Castañeda. 1992. Criptococosis y agente etiológico. *Médicas IUS.* 6: 207-215.
- Ordóñez, N. y E. Castañeda. 1994. Serotipificación de aislamientos clínicos y del medio ambiente de *Cryptococcus neoformans* en Colombia. *Biomédica.* 14: 131-139.
- Ordóñez, N y E. Castañeda. 1997. Varieties and serotypes of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates in Colombia. 13th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. Parma, Italy. Salsomaggiore Terme. pp. 168.
- Pal, M. y B. S. Mehrotra. 1984. Studies of isolation of *Cryptococcus neoformans* from fruits and vegetables. *Mykosen* 28: 200-205
- Pfeiffer, T. J. y D. H. Ellis. 1992. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans var.gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 30: 407-408.
- Pfeiffer T. J. y D. H. Ellis. 1993. Ecology of *Cryptococcus neoformans var. gattii*. In: eds. Second International conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis. Milan, L13, pp. 42.
- Pfeiffer, T. J. y D. H. Ellis. 1991. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans var. gattii* from California. *J. Infect. Dis.* 163: 929-930.
- Phaff, H. .J., M. W. Miller y E. M. Mrak. 1978. The Life of the Yeasts. Second edition Harvard University Press. London, England. pp. 135-182.
- Polacheck, I., V. J. Hearing y K. J. Kwon-Chung. 1982. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catelocholamines in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.* 150: 1212-1220.

- Polacheck, I. y K. J. Kwon-Chung. 1986. Canavanine resistance in *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob. Agents Chemother. 29: 468-473.
- Popovich, M. J., R. H. Arthur y E. Helmer. 1990. CT of intracranial cryptococcosis. Am. J. Neuroradiol. 11: 139-142.
- Powderly, W. G. 1993. Cryptococcal meningitis and AIDS. Clin. Infect. Dis. 17: 837-842.
- Pulverer, G. y H. Korth. 1971. *Cryptococcus neoformans* pigment bildung aus verschiedenen polyphenolen. Med. Microbiol. Immunol. 157: 46-51.
- Rex, J. H., R. A. Larsen, W. E. Dismukes, G. A. Cloud y J. E. Bennett. 1993. Catastrophic visual loss due to *Cryptococcus neoformans* meningitis.
- Rhodes, J. C., I. Polacheck y K. J. Kwon-Chung. 1982. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun. 36: 1175-1184.
- Rippon, J. W. 1982. Medical Mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. W. B. Saunders Company, Philadelphia. pp. 532-542.
- Rosenthal, G. A., D. L. Dahlgren y D. H. Janzen. 1977. Depredation and detoxification of canaline by a specialized seed predator. Science 200: 528-529.
- Rozenbaum, R., A. J. R. Goncalvez, B. Wanke, M. J. Caiuby, I. Clemente y M. Lazera. 1992. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. Mycopathol. 119: 133-136.
- Ruiz, A., R. A. Fromtling y G. S. Bulmer. 1981. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. Infect. Immun. 31: 560-563.
- Ruiz, A., D. Vélez y R. A. Fromtling. 1989. Isolation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico: distribution and variety. Mycopathol. 106: 167-170.
- Ruiz, A. 1981. Distribution, viability and ecology of *Cryptococcus neoformans* at a natural site. Doctoral dissertation. University of Oklahoma.
- Saag, M. S. y W. E. Dismukes. 1988. Azoles antifungal agents: emphasis on new triazoles. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 1-8.
- Sakaguchi, N., T. Baba, M. Fukuzawa y S. Ohno. 1993. Ultrastructural study of *Cryptococcus neoformans* by quick-freezing and deep-etching method. Mycopathol. 121: 133-141.

- Salaki, J. S., D. B. Louria y H. Chmel. 1984. Fungal and yeast infections of the central nervous system. *Medicine* 63:108-132.
- Sanfelice, F. 1894. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. *Ann Igiene*. 4: 463-495.
- Saul, R. F., J. G. Gallagher y J. E. Mateer. 1986. Sudden hemiparesis as the presenting sign in cryptococcal meningoencephalitis. *Stroke* 17:753-754.
- Schewen, M. y F. Schwegler. 1995. Antagonistic interactions between azoles and amphotericin B with yeast depend on azole lipophilia for special test conditions in vitro. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 38: 371-373.
- Seelinger, H. 1956. Use the urease test for the screening and identification of cryptococcosis. *J. Bacteriol.* 72. -73.
- Selby, R. C. y N. M. Lopes. 1973. Torulomas of the central nervous systems. *J. Neurosurg.* 38:40-46.
- Sherman, D. F. 1973. The catabolism of catecholamines, recent studies. *Br. Med. Bull.* 110-115.
- Shields, A. B. y L. Ajello. 1966. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. *Science* 151: 208-209.
- Shields, A. B. y H. P. Seeliger. 1968. Zur Selektivzuchtung van *Cryptococcus neoformans*. *Mycosen* 11: 267-272.
- Silva, M y P. Luiza. 1963. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excrementos e ninhos de pombos (*Columba livia*) em Salvador. Brasil, *Rev. Inst. Med. Trop.* 5: 9-11.
- Speed, B y D. Dunt. 1995. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin. Infect. Dis.* 21: 28-34.
- Staib, F. 1962. *Cryptococcus neoformans* beim Kara rienvogel. *Zentralbl. Bakteriol.* 218: 446.
- Staib, F. 1963. New concepts in the occurrence and identification of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopath. Mycol. Appl.* 19: 143- 145.
- Staib, F. 1987. Cryptococcosis in AIDS: Mycological diagnostic and epidemiological observations. *AIDS-Forschung* 2: 363-382.
- Staib, F., C. Thielke, H. S. Randhawa, M. Senk y G. Kullins. 1962. Colonization of dead plants by *Cryptococcus neoformans*. *Zbl. Bakt. Hyg. 1. Abt Orig A.* 222: 115-125.

- Stockstill, M. T. y C. A. Kauffman. 1983. Comparison of cryptococcal and tuberculous meningitis. *Arch. Neurol.* 40: 81-85.
- Stranchan, A. A., R. J. Yu. y F. Blank. 1971. Pigment production of *Cryptococcus neoformans* grow with extracts of *Guizottia abyssinica*. *Appl. Microbiol.* 122: 478-479.
- Sung, J. Y., P. N. Cheng y K. N. Lai. 1991. Internuclear ophthalmoplegia in cryptococcal meningitis. *J. Trop. Med. Hyg.* 94: 116-117.
- St Germain, G., G. Noel y K. J. Kwon-Chung. 1988. Disseminated cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a Canadian patient with AIDS. *Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis.* 7: 587-588.
- Swinne, D. 1974. The pigeon as a reservoir for *Cryptococcus neoformans* *Lancet* 2: 842.
- Swinne, D. 1975. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. *Saboraudia* 13:303-304.
- Swinne, D., L. Bauwens y P. Desmet. 1992. More Information about the natural habitat of *Cryptococcus neoformans*. *ISHAM. Newsletter.* 60: 61.
- Takeo, K., I. Uesaka. K. Uehira y M. Nishiura. 1973. Fine structure of *Cryptococcus neoformans* grown in vivo as observed by freeze etching. *J. Bacteriol.* 113: 1449-1454.
- Tan, C. T. 1988. Intracranial hypertension causing visual failure in *Cryptococcus meningitis*. *Arch. Ophtmol.* 71: 52-57.
- Vanbreuseghem, R y M. Takashio. 1970. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (*Sanfelice*) Vuillemin 1894. Part II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 50: 695-702.
- Van de Horst, C. M., M. S. Saag, G. A. Cloud, R. J. Hamill, J. R. Graybill y J. D. Sobel. 1977. Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Med.* 337: 15-21.
- Van de Moer, A., S. L. Salhi. R. Cherniak, B. Pau, M. L. Garrigues y J. M. Bastide. 1990. An anti-*Cryptococcus neoformans* monoclonal antibody directed against galactoxylomannan. *Res. Immunol.* 141: 33-42.
- Vélez, H. J. Borrero. J. Restrepo y W. Rojas. 1984. *Fundamentos de Medicina.* CBI. Medellín, Colombia. pp. 53-61.
- Vélez, D. 1987. Frecuencia y Distribución Geográfica de los serotipos y tipos sexuales de *Cryptococcus neoformans* en el Noroeste de Puerto Rico. Tesis M. S. Universidad de

Puerto Rico. Mayagüez.

Vecchiarelli, A. 2000. Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* 38: 407-417.

Walter, J y R. Yee. 1968. Factors determine the growth of *Cryptococcus neoformans* in avian excretes. *Ame. J. Epidemiol.* 88: 445.

Wang, Y. y A. Casadevall. 1994. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3864-3866.

Wang, Y., P. Aisen y A. Casadevall. 1995. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect. Immun.* 63(8): 3131-3136

Warren, N. G. y K. C. Hazen. 1995. Candida, *Cryptococcus* and other yeast of medical important In : Murria, P. R; Baron, E. J; Ptaller, M. A; Tenover, F. C y Yolken, R. H (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*. 6th. Ed. Washington, DC y American Society for Microbiology Press. pp. 723-737.

Wickes, B. L., M. E. Mayorga. U. Edman y J. C. Edman. 1996. Dimorphism and haploid fruiting in *Cryptococcus neoformans* association with the mating type. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 7327-7331.

Williamson, P. R. 1994. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J. Bacteriol.* 176: 656-664.

Wong, B., J. R. Perfect. S. Beggs y K. Weight. 1990. Production of the hexitol, D-mannitol by *Cryptococcus neoformans* in vitro and rabbits with experimental meningitis. *Infect. Immun.* 58: 1664-1670.

APÉNDICE 1.

Número de muestras recolectadas y porcentaje de aislamiento por área analizada en el departamento del Atlántico.

Municipios	No. muestras	<u>Relación con el nido</u>		% de positividad
		Dentro	Afuera	
Campo de la cruz	20	20	0	40 %
Barranquilla	20	14	6	25 %
Sabanalarga	20	12	8	20 %
Galapa	20	0	20	0 %
Repelón	20	20	0	30 %
Santo Tomás	20	15	5	0 %
Polonuevo	20	7	13	0 %
Baranoa	20	16	4	5 %
Usiacurí	20	9	11	0 %
Ponedera	20	7	13	5 %
Manatí	20	20	0	15 %
Palmar Varela	10	10	0	20 %
Campeche	20	4	16	0 %
Total	250	154	96	12 %

APÉNDICE 2.

Número y ubicación de las muestras de las heces de paloma recogidas en el departamento del Atlántico.

Localización de las muestras	No.	% de aislamiento
Dentro del nido	154	19.4 %
Fuera del nido	96	0 %
* paredes (15)		
* techos (20)		
* suelos (40)		
* árboles (10)		
* ventanas (06)		
* oficinas (05)		
Total	250	12 %

*: Lugares donde se recolectaron las muestras fuera de los nidos

APÉNDICE 3.

Análisis estadístico del estudio mediante la prueba Chi cuadrado de Pearson.

Frequency Expected Row Pct	0	1	Total
Ponedera	19 17.6 95.00	1 2.4 5.00	20
Repelón	14 17.6 70.00	6 2.4 30.00	20
S/ larga	16 17.6 80.00	4 2.4 20.00	20
Sto. Tomas	20.00 17.6 100.00	0.00 2.4 0.00	20
Usiacurí	20.00 17.6 100.00	0.00 2.4 0.00	20
Campo	12.00 17.6 60.00	8.00 2.4 40.00	20
B-quilla	15.00 17.6 75.00	5.00 2.4 25.00	20
Baranoa	19.00 17.6 95.00	1.00 2.4 5.00	20
Campeche	20.00 17.6 100.00	0.00 2.4 0.00	20

Frequency Expected Row Pct	0	1	Total
Galapa	20 17.6 100.00	0.00 2.4 0.00	20
Manatí	17 17.6 85.00	3 2.4 15.00	20
Palamar	8 8.8 80.00	2 1.2 20.00	20
Polonuevo	20.00 17.6 100.00	0.00 2.4 0.00	20
Total	220	30.00	250

Pearson Chi Square Test

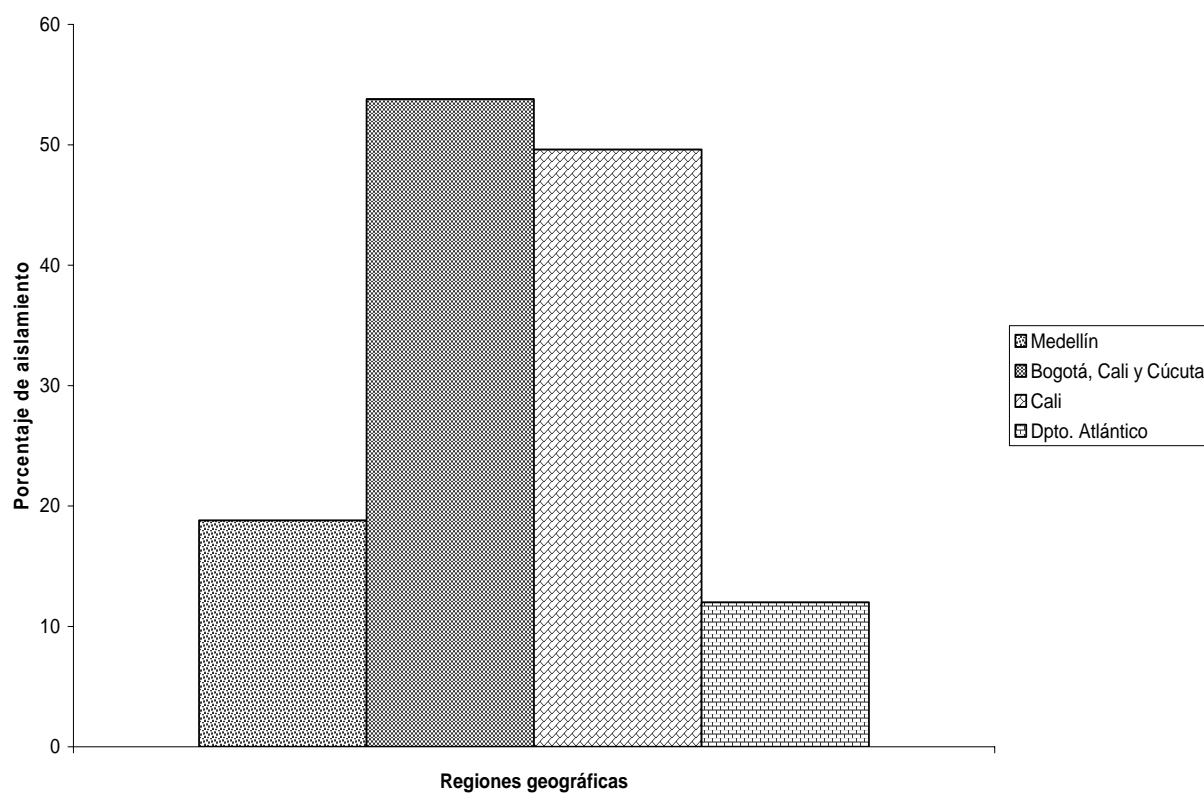
Chi cuadrado	41.6667
DF	12
Monte Carlo Estimate for the Exact Test	
Pr > = ChiSq	0.0002

DF: grados de libertad; Pr: probabilidad

APÉNDICE 4.

Relación entre los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* en otras regiones de Colombia y el efectuado en el departamento del Atlántico.

Comparación entre los aislamientos realizados en Colombia de la levadura *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* y el efectuado en el departamento del Atlántico



APÉNDICE 5.

Temperatura y precipitación de algunas áreas del departamento del Atlántico.

Municipios	Temperatura (°C)	Precipitación Pluvial
Galapa (n)	28	550-650 mm
Barranquilla (n)	27	700 mm
Santo Tomás (n)	30	550-918 mm
Palmar de Varela (n)	30	650-700 mm
Ponedera (n)	30.1	700 mm
Sabanalarga (s)	28	1100 mm
Campo de la Cruz (s)	28	1000-1100 mm
Santa Lucia (s)	30	1300 mm

Ubicación de los municipios: (n): norte y (s): sur

APÉNDICE 6.

Algunos lugares donde se realizó la recolección de muestras de suelo con excretas.



APÉNDICE 7.

Casos de criptococosis diagnosticados en el Hospital Universitario de Barranquilla, Colombia.

Paciente	Sexo	VIH	Procedencia	Fecha	Diagnóstico
1	M	+	Barranquilla	Ene- 2003	Tinta china
2	M	+	Barranquilla	Mar-2003	Tinta china
3	F	+	Barranquilla	Sep-2002	Tinta china
4	M	-	Barranquilla	Oct-2002	Tinta china
5	F	+	Barranquilla	Sep-2002	Tinta china
6	M	+	Barranquilla	Jul-2002	Tinta china
7	M	+	Soledad	Ago-2002	Tinta china
8	F	+	Polonuevo	Sept-2002	Tinta china
9	M	+	Barranquilla	Oct-2002	Tinta china
10	F	+	Palmar	Sep-2002	Tinta china
11	M	+	Barranquilla	Nov-2002	Tinta china
12	M	+	Soledad	Ene- 2002	Tinta china
13	M	+	Baranoa	Mar-2002	Tinta china
14	M	+	Barranquilla	Mar-2002	Tinta china
15	F	+	Barranquilla	Dic-2002	Tinta china

(+): Presente (-): no presente

APÉNDICE 8.

La alta densidad poblacional de las palomas dentro de los nidos y el recuperamiento de la levadura a partir de las excretas.



APÉNDICE 9.

**Número de casos de VIH /SIDA diagnosticados durante el periodo de 1987 al 2003
en la ciudad de Barranquilla, Colombia.**

Años	Casos	Población	%
1987	4	815.549	0.49
1988	11	849.291	1.29
1989	42	883.033	4.75
1990	51	916.775	5.56
1991	67	950.917	7.04
1992	96	984.259	9.75
1993	102	1.018.001	10.00
1994	135	1.051.743	12.83
1995	122	1.083.485	11.25
1996	113	1.117.227	10.11
1997	139	1.150.969	12.07
1998	213	1.184.711	17.97
1999	24	1.218.453	1.96
2000	102	1.252.195	8.14
2001	120	1.278.512	9.38
2002	147	1.305.334	11.26
2003	92	1.355.384	7.04

APÉNDICE 10.

Casos de pacientes VIH positivos diagnosticados en el departamento del Atlántico, Colombia durante el periodo 1998 al 2003.

Municipios	1998	1999	Periodo de diagnostico			2003	Total
			2000	2001	2002		
Soledad	21	4	10	6	17	15	73
Malanmbo	7	2	10	3	12	8	42
Puerto Colombia	0	3	3	2	2	6	16
Galapa	0	0	0	1	1	6	8
Sabanagrande	3	2	4	1	1	1	12
Santo Tomás	0	0	0	0	0	2	2
Palmar de Varela	0	0	0	0	1	4	5
Polonuevo	0	0	0	0	0	2	2
Tubara	0	0	0	0	0	1	1
Usiacurí	0	0	0	0	0	1	1
Ponedera	0	0	0	0	0	1	1
Sabanalarga	2	0	4	3	2	12	23
Repelón	0	0	0	0	0	1	1
Santa Lucía	0	0	0	0	0	1	1
Campo la Cruz	0	0	0	0	2	0	2
Total	33	11	31	16	38	61	190

APÉNDICE 11.

Equipos utilizados para aislar la levadura *Cryptococcus neoformans*.



APÉNDICE 12.

Principales resultados de la prueba de asimilación de carbohidratos en la levadura *C.n. var. neoformans* y *C. n. var. gattii*.

No. Muestras	positivas	variedad	asimilación de carbohidrato		
			lactosa	inositol	melobiosa
250	30	<i>neoformans</i>	-	+	☼
34	6	<i>gattii</i>	-	+	-

-: no crecimiento ; (+): crecimiento; ☼: no realizada.