



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Medicina

Maestría en Micología Médica

Genotipos de aislamientos de **Cryptococcus** de pacientes y muestras ambientales del Instituto Nacional Cardiopulmonar, utilizando PCR-RFLP **URA5**- Tegucigalpa, Honduras, 2015.

Maestrando

Lilia Mercedes Acevedo Almendarez

Director

Doctora Alicia Arechavala

Año 2015

Financiamiento:

Este estudio fue parcialmente financiado por La Dirección de Investigación Científica y de Posgrados (DICYP) segunda convocatoria 2015 "Beca de docente egresado de posgrado.

Apoyado con equipo de laboratorio y reactivos por La Escuela de Microbiología Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

Fondos propios

A MIS HIJAS:

LILIAN CAROLINA,

ANA LUCIA,

ISABEL,

y

SOFIA

Mi agradecimiento eterno:

A Dios por estar a mi lado siempre, por alentarme con el sonido de su silencio cuando creía que este sueño era imposible.

A mi esposo por su paciencia y amor incondicional.

Le doy gracias a mi madre y mi padre sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A la Dra. Alicia Arechavala , por su paciencia, su ayuda incondicional, por haber revisado mi trabajo letra por letra, gracias por siempre por ayudarme a crecer profesionalmente, es usted una gran maestra.

A mi profesor Ricardo Negroni por dar lo mejor de sus conocimientos, siempre será un orgullo para mi contarles a mis alumnos que usted fue mi maestro.

A mi profesor Gustavo por haber abierto esta gran oportunidad para ser mejor cada día en la academia de la micología.

A mis profesores de la maestría por habernos transmitido sus conocimientos.

A mis compañeros de Maestría por haber compartido conmigo su amistad.

Al Dr. Jorge Carrasco por llevarme al mundo de lo molecular y guiarme con su paciencia día a día.

A mis compañeras del laboratorio de inmunología; Aleyda y Glenda por alentarme . A Sofia por su labor cuidadosa.

Al Dr. Ivan y el personal del laboratorio del INCP por su apoyo incondicional.

A Isis Figueroa y Silvia Betanco por su colaboración y agregarle entusiasmo a este proyecto

A todos mis amigos gracias por su apoyo.

	Indice	pagina
1	RESUMEN	4
2	INTRODUCCIÓN	10
	2.1 Antecedentes	10
	2.2 Taxonomía	15
	2.3 Epidemiología y Ecología	19
	2.4 Patogenicidad... ..	21
	2.4.1 Cápsula	22
	2.4.2 Melanina y Lacasa	24
	2.4.3 Manitol	24
	2.4.4 Ureasa	24
	2.4.5 Fosfolipasa	25
	2.4.6 Vesículas extracelulares	25
	2.5 Diagnóstico.....	25
	2.5.1 Muestras clínicas	25
	2.5.2 Identificación	27
	2.5.3 Diagnostico inmunológico	28
	2.6 Inmunidad.....	28
	2.7 Manifestaciones clínicas.....	29
	2.7.1 Criptococosis pulmonar	29
	2.7.2 Criptococosis meníngea	30
	2.7.3 Criptococosis cutánea	30
	2.7.4 Criptococosis ocular	31
	2.7.5 Criptococosis ósea y visceral	31
	2.8 Prevención	31
	2.9 Tratamiento	32
3	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	34
4	HIPÓTESIS	35
5	OBJETIVOS.....	36
6	METODOLOGÍA	37
	6.1 Tipo de estudio	37
	6.2 Alcance	37
	6.3 Variables	38
	6.4 Instrumentos	40
	6.5 Recolección de la muestra	43
	6.5.1 Muestras de pacientes	43
	6.5.2 Muestras ambientales	43
	6.6 Procesamiento de la muestra	44
	6.7 Pruebas bioquímicas para identificación de género	44
	6.8 Pruebas bioquímicas para identificación de especie.....	50
	6.9 Extracción de ADN	52
	6.10 Cepas de referencia	54
	6.11 Técnica de PCR - RFLP	55
	6.12 Análisis de resultados	58
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
8	CONCLUSIONES	78
9	RECOMENDACIONES	80
9	BIBLIOGRAFÍA	81
11	ANEXOS	92

Indice de figuras		página
Fig -1	Incremento de publicaciones sobre el complejo <i>Cryptococcus</i> hasta abril 2015.	12
Fig -2	Clasificación más frecuente del complejo <i>C. neoformans/ C. gattii</i> .	18
Fig -4	Ciclo de vida de <i>Cryptococcus</i> spp.	21
Fig -5	Cápsula de <i>Cryptococcus</i> .	23
Fig -6	Cápsula como factor de virulencia y su efecto en el huésped.	23
Fig -7	Epidemiología de <i>Cryptococcus</i> en América latina.	13
Fig -8	Instituto Nacional Cardiopulmonar y las zonas en estudio.	37
Fig -9	Temperaturas y precipitación promedio en la ciudad de Tegucigalpa, FM, Honduras.	41
Fig -10	Mapa de Honduras , departamento de Francisco Morazán y las zonas de estudio en el INCP.	41
Fig-11	Proceso de aislamiento de levaduras con características coloniales y celulares de <i>Cryptococcus</i> ; purificación de cepas en Sabouraud y la presencia de cápsula.	44
Fig-12	Prueba de ureasa en medio de Christensen modificado.	45
Fig-13	Prueba de ureasa rápida	45
Fig-14	Semillas utilizadas en la elaboración de medios naturales para la determinación de fenoloxidasas.	45
Fig-15	Elaboración de medios de cultivo a base de semillas para la prueba de fenoloxidasas.	46
Fig-16	Producción de fenoloxidasas con cepas de referencia de <i>C. gattii</i> y <i>C. neoformans</i> .	46
Fig-17	Cepa de <i>Cryptococcus</i> purificada.	46
Fig-18	Prueba de asimilación de nitrato.	48
Fig-19	Inducción y medición de cápsula de cepas de <i>Cryptococcus</i> .	48
Fig-20	Susceptibilidad a la cicloheximida.	49
Fig-21	Prueba de asimilación de azúcares con API 20C AUX.	49
Fig-22	Prueba de GCB a cepas ambientales y clínicas.	50
Fig-23	Flujograma de aislamiento e identificación de <i>Cryptococcus</i> .	51
Fig-24	Flujograma de genotipos de <i>Cryptococcus</i> por PCR - RFLP <i>URA</i> - 5.	56
Fig-25	Cepas de <i>Cryptococcus</i> aisladas en muestras ambientales y clínicas.	60
Fig-26	Relación de especies de <i>Cryptococcus</i> identificadas con API 20C Aux y agar CGB.	61
Fig-27	Tamaño de cápsula y células en forma natural e inducida de <i>C. neoformans/ C. gattii</i> .	67
Fig-28	Morfología colonial de cepas de <i>Cryptococcus</i> .	68
Fig-29	Evaluación del tiempo de producción de fenoloxidasas de cepas de referencia de <i>Cryptococcus</i> en diferentes medios de cultivo naturales.	69
Fig-30	Tiempo de producción de fenoloxidasas en medios naturales por cepas de <i>Cryptococcus</i> ambientales y clínicas.	70
Fig -31	Actividad de la ureasa en cepas de <i>Cryptococcus</i> ambientales y clínicas.	71

Indice de figuras		página
Fig -32	Hongos contaminantes del ambiente asociados a cepas ambientales de <i>Cryptococcus</i> .	73
Fig -33	Edad de pacientes con criptococosis	74
Fig -34	Sexo de pacientes con criptococosis	76
Fig -35	Frecuencia de pacientes con y sin recurrencia de criptococosis.	76
Fig -35	Patrones de banda generados por el gen URA- 5 mediante RFLP en cepas control de <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i>	62
Fig -36	RFLP del gen URA- 5 de 10/29 aislamientos ambientales del INCP de <i>C. neoformans</i> .	62
Fig -37	RFLP del gen URA- 5 de los 11/29 cepas ambientales de <i>C. neoformans</i> aislados en el INCP.	63
Fig -38	RFLP del gen URA- 5 de los 9/29 aislamientos clínicos en pacientes del INCP de <i>C. neoformans</i> .	63
Fig -39	RFLP del gen URA- 5 aislamientos ambientales y clínicos en pacientes del INCP de <i>C. neoformans</i> .	63
Fig -40	RFLP del gen URA- 5 cepas ambientales y clínicos de <i>C. gattii</i> aisladas en el INCP.	63
Fig -41	RFLP del gen URA- 5 cepas ambientales y clínicos de <i>C. gattii</i> / <i>C. neoformans</i> aisladas en el INCP.	63

Indice de tablas		página
Tabla-1	Cambios más importantes en el nombre de <i>Cryptococcus</i> y la propuesta de nuevos nombres.	11
Tabla -2	Clasificación taxonómica de la fase asexual y sexual de <i>Cryptococcus</i>	15
Tabla - 3	Diferencias entre <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i>	17
tabla - 4	Clasificación molecular de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i>	19
Tabla - 5	Genes involucrados en la síntesis de la cápsula de <i>Cryptococcus</i>	22
Tabla - 6	Definición de variables	38
tabla - 7	Codificación de muestras ambientales y clínicas	43
Tabla - 8	Estandarización de la solución de MgCl ₂ .	53
Tabla - 9	Reactivos para la realización de PCR para <i>Cryptococcus</i>	54
Tabla - 10	Enzimas de restricción y sitios de reconocimiento	55
Tabla - 11	Reactivos para realizar la técnica PCR- RFLP URA - 5	56
Tabla - 12	Cepas de <i>Cryptococcus</i> aisladas por zonas en el INCP , Tegucigalpa, Honduras. 2014-2015	59
Tabla- 13	Genotipos de <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i> por RFLP URA5 en muestras ambientales y clínicas aisladas en el INCP.	62

RESUMEN

Según el último informe (diciembre de 2010) del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH / sida y la Organización Mundial de la Salud, 34 millones de personas en todo el mundo sufren de la infección por VIH / sida. 2,7 millones personas se infectan cada año con el virus, y 1,8 millones de personas mueren por causas relacionadas con el sida. Entre 70 y 90% de los enfermos con infección por VIH presentan compromiso del SNC.

El complejo *C.neoformans/C. gattii* es el grupo de levaduras más frecuentemente recuperado de muestras clínicas después de las del género *Candida*, (32,9% de 8.717 aislamientos). Además, la criptococosis es la segunda infección fúngica grave más común en ciertas regiones del mundo. Las infecciones causadas por *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) y en menor grado, por *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D) se ven en todo el mundo entre los huéspedes inmunocomprometidos.

En Honduras se realizó un estudio en el año 1999 en el Hospital Escuela Universitario y el Instituto Cardiopulmonar (INCP) y se detectó que las micosis predominantes por orden de frecuencia fueron: candidiasis 63%, criptococosis 29% e histoplasmosis 8%; con predominio del sexo masculino con una relación de 1,7:1 en pacientes con VIH.

El propósito de este estudio fue demostrar la presencia de *Cryptococcus* en nuestras ambientales y de pacientes, identificar las especies mediante pruebas bioquímicas y el medio CGB (canavanina, glicina, azul de bromotimol) que permite diferenciar *C. neoformans* de *C. gattii*.

En la actualidad con el empleo de diversas técnicas moleculares como la PCR huella digital y el RFLP del gen *URA5*, se han reconocido ocho grandes tipos moleculares: VNI, VNII, VNIII y VNIV de *C. neoformans* y VGI, VGII, VGIII y VGIV para *C. gattii* (1). Mediante las técnicas moleculares ALFP y MSLT se identificó a VNB (2).

La vigilancia molecular de los aislamientos del complejo *C. neoformans/C. gattii* es una

herramienta epidemiológica de gran valor, teniendo en cuenta que la criptococosis ha adquirido un gran interés debido al número creciente de pacientes inmunocomprometidos en los últimos años y además al aumento de criptococosis debidas a *C. gattii* en individuos inmunocompetentes.

Materiales y métodos. El enfoque del presente estudio fue cuantitativo, descriptivo, diseño no experimental. La población objeto de estudio fueron las levaduras de *Cryptococcus*, aisladas de muestras clínicas (principalmente LCR y esputo) a las que se les realizó un examen directo con tinta china y cultivos a 25 °C y 37 °C. Además se llevó a cabo la recolección de muestras ambientales: excretas de aves, detritos de árboles, hojas y flores en las áreas verdes del INCP. El muestreo se realizó mensualmente en un período de 3 meses, las muestras se procesaron según la técnica de Shields y Ajello, se sembraron en medio agar Níger, se incubaron a 28 °C y se observaron durante siete días. Se identificaron las colonias levaduriformes, mucoides con pigmentación marrón, estas fueron reaisladas en medio de Sabouraud para obtener cultivo puro y luego se realizó montaje con azul de lactofenol y con tinta china, prueba de ureasa en medio de Christensen y por micrométodo. Además se les realizaron las siguientes pruebas; crecimiento a 37 °C, prueba de asimilación de nitrato de potasio, sensibilidad a la cicloheximida, producción de tubo germinal y pseudohifas. Luego se identificaron con las galerías API 20C Aux y se diferenciaron, el complejo *C. neoformans* del complejo *C. gattii* de acuerdo con los resultados en el medio CGB, según la metodología descrita por Meyer y Escandón.

Resultados: Se analizaron 300 muestras ambientales, El 100% presentaban las características coloniales y celulares del género *Cryptococcus*, todas presentaban cápsula, eran ureasa positiva, crecieron a 37 °C, fueron negativas a los nitratos, no formaron pseudohifas y mostraron sensibilidad a la cicloheximida. Las 42 cepas de *Cryptococcus* aisladas en muestras ambientales y clínicas se identificaron mediante API 20C AUX de las cuales 34 (80,95%) fueron identificadas como *C. neoformans*, 7 (16,66 %) *C. laurentii* y 1 (2,38%) *C. uniguttulatus*. Según resultados en el medio de CGB: 10/42 (23.8%) pertenecen a *C. gat-*

tii, 29/42 (69%) aislamientos *C. neoformans*, y las tres restantes: 1/42 (2.4%) *C. uniguttulatus* y 2/42 (4.8%) *C. laurentii*.

Los 29 aislamientos de *C. neoformans* y los de 10 *C. gattii* se genotipificaron por la técnica molecular RFLP del gen *URA5*. De los 29 de *C. neoformans*; 19 (65,5%) presentaron patrón molecular VNI de estas 12 (63,2%) aislamientos eran de origen ambiental ($P < 0,0001$) y 7 (36,8%) clínicos ($P < 0,0001$): 10 (34,5%) aislamientos presentaron patrón molecular VNII, 8 (80%) de origen ambiental ($P = 0.0031$) y 2 (20%) clínicos ($P < 0,005$). De los 29 (69,04%) aislamientos de *C. neoformans*, 19 fueron VNI y 10 VNII: 15 (51,7%) (12 VNI y 3 VNII) aislamientos, se obtuvieron en excretas de aves, 5 (17,24%) (5 VNII), en el ambiente y 9 (31,03%) (7 VNI y 2 VNII) en muestras de LCR.

Se analizaron 10 aislamientos de *C. gattii*: 3 de origen clínico y 7 ambientales, de los 10 (23.81%) 7 fueron VGI y 3 VGII; 7 (70%) (6 VGI y 1 VG II), en muestras ambientales: 6 aislamientos (42,85%) en *Eucalyptus camandulenses* y 1 (7,14%) en hojas de *Enterolobium cyclocarpum*, y 3 (30 %) (1 VGI y 2 VGII) de origen clínico: 2 (20%) (2 VGII) en LCR y 1 (10%) (VGI) en esputo. 1(7,14%) de *C. laurentii* se encontró en ambiente y 1(7,14%) en LCR, y 1 (7,14%) de *C. uniguttulatus* en hojas de *Eucalyptus camaldulensis*.

Con este estudio se demostró la presencia de *C. neoformans* / *C.gattii* en las muestras de origen clínico y ambiental, y la estrecha relación de *C. neoformans* con las excretas de aves *Columba livia* que construyen sus nidos en el espacio del cielorraso que cubre las salas de internación de pacientes con VIH-sida y pacientes con tuberculosis.

Por otra parte, los aislamientos de *C. gattii* estarían en relación con los árboles de *E. camaldulensis* presentes en el área verde del INCP. Se evidenció la presencia de *C. laurentii* y de *C. uniguttulatus* especies que ocasionalmente pueden llegar a producir cuadros clínicos en individuos inmunocomprometidos.

Se evaluó la capacidad de formación de cápsula en las cepas de origen clínico y ambientales. El tamaño inicial de la cápsula fue entre 0,5 a 2 micras y el tamaño de las células de 1 a 3 micras. Después de la inducción, el tamaño de la cápsula fue de 2 a 6 micras y el de las célula entre 6 y 14 micras, este último dato, lo presentó una cepa de *C. gattii* (VG

l) de origen ambiental. *C. neoformans* (VNI y VNII), fueron capaces de desarrollar una cápsula de 6 a 12 micras.

La morfología colonial de los 42 aislamientos fue: 6 (14,3%) lisas, 6 (14,3%) rugosas y 30 (71,4%) mucoides, de los aislamientos mucoides: 23 (54,7%) pertenecen a *C. neoformans*, 4 (13,3%) a *C. gattii*, 2 (6,6%) a *C. laurentii* y 1 (3,33%) a *C. uniguttulatus*.

Se observó que de los aislamientos mucoides: 23 (54,7 %) pertenecen a *C. neoformans* (18 VNI y 5 VNII), 7 VNI de origen clínico y 11 ambientales: de los 5 aislamientos VNII, fueron 2 clínicos y 3 ambientales. 4 (13,3%) aislamientos de *C. gattii* (4 VGI), 2 (6,6%) a *C. laurentii* y 1 (3,33%) *C. uniguttulatus*.

De las 6 (14.3%) colonias rugosas, 5 (83,3%) eran de *C. gattii* (3 VGII y 2 VGI) y 1 (16,6%) de *C. neoformans* (VNI).

De las 6 colonias lisas 5 (83,3%) eran aislamientos de *C. neoformans* (5 VNII) y 1 (16,6%) *C. gattii* (1 VGI). El aspecto mucoide, así como la presencia de colonias rugosas y el tamaño de la cápsula son indicadores de la capacidad patogénica.

Se evaluó la producción de fenoloxidasa en diferentes medios de cultivo, utilizando varias semillas con propiedades bioquímicas similares a *Helianthus annuus* (HA), agar semilla girasol. Se utilizó: *Dioclea megacarpa* (DM), *Canavalia ensiformis* (CE), *Moringa oleífera* (MO), *Phaseolus vulgaris* (PV), *Mucuna pruriens* (MP) y *Linun usitatissimum* (LU). Se estandarizaron con cepas de referencia de *Cryptococcus*, y se usó como control negativo una cepa de *Candida albicans*. El 50% de las cepas antes mencionadas, presentaron pigmento café de 3-6 horas en el medio MP, el 100% de las cepas presentaron pigmento café a las 48 horas de evidenciarse la colonia en todos los medios de cultivo.

En cuanto a las cepas de *C. neoformans* y *C. gattii*, clínicas y ambientales: en el medio de cultivo MP: 29 (69%) de las cepas presentaron pigmento a las seis horas, entre estas están: 15 VNI, (10 de origen ambiental y 5 clínicos), 6 VNII (4 ambientales y 2 clínicos), 5 VGI (4 ambientales y 1 clínico) 3 VGII (1 ambiental y de origen 1 clínico). Diez (24%) a las doce horas: 4 VNI (2 ambientales y 2 clínicos), 4 VNII (ambientales) y 2 VGI (ambientales) y el 100% a las 24 horas después de evidenciada la colonia. En los medios de cultivo MD,

CE y MO presentaron pigmento después de las 24 horas: 36 (85,7%), 35 (83,3%) y 36 (85,7%) respectivamente. Las 3 (7%) cepas: 1 *C. uniguttulatus* y 2 *C. laurentii* presentaron a una coloración tenue a las 72 horas. Aunque todos los medios de cultivo mostraron producción de pigmento, fue el medio (MP) *Mucuna pruriens* el que presentó cambio de color a partir de las tres horas de haberse evidenciado la colonia, además fue el más intenso. Se utilizaron cepas de referencia de *Cryptococcus* en la producción de la ureasa, los valores de las absorbancias fueron de 0,297 a 0,462.

La valoración de la producción de ureasa en cepas de *Cryptococcus* de origen ambiental y clínico fue entre 0,179 y 0,458 de absorbancia. Las cepas de *C. gattii*, (VGI) de origen ambiental presentaron los niveles de absorbancia mas bajos, entre 0,179 y 0,218. Las cepas que presentaron las absorbancias mas elevadas, 0,389 y 0,458 fue *C. neoformans* (VNI) 7 cepas de origen ambiental y 4 de origen clínico. Dos cepas de *C. gattii* VGII de origen ambiental presentaron valores elevados, 0,373 y 0,376 de absorbancia. *C. gattii* aunque presente valores más bajos con respecto a *C. neoformans* u otras especies la producción de ureasa siempre juega un papel importante en su virulencia.

Se estudiaron 13 aislamientos clínicos, 12 (92,3%) de LCR y 1(7,3%) de esputo. Nueve fueron *C. neoformans*, 7 VNI y 2 VNII. Tres fueron *C. gattii*, 1 VGI y 2 VGII. 1 aislamiento de *C. laurentii* en LCR.

Las muestras fueron obtenidas de pacientes con un rango de edad entre 23 y 77 años con una media de 44,6 años. Los pacientes analizados durante este período 5 (38%) eran del sexo femenino y 8 (62%) del sexo masculino con una razón hombre/mujer de 1,5:1. Esto se explica porque en Honduras el VIH tiene una relación hombre/mujer de 1,1:1, por lo que la criptococosis afectaría más al sexo masculino. De 13 pacientes estudiados 2 (15,4%) presentaron recurrencia; 1 paciente presentó tres episodios a lo largo de 9 meses y otro falla de respuesta al tratamiento. Doce pacientes eran VIH positivos y 1 era VIH negativo con hipertensión e hiperlipidemia como enfermedad de base. Todos los pacientes fueron tratados con fluconazol y anfotericina B. Los pacientes que presentaron recurrencia tenían como antecedente abandono de tratamiento antirretroviral.

En este estudio se demostró que la relación de *C. neoformans* / *C. gattii* es de 2,9:1, aunque en Centro y Sur América se han reportado una relación de 3,5:1, nuestros datos mantienen la misma tendencia de que la especie predominante es *C. neoformans*. En Oceanía y América del Norte, 1,5:1, donde *C. gattii* es la especie aislada predominante. En relación a *C. gattii* de las 10 cepas: 7 (70%) presentaron patrón molecular VGI (6 de origen ambiental y 1 de origen clínico), 3 (30%) patrón molecular VGII (1 de origen ambiental y 2 de origen clínico). Se encontró diferencias en el patrón predominante de *C. gattii* que, en nuestros resultados fue VGI mientras que los aislamientos del serotipo B son agrupados en su mayoría en el patrón VGII.

2. INTRODUCCIÓN

2. 1. Antecedentes

Según Freeman, la criptococosis fue descrita por primera vez por Zenker en 1861, sin evidencia de un cultivo microbiano, por lo que el crédito para la primera descripción de la criptococosis correspondió a Busse y A. Buschke en 1894, ellos describieron un patógeno peligroso tomado de una lesión de tibia de la mujer y como él considero el organismo *Saccharomyces*, llamó a la enfermedad '*Saccharomycosis hominis*' (3). En los años 1894 y 1895 Francesco Sanfelice, de origen italiano aisló por primera vez de la fermentación de jugos de frutas una levadura muy similar a *Saccharomyces* pero con morfología colonial diferente y la llamó *Saccharomyces neoformans* en la Universidad de Cagliari, Italia. La levadura produjo lesiones cuando fue inoculada en animales como conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y conejillos de Indias (*Cavia cobaya*) (4).

En 1901, recibió el nombre de *Cryptococcus hominis*, luego *C. lithogenes*, hasta recibir el nombre universalmente aceptado *Cryptococcus neoformans*, debido a que no producían ascosporas, como lo hacen las levaduras del género *Saccharomyces* (4). Los agentes causales de la criptococosis recibieron diferentes nombres hasta que en 1901 el científico francés, J.P. Vuillemin, observó la ausencia de fermentación de azúcares y sugirió la re-clasificación dentro del género *Cryptococcus*. En 1935 se estudiaron 40 cepas de levaduras de origen humano incluyendo las primeras aisladas en 1894 y 1895 y por su morfología y taxonomía se concluyó que pertenecían al género *Cryptococcus* y se retomó la propuesta de Vuillemin, *Cryptococcus neoformans*. (5)

Fecha	Nombre	referencia	MLST Clado/AFLP- genotipo	PCR RFLP	Nombres propuestos
1901	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Vuillemin (1901)			
1970	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i>	Gattii and Eeckels (1970), Van- breuseghem and Takashio (1970), De Vroey and Gatti (1989)			
1975	<i>Filobasidiella neoformans</i>	Kwon-Chung (1975)			
1976	<i>Filobasidiella bacillispora</i>	Kwon-Chung (1976)			
1978	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>	Kwon-Chung and colleagues (1978)			
1982	<i>Filobasidiella neoformans</i> var. <i>bacillispora</i>	Kwon-Chung and colleagues (1982)			
1999	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> VNI cepas Serotipo A	Franzot et al. (1999)	Clado F, AFLP 1 Clado G , AFLP1A/ VNB Clado H, AFLP1B	VNI VNII VII	<i>C. neoformans</i>
1999	VNIV y VNIII cepas Seroti- po D <i>C. neoformans hidrido</i>		Clado I AFLP2 AFLP3	VNIV VNIII	<i>C. deneoformans</i> <i>C. neoformans</i> por <i>C.</i> <i>deonoformans</i> <i>hibrido</i>
2002	<i>Cryptococcus gattii</i> VG I cepas <i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>	Kwon-Chung et al. (2002)	Clado D, AFLP4 Clado C, AFLP5 Clado A, AFLP6 Clado B, AFLP7 Clado E, AFLP10	VGI VGIII VGII VGIV VGIV/ VGIII	<i>C. gattii</i> <i>C. bacillusporus</i> <i>C. deuterogattii</i> <i>C. tetragattii</i> <i>C. decagattii</i>
2006	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> x <i>Crypto-</i> <i>coccus gattii</i> AFLP4/VGI <i>hibrido</i>	Bovers et al.	AFLP8		<i>C. deneoformans</i> x <i>C.</i> <i>gattii</i> <i>hibrido</i>
2008	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> x <i>Cryptococcus</i> <i>gattii</i> AFLP4/VGI <i>hibrido</i>	Bovers et al.	AFLP9		<i>C. neoformans</i> x <i>C.</i> <i>gattii</i> <i>hibrido</i>
2012	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> x <i>Cryptococcus</i> <i>gattii</i> AFLP6/VGI <i>hibrido</i>	Aminnejad et al.	AFLP11		<i>C. neoformans</i> x <i>C.</i> <i>deuterogattii</i> <i>hibrido</i>
2014	VGIV/VGIIIc basado en URA5/RFLP y basado en MLST fue llamado genotipo VGIIIc pero comparado con ISHAM consensus MLST fue similar a AFLP10.				
2015	Propuesta de 7 especies				

Tabla-1 Cambios mas importantes en el nombre de *Cryptococcus* y la propuesta de nuevos nombres.

La tabla 1 contiene los datos tomados de *Explanations of some names in recent use for yeasts of the Cryptococcus neoformans group (4)* y *Current and proposed species in the C. gattii/C. neoformans species complex (6)*.

Los teleomorfos (fase sexual) fueron nombrados *Filobasidiella neoformans* (Kwon-Chung) y *Filobasidiella bacillispora* (Kwon-Chung) (7) para *C. neoformans* y *C. gattii* respectivamente. Por diferencias a nivel de mucopolisacarido capsular las cepas de *C. neoformans* inicialmente se agruparon en serotipos A, B y C (8). Dos décadas después se identificó el serotipo D (9). Luego el médico F. Gatti aisló de una cepa de *Cryptococcus* en LCR de un niño con meningitis en el Zaire (10). En el mismo año esta misma levadura se le llamó *C.*

neoformans variedad *gattii* (11). Barnett hace una relación detallada de la historia de *Cryptococcus* (4). Kwon-Chung propone estudiar por separado las especies de *C. neoformans* serotipo A y D y *C. gattii* serotipo B y C (12). La comprensión de la taxonomía y filogenia de *C. gattii* se ha avanzado mediante técnicas moleculares modernas, *C. gattii* probablemente divergió de *C. neoformans* hace entre 16 millones y 160 millones de años atrás, en función de los métodos de datación aplicados, manteniendo la diversidad mediante la recombinación en la naturaleza (13).

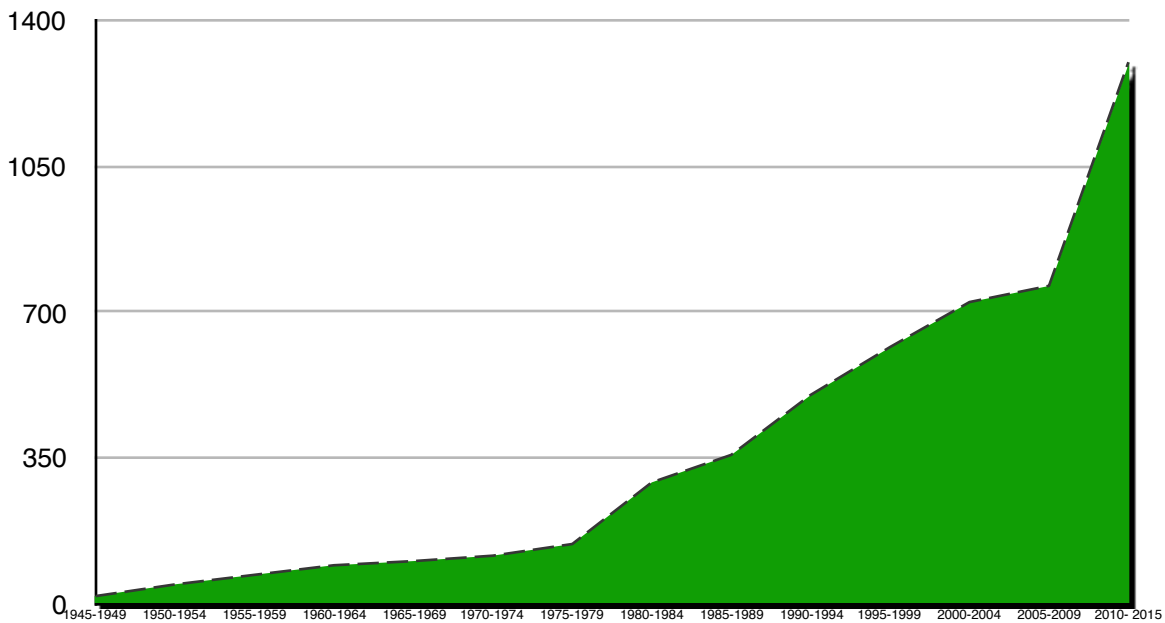
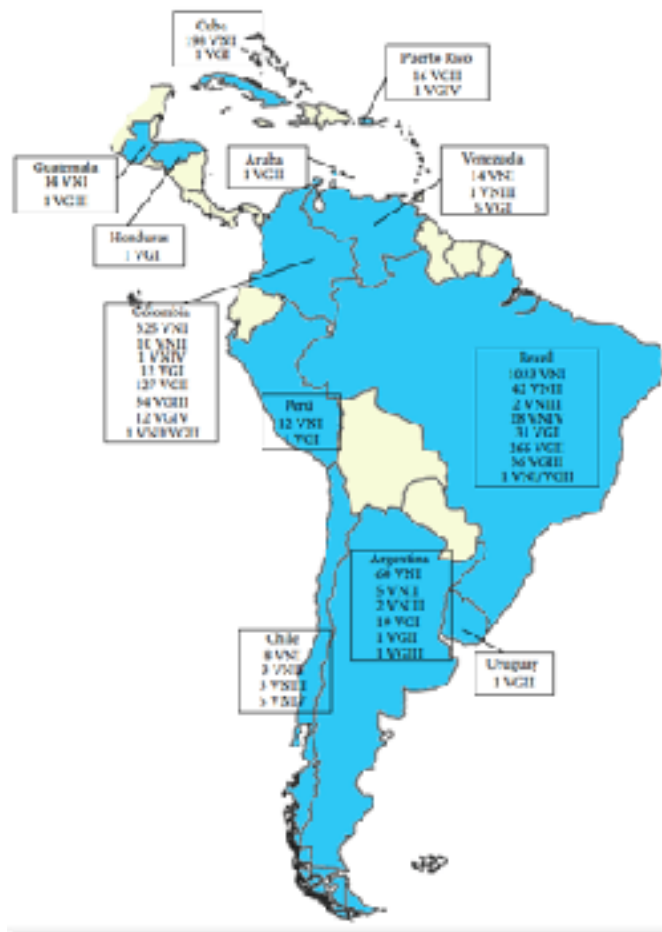


Figura 1 Incremento de publicaciones sobre el complejo *Cryptococcus* hasta abril 2015 es un estimado de las publicaciones sobre *Cryptococcus* en las últimas 6 décadas, el número se eleva en la década del 80 cuando aparece el sida, los datos fueron tomados del buscador bibliográfico Endnote X7, en periodos de 5 años.

Igualmente, se han presentado evidencias a favor de la existencia de diversas plantas y material vegetal en descomposición como hábitat para las variedades *grubii* y *neoformans* (14). En cuanto a *C. gattii*, recién en 1990 se logró recuperar esta especie del ambiente en Australia a partir de detritos de *Eucalyptus camaldulensis* (15). Posteriormente, se ha reportado su aislamiento a partir de ésta y otras especies de eucaliptos a nivel mundial, al igual que de otras especies de árboles. Así como en los pacientes, las dos variedades de *C. neoformans*; *C. neoformans* var. *grubii* y *C. neoformans* var. *neoformans* se distribuyen

a nivel mundial en el ambiente, aunque el serotipo A es ubicuo, y el serotipo D se restringe principalmente a Europa. Las aves raramente se infectan debido a que su temperatura corporal oscila entre 41,5 – 43 °C, temperatura demasiado elevada para el crecimiento del *Cryptococcus*. Se considera que las palomas y otras aves actúan como portadores mecánicos del hongo ya que ha sido aislado de sus picos, patas y plumas (16). Se ha reportado igualmente que *C. neoformans* puede ser aislado de otras fuentes tales como suelo y material vegetal. Recientemente, se ha incrementado el número de publicaciones de aislamientos de esta especie a partir de una variedad de especies de árboles en diferentes partes del mundo, incluyendo Argentina (17), Colombia (18), Brasil (19), India (19), Sudáfrica (17) y Tailandia (20). Además, el aislamiento de esta especie se ha reportado a partir de otras fuentes como cuevas de murciélagos, frutas e insectos (21).



Cogliati, M. 2012.

La criptococosis es una enfermedad fúngica que afecta a más de un millón de personas por año en todo el mundo. Es causada por *C. neoformans* y *C. gattii* que presentan numerosas diferencias en la distribución geográfica, los nichos ecológicos, la epidemiología, la biopatología, la presentación clínica y caracteres moleculares. En la actualidad, se han reconocido nueve grandes tipos moleculares: VNI, VNII, VNB, VNIII y VNIV entre aislamientos de *C. neoformans* y VGI, VGII, VGIII y VGIV entre aislados de *C. gattii* (22). A nivel mundial, las infecciones por *C. neoformans* y *C. gattii* causan aproximadamente un millón de casos de meningitis por año entre las personas con VIH/sida, lo que ocasiona cerca de 625.000 muertes (Centers for Disease Control and Prevention, CDC, Atlanta, USA, <http://www.cdc.gov/>) (22). Cuando se compara la estimación de muertes en África subsahariana con otras enfermedades excluyendo el VIH, las muertes asociadas con la meningitis criptocócica son más altas que la tuberculosis (23). Se ha comunicado el aislamiento de cepas clínicas y ambientales de *C. neoformans/C. gattii* en distintas partes del mundo. La mayoría de los aislados se registraron en Asia y África (19.651 y 19.647 aislamientos, respectivamente), seguido de Centro y Sur América (n = 10.548), Europa (n = 8.736), Norteamérica (n = 7.922) y Oceanía (n = 2.518) (22).

Las Infecciones causadas por las dos especies de *Cryptococcus* tienen diferencias en cuanto a su presentación clínica. Se informan principalmente casos por *C. gattii* en regiones tropicales y subtropicales en Australia, África, Sur América y, más recientemente, se ha reportado en región templada como lo es Canadá y en los estados de Washington, Oregon y California en EE.UU. De 10.548 aislamientos de *Cryptococcus* que se informaron en América Central y del Sur, el 53% correspondieron a Brasil, 22% en Colombia, 15% de Argentina, y un porcentaje menor a otros países. Un total de 8.590 (81%) cepas se aislaron a partir de fuentes clínicas y 1.958 (19%) de las fuentes ambientales y veterinarias. *C. neoformans* también se aisló de excretas de palomas y de otras aves, del suelo, el polvo y de las viviendas contaminadas (22). La relación *C. neoformans* / *C. gattii* es variable para cada continente con un 68:1 en Europa, 33:1 en África, 7,6:1 en Asia, 4,5:1

en Centro y Sur América, 3,5:1 en América del Norte, y 1:1,5 en Oceanía, donde *C. gattii* es la especie aislada predominante.

En Honduras se realizó un estudio en el año 1999 en el Hospital Escuela Universitario y el INCP y se detectó que las micosis predominantes por orden de frecuencia fueron: candidiasis 63%, criptococosis 29% e histoplasmosis 8%; con predominio del sexo masculino con una relación de 1,7:1 en pacientes con VIH (24). Después de este estudio no se encuentran datos oficiales que informen sobre la situación actual de la criptococosis en nuestro país. Cabe destacar que el INCP es un hospital del nivel III, inició sus labores en 1948, actualmente atiende servicios de emergencia en enfermedades cardiovasculares pulmonares con un número de 500 camas.

2.2 TAXONOMÍA

	Clasificación taxonómica de la fase sexual de <i>C. neoformans</i>	Clasificación taxonómica de la fase asexual de <i>C. neoformans</i>
super reino	Eucariota	Eucariota
Reino	Fungi	Fungi
Subreino	Dikarya	
filo	Basidiomycota	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes	Agaricomycetes
orden	Tremellales	Tremellales
Familia	Fillobasidiaceae	Fillobasidiaceae
Género	<i>Fillobasidiella</i>	<i>Cryptococcus</i>

Tabla -2 Clasificación taxonómica de la fase asexual y sexual de *Cryptococcus*

El género *Cryptococcus* incluye levaduras capsuladas, esféricas de 5-10 µm de diámetro que se reproducen por gemación, con brotes individuales o múltiples. *C. gattii* puede exhibir algunas células alargadas de mayor tamaño (25). En la mayoría de los aislados clínicos de *C. neoformans* se observa levaduras esféricas y capsuladas tanto en el material

patológico como en el cultivo (26). El tamaño de la cápsula varía en función de las condiciones de formación en tejido y cultivo. Cepas mal capsuladas tienen diámetros de sólo 5,2 μm , mientras que los aislados fuertemente capsulados pueden tener un diámetro de células de hasta 80 μm (27). Ocasionalmente *C. neoformans* puede presentar una forma filamentosa (28). *C. neoformans* se encuentra comúnmente en suelos de pH 4,0-7,5.

El hongo es un prototrofo para la mayoría de los aminoácidos, lípidos y azúcares y puede utilizar una variedad de fuentes de carbono para su crecimiento.

C. neoformans tolera temperaturas entre 25 °C y 37 °C (27). Las principales especies patógenas *C. neoformans* y *C. gattii* son levaduras capsuladas heterotálicas. Durante la fase haploide de su ciclo de vida estas levaduras crecen en medios de cultivo no enriquecidos, se desarrollan en 48-72 horas, como colonias de color blanco, mucoides esto último es de acuerdo con el tamaño de la cápsula de las células (29). Los teleomorfos (fase sexual) fueron nombrados *Filobasidiella neoformans* y *Filobasidiella bacillispora* (7). Se han documentado las diferencias considerables entre el complejo *C. neoformans* por un lado, y el complejo *C. gattii* por el otro (30).

Hasta el año 2011 se han descrito más de 104 especies del género *Cryptococcus* (31). En el complejo *C. neoformans* se reconocen dos especies y cinco serotipos (12). *C. neoformans* incluye las variedades *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A; *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo D y el híbrido AD y *C. gattii* incluye los serotipos B y C. En respuesta a la limitación de nutrientes, cuando está en su fase teleomorfa *Cryptococcus* se reproduce sexualmente mediante cruces de cepas compatibles "mating a y δ , para formar el teleomorfo filamentoso, clasificado en el género *Fillobasidiella* (32). Los tipos sexuales a y α son controlados por un solo locus, y la pareja sexual α es la más prevalente en los serotipos A y D, además es convencionalmente determinada mediante PCR (33). Las *MAT α* son cepas predominantes en la naturaleza, en consecuencia, la gran mayoría de los aislados clínicos son cepas *MAT α* ; no se ha dilucidado aún la razón de la escasez de cepas *MAT α* (34).

Las basidiosporas de la fase teleomorfa presentan diferencias; las de *F. neoformans* tienen pared rugosa y son elípticas u oblongas en tanto las de *F. bacillispora* tienen forma bacilar y paredes lisas (32). Por otra parte *C. gattii* puede utilizar glicina como fuente de nitrógeno y se puede desarrollar en presencia de L-canavanina (análogo de arginina), en tanto solamente 20% de *C. neoformans* pueden asimilar nitrógeno a partir de glicina. En base a estas características se utiliza el medio CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol) para diferenciar ambas especies (35). Si los aislamientos no son del complejo *C. gattii/C. neoformans* no tiene sentido emplear este medio para diferenciar, porque otras especies pueden crecer en ese medio y virar el color (36).

	<i>C. neoformans</i>	<i>C. gattii</i>	modo de acción	referencia
distribución	mundial	climas tropicales y subtropicales		
nicho ecologico	excretas de aves	plantas		
tipo de huesped	afecta más a inmunocomprometidos	afecta a inmunocompetentes e inmunocomprometidos		
tropismo	SNC	pulmones, formación de granulomas y SNC		
morfología celular	levaduras globosas o rara vez piriformes	levaduras ovales, o piriformes		
CDB Agar creatinina-dextrosa-azul de bromotimol	negativo (% de falsos positivos)	positivo	creatinina deaminasa inhibida por amoniaco	Kyung J. 1982
GCP glicina-cicloheximida - rojo fenol	negativo	positivo	resistencia a la cicloheximida	Salkin I.F. 1982
CGB L-canavanina-glicina-azul de bromotimol	negativo	positivo	Resistencia a L-canavanina por la utilización de la glicina como C y N	Kyung J. 1982
Asimilación de D- prolina	negativo	positivo	D-prolina o D-alanina como fuente de nitrógeno y pueden asimilar-D-triptófano para producir pigmento	Chang YC. 2015
Gen DAO	+	+++	utiliza D-aminoacidos	Chang YC. 2015
Inhibición con EDTA	negativo	positivo	inhibición de la ureasa por EDTA	Kwon-Chung . 1997
SOD1	no requerido	requerido	superóxido dismutasa antioxidante citoplasmática requerida para la producción de factores de virulencia de la ureasa, PLB y lacasa en <i>C. gattii</i> pero no <i>C. neoformans</i>	Narasipura SD. 2003
TPS1 y TPS2 trehalosa-6-fosfato sintetasa	solo para termotolerancia	necesario para termotolerancia, capsula, melanina e integridad de la pared celular	biosíntesis de la trehalosa, esta es un antioxidante y protector del Stress	Petzold EW. 2006

Tabla - 3 Diferencias entre *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*

En la actualidad con el empleo de diversas técnicas moleculares como la PCR huella digital y el RFLP del gen *URA5*, se han reconocido ocho grandes tipos moleculares: VNI, VNII, VNIII y VNIV de *C. neoformans* y VGI, VGII, VGIII y VGIV para aislados de *C. gattii* (1). Las técnicas de PCR fingerprinting y la PCR-RFLP son las que se utilizan con mayor frecuencia (37).

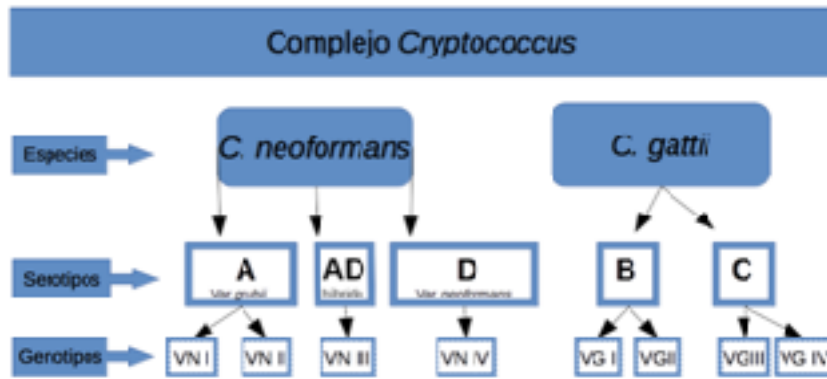


Figura - 4. Clasificación más frecuente del complejo *Cryptococcus*

En la mayor parte de los países Latinoamericanos el patrón predominante es VNI para serotipo A, mientras que los aislamientos del serotipo B son agrupados en su

mayoría en el patrón VGII (38). Se han reportado en aislamientos clínicos como ambientales, y éstos muestran cierta similitud con los aislamientos responsables del brote de criptococosis en la Isla de Vancouver (38).

Se reconoció que África subsahariana ha sido la región del mundo más afectada por el VIH, con un estimado de 2,6 millones de nuevas infecciones cada año en el pico de la epidemia en 1997. En la misma época la criptococosis meníngea (CM) (1990) en Sudáfrica se convirtió en la principal causa de meningitis en adultos. Los ensayos clínicos estimaron que en 90 días la tasa de letalidad de CM asociada al VIH en el este de Asia, Oceanía, Europa Occidental y Estados Unidos era del 9%, en comparación con el 55% en otras partes de Asia y América del Sur, y el 70% en África subsahariana. Actualmente a nivel mundial la criptococosis se produce 2,8-8% en pacientes con trasplantes de órganos sólidos, y esta enfermedad es la tercera infección fúngica, después de candidiasis y aspergilosis. Los síntomas pueden surgir más precozmente en los trasplantes de hígado o pulmón, tal vez porque el nivel requerido de inmunosupresión post-operatorio es mayor (39).

Especie / Variedad / Híbrido	Serotipo	PCR-Huella digital (1, 2, 3)	PCR-Huella digital (4)	AFLP (5)	RFLP URAS (2)	RFLP PLB1 (4)
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	A	VNI	VN6 (VN5)	AFLP1	VNI	A1
	A	VNII	VN7	AFLP1A/ AFLP1D	VNII	A2
Híbrido AD	AD3	VNIII	VN3/VN4	AFLP3	VNIII	A3
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	D	VNIV	VN1 (VN2)	AFLP2	VNIV	A4
<i>C. gattii</i>	B/C	VG1		AFLP4A/ AFLP4B	VG1	A5
	B/C	VGII		AFLP6	VGII	A6
	B/C	VGIII		AFLP5A/ AFLP5B/	VGIII	A7
	B/C	VGIV		AFLP7	VGIV	A8

Tabla 4. Clasificación molecular de *C. neoformans* y *C. gattii* (41).

2. 3 EPIDEMIOLOGIA Y ECOLOGIA

Según el último informe (diciembre de 2010) del Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH / sida y la Organización Mundial de la Salud (<http://www.unaids.org/>), 34 millones de personas en todo el mundo sufren de la infección por VIH / sida, 2,7 millones personas se infectan cada año de esta enfermedad, y 1,8 millones de personas mueren por causas relacionadas con el sida. Entre el 70 al 90% de los pacientes con sida presentan compromiso del sistema nervioso central (22). El mayor número de casos ocurre en África subsahariana, donde más de 25 millones de personas viven con sida (40). La criptococosis no tiene preferencia en cuanto a sexo y es más frecuente en adultos. Algunos pacientes con enfermedades crónicas, como la diabetes mellitus, leucemia, tumores, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), y los pacientes con trasplante de órganos son propensos a esta enfermedad (41). Estudios previos han demostrado que casi el 100% de las personas tienen un título de anticuerpos para *C. neoformans* sin antecedentes de enfermedad clínica (42).

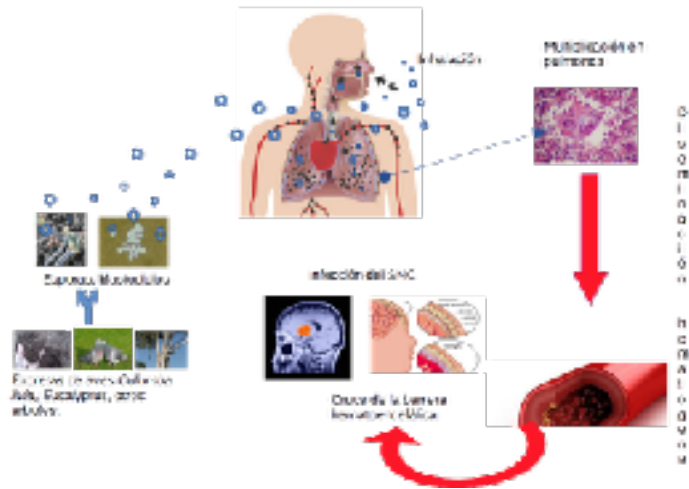
Aunque *C. gattii* posee todos los factores de virulencia identificados en *C. neoformans*, la criptococosis es causada predominantemente por *C. neoformans* y una mayoría de los casos son reportados en pacientes inmunocomprometidos (43). *C. neoformans* de tipo molecular VNI es el predominante en los casos de criptococosis en todo el mundo (63%) seguido por VNII/VNIII (6% cada uno) y el tipo VNIV (5%) (44). Numerosas comunicaciones informan el aislamiento de *C. neoformans* en huecos de troncos, corteza y detritos

de madera de 36 géneros de árboles. La mayoría de las cepas ambientales, independientemente de la procedencia geográfica, pertenece al serotipo A tipo molecular VNI. Se han aislado cepas serotipo D, tipo molecular VNIV del medio ambiente especialmente en Europa central (45).

La criptococosis por *C. gattii* es significativamente menos frecuente a nivel mundial (20%) y los principales factores de riesgo para la infección por *C. gattii* siguen siendo confusos (44). El primer informe sobre el aislamiento de *C. gattii* tipo molecular VGI, serotipo B correspondió a muestras obtenidas de *E. camaldulensis* en Australia (15). *C. gattii*, no ha sido aislado de guano de aves (46). La cepa del brote importante en 1999, en la isla de Vancouver, fue VGIIa, además VGIIc se ha encontrado en el noreste y sureste (47), de EE.UU., estas resultaron ser significativamente más virulentas para los ratones que otros tipos moleculares de *C. gattii* (48). Aunque los cuatro linajes de *C. gattii* son capaces de causar la enfermedad, VGI y VGII son responsables la mayoría de las infecciones en huéspedes inmunocompetentes, mientras que los grupos VGIII y VGIV producen infecciones sólo en raras ocasiones y entre huéspedes predominantemente inmunocomprometidos (49). Actualmente no está claro si la baja incidencia clínica de VGIII y VGIV es debida a diferencias en su capacidad para causar enfermedad o a la escasez en el medio ambiente (50).

La capacidad de *C. neoformans* para colonizar los excrementos de paloma se ha atribuido a la capacidad de esta especie para utilizar creatinina como fuente de nitrógeno (51). *C. gattii* también utiliza creatinina aunque es incapaz de sobrevivir en excrementos de aves. Se sugiere que el metabolismo de la creatinina en ambas especies lleva a la producción de metilhidantoína y amoníaco. La enzima responsable, creatinina desaminasa, es producida por *Cryptococcus* sólo en presencia de creatinina, la síntesis de la enzima es reprimida por el amoniaco en *C. neoformans* pero no en *C. gattii* y la fuerte alcalinización inhibe su crecimiento (52). En excrementos de paloma frescos o húmedos la fuerte alcalinización producida por la descomposición bacteriana también reduce marcadamente la presencia de levaduras de *Cryptococcus* (53).

Ciclo de vida del complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*



2. 4 PATOGENICIDAD

La meningitis criptocócica se considera un marcador de sida, y es la infección fúngica más común del sistema nervioso central y la tercera complicación neurológica más frecuente en pacientes con sida (22). *C. neoformans* es un hongo patógeno que produce una alta tasa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Su patogenicidad es atribuible a la producción de numerosos factores de virulencia; como la termotolerancia, necesidad de nutrientes, una cápsula de polisacárido, la capacidad de producir melanina, las enzimas ureasa, fosfolipasa B / C, (54), un sistema regulador de fosfato (sistema PHO): la fosfatasa ácida (CnPHO2), (CnPHO81), (CnPHO80) que colectivamente promueven la invasión del huésped, y (cnPH085) esencial para el crecimiento de *Cryptococcus* (55). También las vesículas extracelulares asociadas a la parte fenotípica, los procesos oxidativos generados como mecanismo de defensa, la participación de las proteínas antifagocíticas *App1*, otro factor es *Rim 101* asociados al cambio de pH y al ensamblaje de la cápsula a la pared de la levadura, los cambios morfológicos como el switching fenotípico, excepcionalmente formación de pseudohifas y células gigantes (56). El proceso infeccioso empieza con la inhalación de basidiosporas o blastosporas, son inicialmente enfrentadas por los

macrófagos alveolares, después en el pulmón, por las células T, macrófagos, granulocitos y células asesinas naturales. Si el huésped está inmunodeprimido, *C. neoformans* puede diseminarse a otros tejidos sobre todo el cerebro, causando meningoencefalitis letal (57). En raras ocasiones se ha observado transmisión transplacentaria (58).

2.4.1 Cápsula

C. neoformans crece normalmente como una levadura redonda, con uno o dos brotes, rodeados de una cápsula cuyo tamaño varía en función de las condiciones de crecimiento y la genética de la cepa (57). La cápsula es esencial para la virulencia y dota a *Cryptococcus* con propiedades inmunorreguladoras potentes (59).

CAP 10	(Chang y Ewon-Chung, 1994; Chang y Ewon-Chung, 1995; Chang y Ewon-Chung, 1999; Chang et al., 1990; Chang et al., 1993)
CAP19	
CAP20	
CAP24	
CAP31	(Jansen et al., 2001; Moyrand et al., 2004)
CAP32	
CAP33	
CAP34	
CAP35	
MAP1 y MAP2	(Ber Peloc et al., 2001; Jansen et al., 2001; Kocel et al., 2003; Moyrand et al., 2004)

Tabla - 6 Genes involucrados en la síntesis de la cápsula de *Cryptococcus*
extraída de: Rivero-Camacho-Ruiz, 2011.

La cápsula se compone principalmente de dos grandes polisacáridos implicados en virulencia: glucuronoxilomanano (GXM) en un 90-95% y galactoxilomanano (GalXM) en 5-8% además de una menor proporción de mananoproteínas (MPs) (<1%) también puede incluir, ácido hialurónico y ácido siálico (60). Las MPs son altamente inmunogénicas e inducen la formación de anticuerpos (56). La mayoría de los estudios sobre la composición de la cápsula se ha centrado en GXM, que comprende más del 90% del polisacárido de la cápsula (61). El GXM es un polímero largo compuesto por repeticiones de manosa con ramificaciones de ácido glucurónico y xilosas. Esta estructura determina el serotipo de *C. neoformans* y *C. gattii*, ya que diferencias en la estructura y composición del polisacárido de la cápsula generan diferencias antigénicas GalXM, en particular (59).

Existe la teoría que la cápsula es antifagocítica porque esconde de la superficie celular patrones moleculares asociados a patógenos. Por el contrario las células sin cápsula o las esporas son ingeridas a través de la activación de manosa y β -(1-3) glucano (62).

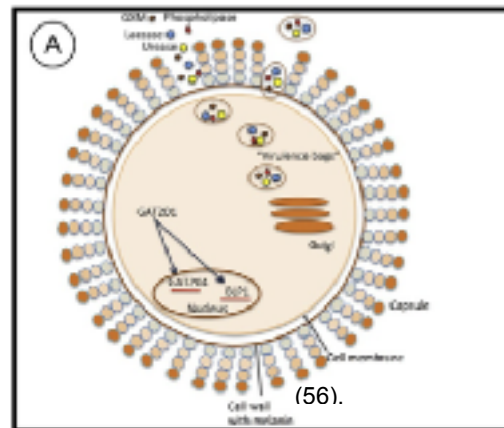


Figura - 5 Cápsula de *Cryptococcus*

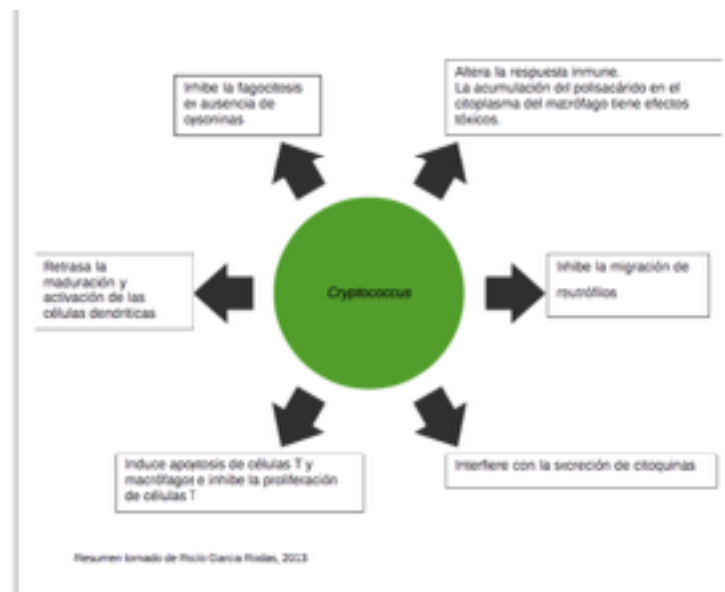


Figura - 6 Cápsula como factor de virulencia y su efecto en el huesped Lilia Acevedo, 2015

El GXM puede ser secretado al medio extracelular dentro de vesículas fúngicas. Estas vesículas contienen grandes moléculas asociadas con la virulencia como lacasa, ureasa y Plb1. *C. neoformans* también se destaca por la producción de varios factores antifagocíticos a través de una extensa red de regulación mediada por Gat 201 (56).

La acumulación en el citoplasma del macrófago de GMX tiene efectos tóxicos para la célula (63).

2.4.2 Melanina y Lacasa

Una característica importante que tiene *Cryptococcus* es su capacidad de sintetizar melanina, existen diferentes tipos: eumelaninas, feomelanina, alomelanina y piomelanina. En el SNC, *Cryptococcus* spp. usa sustratos tales como los neurotransmisores dopamina (L-DOPA) o adrenalina (64), lo que ayuda a la síntesis de melanina (eumelanina), que es un componente de la pared celular del hongo ayudando a la protección frente al estrés oxidativo y la fagocitosis (56). *C. neoformans* produce una enzima cobre-dependiente llamada Lacasa (65), localizada en la pared celular, que cataliza la formación de melanina (66). La lacasa es codificada por el gen LAC1 y regulado por la concentración de glucosa, hierro y cobre (67). Se reportó la existencia de cepas mutantes no productoras de melanina con menos virulencia en modelos animales lo que pone en evidencia su papel en la patogenia (68).

2.4.3 Manitol

En primer lugar, altas concentraciones de manitol en el sistema nervioso central pueden contribuir al edema cerebral. En segundo lugar, el manitol puede proteger a *C. neoformans* del proceso oxidativo utilizado por los fagocitos (57).

2.4.4 Ureasa

Otro factor de virulencia importante es la ureasa. Esta parece tener un papel fundamental en la promoción del desplazamiento de estos hongos a través de las barreras epiteliales y de los endotelios, facilitando así la invasión cerebral (69). Induciendo la respuesta del sistema inmune hacia el predominio de citoquinas Th2, evitando la eliminación de la infec-

ción (70). Aunque la ureasa es un factor importante para la invasión cerebral criptocócica, el sistema de activación enzimática no ha sido estudiado (56).

2.4.5 Fosfolipasa

Las fosfolipasas son enzimas que degradan fosfolípidos. Una isoforma de la fosfolipasa B (Plb1) se secreta durante la infección por *C. neoformans* y aumenta la supervivencia del microorganismo dentro de los fagocitos (71). La fosfolipasa es necesaria para el inicio de la infección pulmonar y su persistencia por *C. neoformans* debido a un gran aumento de su capacidad de adhesión al epitelio pulmonar y para la difusión desde el pulmón a través de los vasos linfáticos y de la sangre, y la difusión en el sistema nervioso central (72) .

2.4.6 Vesículas extracelulares

El complejo *C. neoformans/C.gattii* y otras especies, liberan vesículas extracelulares que atraviesan la pared celular; algunos de sus componentes han sido asociados con la virulencia. Las vesículas extracelulares de *C. neoformans* pueden estimular la función de los macrófagos, para mejorar su actividad antimicrobiana (73). Los estudios preliminares indican que la formación de biofilms podrían participar en la virulencia de *Cryptococcus* (74).

2. 5 DIAGNOSTICO

2.5.1. Muestras clínicas

Dado que la criptococosis es una enfermedad que puede afectar numerosos órganos y sistemas, los materiales clínicos útiles para el diagnóstico son muy diversos, sin embargo, debido al neurotropismo de su agente causal la muestra más frecuente es el LCR. Otros materiales donde puede aislarse este microorganismo, especialmente en pacientes inmunocomprometidos son los hemocultivos, muestras respiratorias, muestras de piel, ganglios linfáticos, nódulos subcutáneos, punción-aspiración o biopsia de médula ósea, biopsias óseas, orina, etc.

Es recomendable dividir en dos partes las biopsias, una porción se coloca en formol para estudio histopatológico y la otra en solución salina estéril para el estudio micológico (75).

El examen en fresco permite una visualización de las levaduras pero no permite observar claramente la cápsula debido a que es altamente hidrófila y ocasionalmente se puede confundir a *Cryptococcus* con otros hongos levaduriformes. La observación de las levaduras de *C. neoformans/C. gattii* se ve facilitada por el agregado de tinta china a una gota del sedimento de LCR o de orina (que son líquidos claros), lo que evidencia la presencia de cápsula. En materiales purulentos es recomendable la preparación al estado fresco o la utilización de microscopia con contraste de fase. En el primer caso, la cápsula se presenta como un halo claro rodeando a las levaduras. Estos materiales pueden colorearse con Giemsa, donde se presentan las levaduras redondas con la cápsula se ve teñida de color rosa con radiaciones, o como un halo claro. Bonifaz (2012) recomienda la preparación de un frotis fijado al calor al que se agrega fucsina básica y luego tinta china. Sin embargo, el método de referencia para el diagnóstico de criptocosis, es la asociación de la presencia de la levadura observada con tinta china en LCR y el cultivo, o también la relación de la histopatología con el cultivo (76). Existen desventajas en el examen directo de tinta china, como influencia del grosor, la calidad de la tinta, y la presencia de artefactos o la contaminación de la tinta pueden dar un falsos positivos o negativos (77).

Todas las muestras clínicas deben sembrarse en agar Sabouraud, agar semilla de girasol (o agar niger), a 25-28 °C y en medios enriquecidos como BHI a 37 °C. Esta levadura se desarrolla habitualmente en 48-72 h, pero los cultivos no deben descartarse hasta los 15 - 30 días, en particular si el paciente está bajo tratamiento antifúngico (78). De esta forma ya se puede evidenciar la presencia de levaduras que producen pigmento melánico y la capacidad de desarrollo a 37 °C que orientan la identificación hacia el complejo *C. neoformans/C. gattii* (79).

Los hemocultivos y los mielocultivos pueden realizarse por la técnica de lisis-centrifugación, técnica de buffy-coat, o procesarse como los hemocultivos bacteriológicos, ya que *Cryptococcus* se desarrolla bien en esos medios. Nunca deben descartarse los frascos antes de los 10 días. Cuando hay desarrollo de levaduras, deben hacerse repiques en medio de semillas de niger o girasol para evidenciar la producción de fenoloxidasa.

Se pueden tomar materiales de excretas de palomas u otras aves, material de corteza y huecos de troncos de árboles, hojas, flores y frutos, suelo, polvo, etc. sembrados por triplicado en agar niger.

2.5.2. Identificación

La identificación fenotípica se realiza por las pruebas de ureasa (80), fenoloxidasa (81), capacidad de desarrollo a 37 °C, la presencia de cápsula y la prueba de la enzima nitrato - reductasa.

La diferenciación bioquímica de las especies *C. neoformans* y *C. gattii* se hace utilizando el medio agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB): este medio, diferencia *C. gattii* de *C. neoformans*, *C. gattii* puede crecer en presencia de L-canavanina y utilizar glicina como única fuente de carbono (82), mientras que la L-canavanina inhibe a *C. neoformans*. También se puede realizar D-prolina o triptófano: esto se basa en la capacidad de *C. gattii* de utilizar estos componentes como única fuente de nitrógeno (83).

Existen los métodos de identificación semiautomáticos como API 20C AUX y Vitek^R MSTM (BioMerieux) (84). Recientemente se han comenzado a utilizar equipos basados en identificación de proteínas por espectrometría de masa (MALDI-tof: matrix assisted laser desorption ionization-time of flying) (85) y sistema Vitek 2 (86).

2.5.3. Diagnóstico inmunológico

La detección de antígeno capsular de *Cryptococcus* por aglutinación de partículas de látex o ELISA, se puede realizar en casi todos los fluidos corporales y tiene una sensibilidad y especificidad general de 93-100% y 93-98%, respectivamente (79). Tiene valor en el diagnóstico precoz de la meningitis criptocócica (87). La tasa de falsos positivos es inferior al 1%, y generalmente se explica por problemas técnicos u otras infecciones, (incluyendo reacción cruzada con antígenos de *Trichosporon*) (88). Estas pruebas pueden ocasionalmente producir falsos negativos en infecciones tempranas. Pero pueden ser positivas antes de que se observe, el crecimiento de colonias de *Cryptococcus* en cultivo (88). Se ha demostrado recientemente, que algunos equipos que utilizan la técnica de aglutinación de partículas de látex (Remmel y Pastorex), no tienen sensibilidad suficiente para detectar infecciones por *C. gattii* o híbridos entre *C. gattii* o *C. neoformans* (89). La inmunocromatografía es un método más sensible y subsana dicho inconveniente (90). Por ese motivo es útil para el diagnóstico temprano de la criptococosis meníngea (91). La Prueba de Flujo Lateral (CrAg), es un sistema de prueba inmunocromatográfica para la detección cualitativa o semicuantitativa temprana de los antígenos capsulares del complejo de especies, *C. neoformans/C. gattii*: en suero y en líquido cefalorraquídeo, antes de la aparición de los síntomas de la criptococosis (88).

2.6. INMUNIDAD

Las esporas son inicialmente no capsuladas pero al entrar en el pulmón ocurre la transformación a levadura acompañada por la rápida síntesis de la cápsula anclada por la pared celular, compuesta de glucanos, quitina, quitosano y glicoproteína (1). El neurotrofismo características de *C. neoformans* fue reconocido por primera vez en 1914 por Verisé, y dos años más tarde por Stoddard y Cutler (34). Otras enfermedades de base en in-

individuos inmunocomprometidos favorecen la infección por este hongo entre ellas se incluyen: el tratamiento prolongado con corticoides, trasplante de órganos, enfermedades malignas avanzadas, diabetes, sarcoidosis y el linfocitopenia idiopática de CD4 (92). También puede afectar a inmunocompetentes que presentan enfermedad pulmonar de base (93). Los autoanticuerpos contra el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), son aparentemente un importante factor de riesgo subyacente de meningoencefalitis causada por *Cryptococcus* en individuos por lo demás sanos. Por alguna razón desconocida, los anticuerpos neutralizantes contra GM-CSF parecen ser un mayor riesgo de criptococosis debida a *C. gattii* a diferencia de lo que sucede con *C. neoformans*. Es probable que una evaluación inmunológica completa de pacientes con meningoencefalitis por *C. gattii*, que habían sido considerados como inmunocompetentes, revelaría que la mayoría de ellos padecerían una disfunción inmune oculta (94). Recientemente se ha postulado que el ácido hialurónico capsular puede mediar la adhesión de monocitos inducida por *C. neoformans* y la migración de la levadura a otros órganos (95). Se sugiere que las personas infectadas por el VIH en los que se reduce el porcentaje de células B de memoria que expresan IgM podrían estar en mayor riesgo para el desarrollo de la criptococosis (96).

2.7 MANIFESTACIONES CLINICAS

2.7.1 Criptococosis pulmonar

La enfermedad casi siempre se localiza de manera bilateral confinada al lóbulo superior; sin embargo, hay casos con compromisos unilateral. La sintomatología de la criptococosis leve simula un cuadro gripal, acompañado de tos, fiebre y discreto dolor pleural; no obstante, cuando el proceso se intensifica, la fiebre es más constante, hay pérdida de peso, astenia, adinamia y el paciente presenta tos con esputo mucoso o hemoptoico (79). La

criptococosis se puede presentar como una enfermedad pulmonar: aguda, subaguda o crónica

2.7.2 Criptococosis meníngea

La infección por *Cryptococcus* spp. es la principal causa de meningitis fúngica en pacientes inmunocomprometidos, con elevados índices de morbilidad y mortalidad (97). También se presenta en pacientes sin compromiso inmunológico (98). Afectando más al sexo masculino (98). Esta etiología micótica debe considerarse en todos los pacientes que presenten síntomas de la meningitis, la cefalea es el síntoma principal y la fiebre, además vómito, náuseas, confusión mental, delirio y compromiso de los nervios craneales I, III, IV, VI, incluyendo alteraciones de la marcha (99). Generalmente se observa LCR claro con bajos niveles de glucosa y proteínas elevadas, en los enfermos con sida las alteraciones químicas y citológicas del LCR suelen ser mínimas por la incapacidad de producir una respuesta inflamatoria (100). La criptococosis del sistema nervioso central (SNC) en pacientes inmunocompetentes es poco frecuente, ocasionando un espectro clínico diferente, preferentemente se manifiestan como lesiones granulomatosas denominadas criptococomas que se localizan en el pulmón o en el SNC (101). Los criptococomas en pulmón y cerebro se han reportado de niños inmunocompetentes con meningoencefalitis por *Cryptococcus* (102). El 25% de los pacientes con meningitis pueden presentar criptococomas (103).

2.7.3 Criptococosis cutánea

La criptococosis cutánea puede ser clasificada en: criptococosis cutánea primaria y criptococosis cutánea secundaria. La criptococosis cutánea secundaria generalmente ocurre durante una infección diseminada por *Cryptococcus*, en pacientes con linfoma de células T (104), pacientes con hemodiálisis, diabéticos y tratamiento con esteroides entre otros (105). Las lesiones cutáneas secundarias aparecen entre un 10-20% de los casos, suelen tener un aspecto clínico similar al *molluscum contagiosum* o como nódulos subcutáneos

que evolucionan hacia gomas (106). El espectro clínico es muy variable; pueden encontrarse pápulas, nódulos, úlceras, abscesos y pústulas, lo que puede hacer que se confunda con diferentes entidades como una celulitis. La criptococosis cutánea primaria ocurre con menos frecuencia, está relacionada con un trauma previo en los lugares expuestos del cuerpo (107). También puede presentarse en personas que trabajan con *Eucalyptus* (108). *C. neoformans* se ha descrito pocas veces en la infección de tejidos blandos en forma invasiva, aunque se acepta que la afectación cutánea es un marcador de la criptococosis diseminada. Se ha informado de que el tacrolimus (inmunosupresor) causa inhibición dependiente de la temperatura en *C. neoformans* que pueden prevenir la infección del SNC y permitir el crecimiento de hongos en los sitios del cuerpo más fríos tales como la piel (109).

2.7.4 Criptococosis ocular

Sus manifestaciones oculares habitualmente derivan de una meningitis. Puede producir endoftalmitis y atrofia del nervio óptico (110). El ojo puede ser afectado, con pérdida parcial o total de la visión (111).

2.7.5 Criptococosis ósea y visceral

La criptococosis puede causar disfunción hepática en pacientes inmunocompetentes (112). Se han publicado más de 80 casos de osteomielitis por *Cryptococcus* (113).

2.8 PREVENCIÓN

La comprensión de la ecología del complejo *C. neoformans*, así como de la epidemiología y patogenia de la criptococosis es en la actualidad un desafío para los apasionados de este hongo, todos los estudios tienen como fin primordial el desarrollo de estrategias en el manejo y prevención de la infección en los individuos que presentan algún factor predisponente. El CDC recomienda evitar la exposición al hongo, procurando alejarse de los sitios altamente contaminados con excrementos de aves, en particular los excrementos de

palomas, las aves como mascotas, la alta concentración de árboles considerados nichos para *C. gattii* y otras especies potencialmente patógenas. Se han identificado varios antígenos que parecen aptos como candidatos en la producción de vacunas. Una vacuna contra la criptococosis en los seres humanos es probablemente viable pero hay obstáculos importantes para el desarrollo de vacunas que van desde las incertidumbres acerca de la patogénesis de la infección a las consideraciones económicas (78). Recientemente se ha experimentado con vacunas utilizando partículas de glucano con resultados prometedores (114). Deben implementarse medidas, para evitar la exposición persistente a los patógenos fúngicos potenciales, determinando las áreas protegidas y las medidas recomendables, tales como el control de la calidad del aire y del agua dentro y fuera del hospital, debe considerarse el uso de profilaxis antifúngica, aunque sólo sería justificable en África sub-sahariana en donde más del 30% de los HIV+ con <100 CD4/uL padecen criptococosis (115).

2. 9 TRATAMIENTO

La criptococosis es una de las infecciones oportunistas principales observadas en pacientes VIH positivos con recuentos de células CD4+ <100/uL, y es fatal, si no se administra tratamiento en los primeros días de iniciado los síntomas (116). También se han reportado diferencias en la sensibilidad antifúngica de las dos especies de *Cryptococcus*. Un estudio realizado por Trilles *et al.* encontró que *in vitro*, *C. gattii* era menos sensible a siete compuestos antifúngicos en comparación con *C. neoformans*, aunque ambos mostraron igual sensibilidad a la anfotericina B y flucitosina (117). Estos resultados indican que la especie de *Cryptococcus*, el genotipo molecular, y la región de origen, pueden ser importantes en el momento de decidir las opciones de tratamiento para la criptococosis (118). Algunos estudios epidemiológicos recientes demuestran que ciertas cepas de *C. gattii*, especialmente las del tipo molecular VGII, tienen relativamente baja sensibilidad a flucanazol, con buena sensibilidad a voriconazol y posaconazol (119). El tratamiento consta de 3 fases, a saber: inducción, consolidación y mantenimiento o profilaxis secundaria que

incluyen anfotericina B, 5 fluocitosina, fluconazol, en pacientes con intolerancia o resistencia a fluconazol se indica itraconazol o posaconazol (120). También se han hecho estudios con fisetina este es un compuesto que actúa en la biosíntesis de ergosterol (121). Por la toxicidad que pueden presentar estos medicamentos algunos autores proponen el uso de medicamentos alternativos utilizando miel y propóleos de abejas que por su alto contenido de ácidos fenólicos y flavonoides son activos "in vitro" como fungistáticos y fungicidas (122).

3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La criptococosis meníngea (CM) es una enfermedad común, con más de 1 millón de casos y 600.000 muertes / año. Existen presentaciones no meníngeas como la pulmonar y cutánea, e infección del torrente sanguíneo (criptococcemia) a partir de la cual se puede diseminar a múltiples sitios. La mayor influencia en la epidemiología de la criptococosis en los últimos 30 años ha sido la pandemia del VIH (39). La vigilancia molecular de los aislamientos del complejo *C. neoformans/C. gattii* es una herramienta epidemiológica de gran valor, teniendo en cuenta que la criptococosis ha adquirido en los últimos años un gran interés debido al creciente número de pacientes inmunosuprimidos (123). El género *Cryptococcus* es el más común entre las levaduras patógenas después de *Candida* recuperados de muestras clínicas (32,9% de 8.717 aislamientos) la criptococosis se asocia con tasas altas de mortalidad (124). *C. gattii* AFLP6 / VGII está presente en el medio ambiente del Caribe holandés y Puerto Rico, lo que sugiere que *C. gattii* puede estar presente en otras localidades del Caribe. Poco se sabe sobre la epidemiología de *C. gattii* en América Central y el Caribe (125).

En Honduras se realizó un estudio en el Hospital escuela y el INCP donde se detectó que las micosis predominantes por orden de frecuencia fueron; candidiasis 63%, criptococosis 29% e hístoplasmosis 8%; con predominio del sexo masculino con una relación de 1,7:1 en pacientes con VIH-positivo (24).

En nuestro país no se ha implementado aún una técnica molecular para la genotipificación de las cepas de *Cryptococcus* aisladas de muestras ambientales y de pacientes en los diferentes hospitales del país.

En Honduras, patologías como la criptococosis no han podido ser controladas, porque no se han realizado estudios previos que alerten sobre la presencia de este patógeno en ambientes que son altamente frecuentados por el humano. Además no se conocen las especies y genotipos de *Cryptococcus* que afectan al hombre, ni los que están presentes en los nichos ecológicos predilectos por este hongo.

4. HIPOTESIS

Las cepas del complejo *Cryptococcus* aisladas de pacientes inmunodeprimidos en el Instituto cardiopulmonar, y del ambiente, corresponden principalmente a *C. neoformans* variedad *grubii* genotipo *VNI*.

5. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Determinar los genotipos de cepas de *Cryptococcus* aislados en pacientes, y muestras ambientales, mediante la técnica molecular de PCR- RFLP *URA 5* del Instituto Nacional Cardiopulmonar, Tegucigalpa, Honduras, 2014-2015.

2. Objetivos específicos

- Demostrar la presencia de la levadura de *Cryptococcus* en muestras clínicas y ambientales e identificarlas por métodos directos y pruebas bioquímicas.
- Caracterizar fenotípicamente los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* aisladas de muestras clínicas y del ambiente, utilizando el medio de CGB.
- Identificar los genotipos de los aislamientos de *Cryptococcus* en muestras clínicas y ambientales mediante la técnica molecular PCR-RFLP *URA5*.
- Comparar los principales factores de patogenicidad entre los aislamientos ambientales y clínicos de *C. neoformans* y *C. gattii*.
- Identificar los hongos ambientales que coexisten con *Cryptococcus* en el medio ambiente como probable fuente de infección para una micosis invasora.
- Analizar los datos demográficos y factores predisponentes en los pacientes con criptococosis.

6. METODOLOGIA

6.1 Tipo de estudio

Enfoque del estudio cuantitativo, tipo descriptivo, Diseño no experimental. La población objeto de estudio son las levaduras de *Cryptococcus*.

Utilizando los archivos del laboratorio como antecedente para ser utilizado como marco de referencia, el mapa del INCP será otro recurso para identificar la posición de los árboles y nichos de palomas a analizar. El tipo de muestreo fue por conveniencia, muestra probabilística, se fraccionó el predio en zona 1, zona 2 y zona 3.

6.2 Alcance

Este estudio ofrece la posibilidad de predecir que el genotipo de *Cryptococcus* aislado en el INCP que puede ser potencialmente patógeno para personas inmunodeprimidas e inmunocompetentes.

Se ha seleccionado el INCP porque es un hospital con árboles, aves, también asisten personas que pueden infectarse con *Cryptococcus*, además existe la facilidad de recolección de cepas clínicas por parte del personal de laboratorio, donde Dr. José Iván Rodríguez jefe de la unidad de Micología es el responsable.

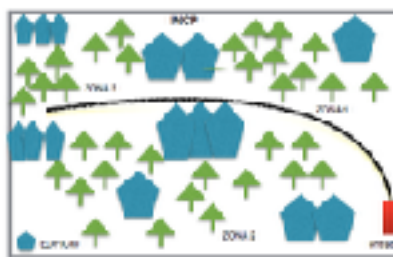
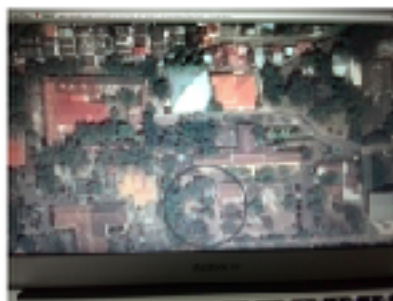


Figura - 6. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica y zonas de estudio

6.3 Variables

OBJETIVO #1	Demostrar la presencia de la levadura de <i>Cryptococcus</i> en muestras clínicas y ambientales e identificarlas por métodos directos y pruebas bioquímicas.	
Variable	Definición	Operacionalización
Paciente	Persona con síntomas y signos clínicos característicos de criptococosis	Síntomas clínicos; Fiebre, cefalea, convulsiones, etc.
Muestras	Muestras clínica tomada de un paciente con criptococosis	LCR, orina, biopsias, esputo , etc.
Género de palomas	Es una especie de ave columbiforme de la familia Columbidae. Es el ancestro de las palomas domésticas,	identificación
Género de hongo aislado	Los hongos son organismos eucarióticos que realizan una digestión externa de sus alimentos	aislamiento e identificación
lugar de muestreo	Es la zona o área verde donde se tomaran las muestras ambientales y se han distribuidas en 3 partes	zona 1 está ubicado en el área verde ubicada en al parte frontal del INCP Zona 2 área verde ubicada en el centro del INCP zona 3 área verde ubicada en la parte posterior del INCP
árbol	Planta de tronco leñoso, grueso y elevado que se ramifica a cierta altura del suelo formando la copa:	Los eucaliptos de porte recto. La corteza exterior es marrón clara con aspecto de piel y se desprende a tiras, con hojas ovaladas con olor característico.
arbusto	planta leñosa, no se yergue sobre un solo tronco o fuste, sino que se ramifica desde la misma base.	plantas que se encuentre a 5 metros de distancia a la redonda máximo del árbol de Eucaliptus.
Flores	La flor es un corto tallo de crecimiento determinado que lleva hojas modificadas estructural y funcionalmente para realizar las funciones de reproducción.	cortar flores y colocar en una bolsa ziploc, macerar y cultivar en Agar semilla girasol
corteza	La corteza es la capa más externa de <u>tallos</u> y de <u>raíces</u> de <u>plantas leñosas</u> , como los <u>árboles</u> .	desprendimiento de la corteza con cuchillo mínimo 10 pulgadas del suelo, macerar y cultivar en Agar semilla girasol
detritus en suelo y oquedales del árbol	son <u>residuos</u> , generalmente sólidos permanentes, que provienen de la descomposición de fuentes orgánicas (vegetales y animales). Es materia muerta.	Recoger con cuchara el detritus del suelo debajo del árbol y el detritus que se encuentre en las oquedales y guardarlo en bolsas plastica Ziploc, macerar y cultivar en Agar selilla Girasol
Guano	El guano (del <u>quechua wanu</u>) es el sustrato resultante de la acumulación masiva de <u>excrementos</u> de aves en ambientes áridos o de escasa humedad.	Recolección de excremento haciendo uso de guantes y mascarilla para depositarlo en bolsas ziploc. macerar y cultivar en agar semilla girasol
OBJETIVO # 2 y # 4	Caracterizar fenotípicamente las cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i> aisladas de muestras clínicas y de pacientes, utilizando prueba bioquímica CGB. Factores de patogenicidad	

Variable	Definición	Sistema de operaciones
fenoloxidasa	Enzima producida por la levadura de <i>Cryptococcus</i>	Observar pigmento de melanina de color café oscuro debido a la oxidación de los substratos fenólicos del medio de cultivo Agar semilla de girasol por la presencia de la enzima fenoloxidasa que posee el hongo.
ureasa	Enzima producida por la levadura de <i>Cryptococcus</i> capaz de hidrolizar la urea	Suspender en 0,5 ml de medio de urea una porción de la colonia de <i>Cryptococcus</i> , observar un color rosado como resultado positivo.
nitratos	Es la capacidad que tiene la levadura de reducir los nitratos a nitritos o aminas y nitrógeno libre	Utilizar caldo con nitrato 2 ml, incubar a 37 °C x 24 horas, utilizando los reactivos : alfa naftol y acido sulfanílico.
cápsula	La cápsula es una estructura que rodea la levadura, está compuesta principalmente de dos polisacáridos, glucuronoxilomanano (GXM) y galactoxilomanano (GalXM), además de una menor proporción de manoproteínas.	Inducción de capsula sembrar en Sabouraud la levadura e incubar en atmosfera de CO2.
crecimiento a 37 °C y 40 °C	Capacidad de <i>Cryptococcus</i> spp de crecer a 37 °C y 40 °C	Incubar los cultivos de <i>Cryptococcus</i> a 37 °C y 40 °C.
Especie	El complejo <i>Cryptococcus</i> comprende dos especies <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> , con diferencias epidemiológicas y patógenas.	Sembrar las cepas de <i>Cryptococcus</i> en medio de CGB.
perfil de asimilacion de compuestos de carbono		Utilizar de Api aux 20C.
OBJETIVO # 5	Identificar los genotipos de las cepas de <i>Cryptococcus</i> aisladas en muestras clinicas y ambientales mediante la técnica molecular PCR-RFLP <i>URA5</i> .	
variedades de cepas de <i>Cryptococcus</i>	El complejo <i>Cryptococcus</i> esta formado por 8 variedades <i>C. neoformans</i> : VNI, VNII, VNIII, VNIV. <i>C. gattii</i> : VGI, VGII, VGIII, VGIV	Utilizando la tecnica molecular PCR-RFLP <i>URA5</i> .
OBJETIVO # 6	Identificar los hongos ambientales que coexisten con cepas de <i>Cryptococcus</i> .	Reaislar en Sabouraud las colonias con características coloniales de hongos e identificarlas por morfología colonial y celular haciendo montajes con azul de lactofenol luego observando su morfología celular en microscopio binocular con objetivo de 40x.
OBJETIVO # 5	Analizar los datos demográficos y factores predisponentes en los pacientes con criptocosis.	
Factor de riesgo	Es cualquier rasgo, característica o exposición de un individuo que aumente su probabilidad de sufrir una enfermedad o lesión.	revision de expediente de paciente
edad	Es el tiempo que una persona ha vivido a partir de su nacimiento.	Años
Sexo	Son características anatómicas, biológicas y fisiológicas que diferencian al hombre y a la mujer	Características fisicas

Tabla-6 definición de Variables

Objetivo específico # 1

Demostrar la presencia de la levadura de *Cryptococcus* en muestras clínicas y ambientales, e identificarlas por métodos directos y pruebas bioquímicas.

6.4 Instrumentos

La medición se realizó a través de pruebas estandarizadas, cuestionario. (Ver anexos).

El instrumento cuestionario (ver anexo). Las muestras clínicas (principalmente LCR y otras) se estudiaron previa solicitud del médico. Se le realizó un examen directo en fresco y una prueba de tinta china. Además, la muestra se cultivo en agar Sabouraud por duplicado y se incubó a 25 °C y 37 °C. Los resultados se recolectaron en instrumento #3 (ver anexos).

6.5 Área a estudiar

Tegucigalpa, es la capital y sede del gobierno de la República de Honduras, la cual se encuentra unida a la ciudad de Comayagüela, por lo que se les declaró como Distrito Central (D C), se encuentra en la región montañosa sur central de Honduras, en el departamento de Francisco Morazán, del cual Tegucigalpa es también la cabecera departamental. El área metropolitana de Tegucigalpa y Comayagüela se encuentra rodeado por montañas, geológicamente separadas por la cuenca del río Choluteca. El Distrito Central al igual que gran parte del centro de Honduras, tiene un clima tropical, aunque templado por la altitud. Cuenta con dos temporadas, una seca y fría que comienza en noviembre y finaliza en marzo, y la temporada lluviosa y cálida que inicia en abril y finaliza en octubre. El promedio de horas de sol por mes durante el año es 211,2 ,y el promedio de días lluviosos por mes es de 8,9. El promedio de horas de sol durante la estación seca es de 228 por mes, mientras que 182,5 milímetros (7,19 pulgadas) es el promedio de precipitación mensual durante la estación húmeda. Los meses más lluviosos de la temporada de lluvias es de mayo-junio y septiembre-octubre, con un promedio de 16,2 días de lluvia durante esos períodos. Coordenadas 14° 5' 39" N, 87° 12' 24" O. Temperatura media 12 °C a 37 °C.

El INCP se encuentra rodeada en su parte norte por el cerro El picacho con altura máxima de 1200 metros sobre el nivel del mar.

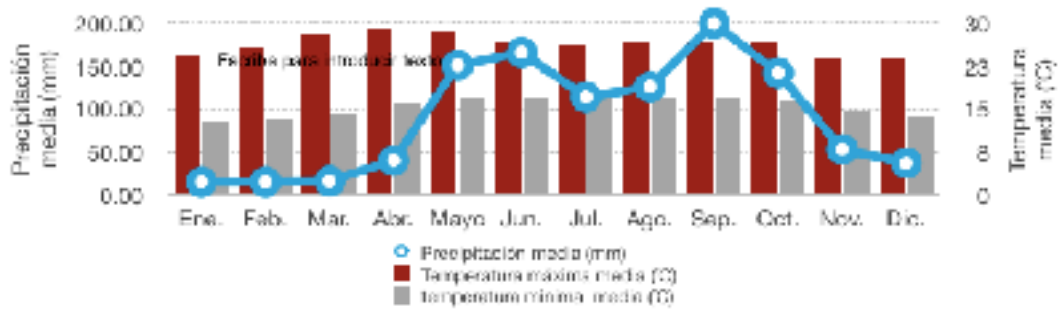


Figura - 9 Temperaturas y precipitación promedio en la ciudad de Tegucigalpa, FM, Honduras.

El área del INCP se dividió en tres zonas; Z1, (Noreste), Z2 (sur), Z3 (oeste), la Z1 está situada en la entrada del hospital, la Z2 es la parte media y la Z3 la parte más interna del hospital, aquí se encuentra la sala de cardiología y cuenta con 28 árboles de diferentes especies.

La muestra de árboles:



Figura - 10 Mapa de Honduras y el departamento de Francisco Morazán y el área de estudio en el INCP

Se enumeraron los árboles a partir del uno, luego se seleccionaron los números pares del mismo género.

La toma de muestras de árboles y de excretas se tomó de este a oeste, o sea a partir del portón de entrada del hospital.

Se realizaron muestreos ambientales de excretas de aves, detrito de arboles, y hojas en las áreas verdes del INCP.

Se seleccionaron aquellas áreas donde se observó una alta presencia de aves para la recolección de sus excretas, se obtuvieron muestras ambientales a partir de suelos contaminados con excrementos de aves, así como de materiales y detritos depositados en las oquedades de los árboles, y material vegetal depositado en la base del árbol.

BREVE HISTORIA DEL INCP

El Instituto Nacional Cardiopulmonar fue creado en el año de 1948 como “Sanatorio Nacional Antituberculoso”. Posteriormente en 1968 se transformó en el “Instituto Nacional del Tórax”, incrementando su cobertura a todo tipo de enfermedades cardiorrespiratorias. Aunque finalmente en 1992 por Acuerdo Ministerial se convierte en el “Instituto Nacional Cardiopulmonar”. Cuando en Honduras se presentaron los primeros casos de VIH el “Hospital del Tórax”, fue el que tuvo la responsabilidad de dar atención a los pacientes que eran remitidos de otros hospitales a nivel nacional. En 1992 por acuerdo Ministerial el Hospital del Tórax se convirtió en el Instituto Nacional Cardiopulmonar de IV nivel de atención. En base a esto se creó la unidad de investigación y docencia, la que entre otras cosas le da el status de Instituto. Por Acuerdo Ejecutivo No.2436 es llamado Instituto Nacional Cardiopulmonar (INCP). El Instituto Nacional Cardiopulmonar cuenta con 427 profesionales de la salud. El INCP es el único en el país que cuenta con medidas de bioseguridad, salas de presión negativa en Broncoscopía y salas de Tuberculosis. Funciona una clínica de Asma, Tuberculosis, Cesación Tabáquica y una sala para Cáncer Pulmonar. Además cuenta con los servicios de apoyo de radiología e imagen, anatomía patológica, hemodinamia, laboratorio clínico, cuidados intensivos, cardiología, pruebas de función pulmonar, farmacia, laboratorio, electro y ecocardiograma y esterilización de equipos (126).

6.5 Recolección de la muestra

6.5.1 Muestras de pacientes

Los aislamientos de pacientes fueron facilitados por el personal del laboratorio clínico del Instituto Nacional Cardiopulmonar.

6.5.2 Muestras ambientales

Se realizó un muestreo aleatorio de acuerdo a una programación (al menos 300 muestras) de diferentes árboles y nichos ecológicos, de acuerdo al método analítico a emplear, el tamaño mínimo de muestra fue de 4 gramos y fue representativa (de diferentes partes del árbol y nidos). Las muestras se procesaron de manera inmediata en el laboratorio de Micología de la UNAH. El muestreo se realizó mensualmente durante un período de 3 meses. En cada sitio de muestreo se colectaron aproximadamente 4 g de excretas secas con bajalenguas estériles y se colocaron en bolsas de 30 x 20 cm. Las hojas se cortaron con podadoras, la corteza con cuchillo a una distancia mayor de 30 cm. del suelo.

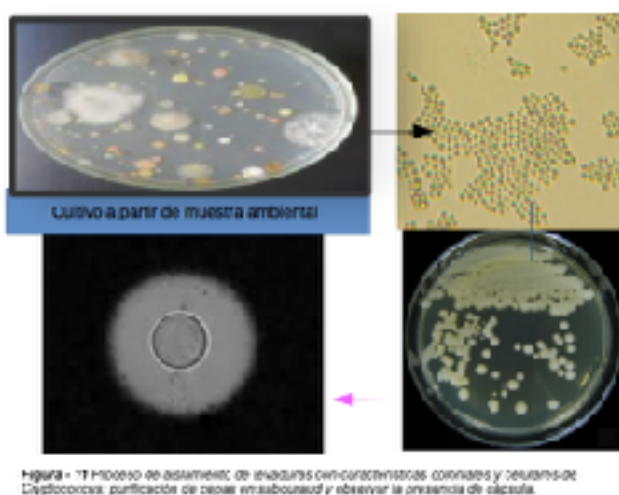
Codificación de muestras y aislamientos

Codigo	Origen	Codigo	Origen
AE	Excretas	DEnt	Detritus de <i>Enterolobium</i>
AA	Ambiente	HMain	Hojas de <i>Mangifera indicans</i>
HEu	Hojas de <i>Eucalyptus</i>	FLMain	Flor de <i>Mangifera indicans</i>
CEu	corteza de <i>Eucalyptus</i>	DMain	Detritus de <i>Mangifera indicans</i>
FEu	Flor de <i>Eucalyptus</i>	FIHib	Flor de <i>Hibiscus</i>
FruEu	Fruto de <i>Eucalyptus</i>	HHib	Hoja de <i>Hibiscus</i>
DetrEu	Detritus de <i>Eucalyptus</i>	HLauno	Hojas de <i>Laurus nobus</i>
HEnt	Hoja de <i>Enterolobium</i>	FruCarurens	Fruto de <i>Caryota urens</i>
CEnt	Corteza de <i>Enterolobium</i>	LCR	Liquido cefalorraquideo
		Esp	Esputo

Tabla - 7 Codificación de muestras ambientales y clínicas

6.6 Procesamiento de la muestra

Para procesar las muestras se usó la técnica de Shields y Ajello, modificada por Pal y Baxter (123). Un gramo de cada muestra se maceró en mortero, luego se disolvió en 50 ml de solución salina 0,9% estéril con agitación durante 5 minutos. Se dejó reposar por 30 minutos, y del sobrenadante se tomó 1 ml el cuál se sembró por triplicado en placas que contenían medio agar níger (*Guizotia abyssinica* - semillas de níger 70 g; glucosa 10 g, cloranfenicol 50 mg; bifenilo 1 g, agar 20 g; agua destilada 1000 ml).



Las muestras se incubaron a 28 °C (temperatura ambiente) y se observaron durante 7 días. Se identificaron las colonias levaduriformes color pardo claro con pigmentación marrón y característica mucoide, observadas mediante estereoscopio. Fueron reaisladas en agar Sabouraud dextrosado para obtener cultivos puros (Difco, laboratorios, Detroit, MI, EE.UU.) y se observaron al microscopio con tinta china para investigar la presencia de cápsula.

6.7 Pruebas bioquímicas para identificación de género

6.7.1 Ureasa

Se detectó la producción de ureasa en medio de Christensen modificado, y por la prueba de micrométodo. Para el primero se utilizó: (peptona, 1 g; cloruro de sodio, 5 g; fosfato

monopotásico, 2 g; de glucosa, 1 g; urea, rojo fenol 0,2%, 6 ml; agua destilada, 1000 ml). Para la prueba del micrométodo: Urea (Difco, Detroit, EE.UU.) 6,0 g, extracto de levadura 0,03 g, rojo de fenol 3,0 mg, KH_2PO_4 0,41 g, Na_2HPO_4 0,43 g, y agua destilada 150 ml. Se esterilizó por filtración, se incubó a 37 °C, un tubo del medio de cultivo sin inocular a para control de calidad. Se realizó una suspensión en 0,5 ml del medio de urea de cada aislamiento a partir de cultivo de 24-72 horas, se incubó de 4 a 6 horas a 37 °C. El viraje del indicador a rojo determinó la presencia de la enzima ureasa. La concentración de la ureasa se midió cada hora mediante espectrofotometría a una absorbancia de 550 nm.



Figura - 12 El viraje de color a rojo en *Chrysolaryum mercuriale*



Figura - 13 Prueba de ureasa rápida



6.7.2 Prueba de fenoloxidasa

Se determinó la prueba de fenoloxidasa utilizando el medio de Agar Niger. También se experimentó utilizando semillas con características bioquímicas similares a *Guizotia abyssinica* como: *Dioclea megacarpa*, *Canavalia ensiformis*, *Moringa oleífera*, *Phaseolus vulgaris*, *Mucuna pruriens* y *Linum usitatissimum*.

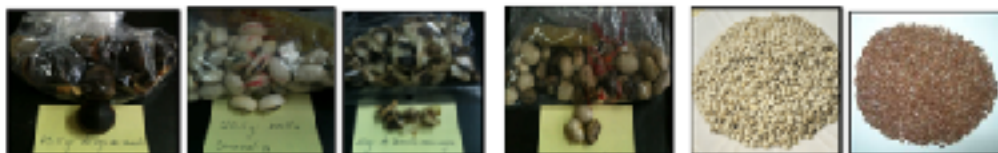


Figura - 14 Semillas de: *Dioclea megacarpa*, *Canavalia ensiformis*, *Moringa oleífera*, *Phaseolus vulgaris*, *Mucuna pruriens* y *Linum usitatissimum*

Se pulverizaron en un mezclador doméstico y se pesaron 15 g de la semilla.

Se hirvió durante 20-30 min en 250 ml agua destilada, seguido por filtración a través de un paño de gasa. Luego, se añadió 9 g de agar y se agregó 250 ml de agua destilada.

Se hirvió durante 20-30 min nuevamente, y el valor de pH en este punto era 5,5. El medio se sometió a autoclave a 121 °C durante 15 min. Las placas de agar se prepararon por distribuidora de un medio fundido enfriado 20 - ml por placas de Petri.



Figura - 15 Elaboración de medios de cultivo a base de semillas para la prueba de *Trichoderma*

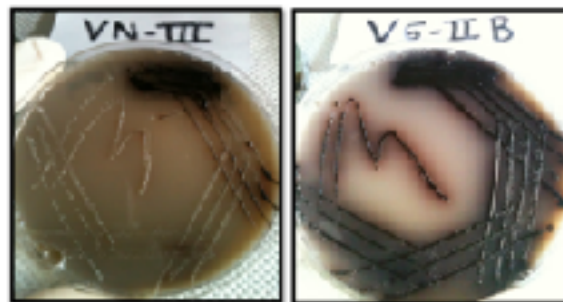


Figura - 16 Producción de inactivación en cepas de referencia de *C. gali* y *C. nectans*

6. 7. 3 Crecimiento a 37 °C y a 25 °C

Las cepas con características morfológicas de *Cryptococcus* ya purificadas se sembraron en agar Sabouraud y se incubaron por 7 días en incubadoras con la temperatura correspondiente.



Figura - 17 Cepa de *Cryptococcus* purificada

6. 7. 4 Prueba de asimilación de nitrato de potasio

Algunas especies de levaduras pueden utilizar nitrato como única fuente de nitrógeno para lo cual poseen una enzima nitrato reductasa que reduce el nitrato a nitrito, este último reacciona con el ácido sulfanílico y la N,N-dimetil-1-naftilamina para dar un compuesto color rojo.

Medio base: nitrato de potasio 5,0 g Fosfato monosódico 11,7 g Fosfato disódico 1,14 g Cloruro de benzalconio 1, 20 ml AD c.s.p. 200 ml. Reactivos reveladores de la reacción; Reactivo A : Ácido sulfanílico 1,6 g Ácido acético 5 M 200 ml. Reactivo B: N, N-dimetil-1 naftilamina 1.0 g, Ácido acético 5 M 200 ml (El ácido acético 5 M se preparó adicionando 1 parte de ácido y 25 partes de agua destilada.

Se preparó una suspensión densa en caldo de nitrato usando colonias de un cultivo fresco y puro en agar Sabouraud, se inoculó el medio de prueba de nitrato para darle una turbidez fuerte, se tapó el tubo, se incubaron los tubos inoculados y un tubo control del medio de cultivo sin inocular a 35 °C – 36,5 °C (sin añadir CO₂) durante 48 horas. Luego se añadieron 5 gotas del Reactivo A de Nitrato a cada tubo (incluido el control sin inocular). Se agitó suavemente cada tubo de adelante hacia atrás para mezclar el Reactivo A con el medio; se añadieron 5 gotas de Reactivo B de Nitrato a cada tubo (incluido el control sin inocular) y se agitó de nuevo suavemente cada tubo de adelante hacia atrás para mezclar el Reactivo B con el medio. Se revisó el control del medio sin inocular, el cual no presentó cambio de color. El control positivo del medio puede mostrar cambio de color de rosado a rojo o no, según si el nitrato fue reducido a nitrito o completamente reducido a nitrógeno gaseoso. Si apareció un color rosado rojo se tomó como positivo. Si el medio se mantuvo incoloro después de añadir los reactivos de Nitrato A y B, se añadió al medio una pequeña cantidad de polvo de zinc. Se agitó vigorosamente el tubo de adelante hacia atrás para mezclar bien el zinc, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10–15 minutos. Si el medio permaneció incoloro después de añadir el polvo de zinc, el resultado de la prue-

ba fue positivo (el nitrato ha sido reducido a nitrito y completamente reducido a nitrógeno gaseoso). Se registró el resultado para el aislamiento como “positivo a nitrato” y se puede presumir que la cepa en estudio no es *Cryptococcus*. Si el medio se tornó rosado-rojo después de añadir el polvo de zinc, el resultado se consideró negativo. Se utilizó un control negativo *C. neoformans* y un control positivo *C. albicans*.

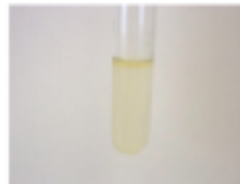


Figura - 18 Prueba de asimilación de nitrato

6.7.5 Inducción de cápsula

Las cepas purificadas se resembraron en agar Sabouraud y agar cerebro corazón con atmósfera de CO₂, se revisó la morfología colonial y celular, se realizó montaje de la colonia con tinta china y se observó al microscopio. Se midió el diámetro total de la célula, el tamaño de la cápsula y el tamaño de la célula. El tamaño capsular y celular se midió utilizando el programa procesador de imágenes de uso libre *ImageJ* 32. Las diferencias de tamaños de las células fueron analizadas mediante la prueba t de Student y la correlación entre el tamaño de la cápsula y el tamaño del cuerpo celular fue analizada mediante una correlación de Pearson y ANOVA, con el programa con el programa estadístico SPSS19.



6.7.6 Susceptibilidad a la cicloheximida

Las cepas con características celulares y coloniales de *Cryptococcus* se cultivaron en agar Mycosel y se incubaron a 25-28 °C.

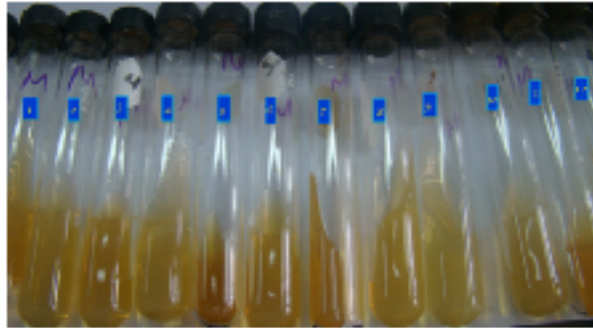


Figura - 20 Susceptibilidad a cicloheximida

6.7.7 Prueba de asimilación de azúcares

Se realizó la prueba de asimilación de azúcares, mediante el kit API 20C AUX (bio-Merieux, Francia), para la identificación bioquímica de la levadura.

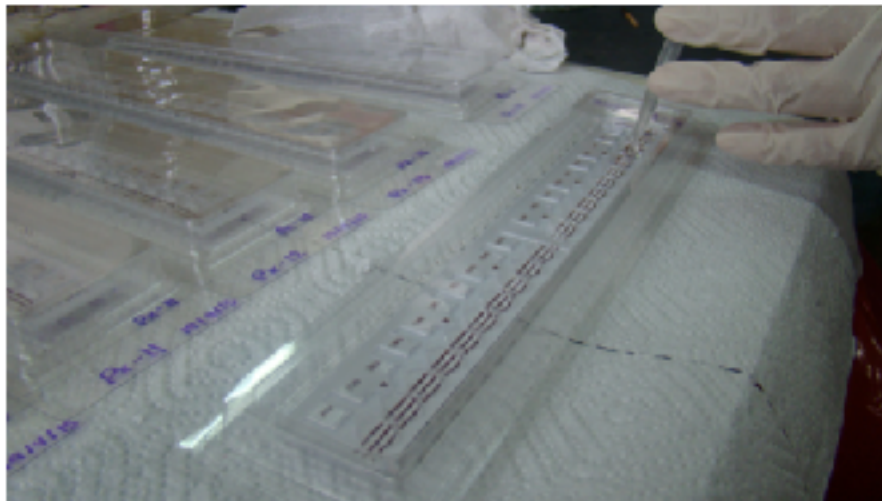


Figura - 21 Prueba de asimilación de azúcares con API 20C AUX

Objetivo 2

Caracterizar fenotípicamente las cepas de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* aisladas de muestras clínicas y de pacientes, utilizando pruebas bioquímicas.

6.8 Prueba bioquímica para la identificación fenotípica de especie.

Para diferenciar por métodos bioquímicos las especies *C. neoformans* y *C. gattii* se utilizó el Medio GCB (Medio de glicina-canavanina-azul de bromotimol)

Solución A : (Suplemento) glicina 10,0 g , KH_2PO_4 1,0 g , MgSO_4 1,0 g , tiamina.HCl 1 mg, L-canavanina (Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) 30 mg, agua destilada 100 ml. Se ajustó el pH a 5,6. Se esterilizó por filtración.

Solución B: azul de bromotimol sódico 0,2 g, agua destilada 50 ml. Base: se mezcló 440 ml de agua destilada, 10 ml de Solución B y 10 g de agar. Autoclavado 15 minutos a 1 atm.

- Para preparar el medio se mezcló una parte del Suplemento con 9 partes de la Base fundida y enfriada a 45 °C.

- A los medios se les realizó control de calidad incubando a 37 °C por 24 horas el color amarillo se tomó como negativo.

- Para observar el crecimiento de *C. gattii* se incubó entre 5 y 7 días en GCB a 25-27 °C si creció y viró el indicador de amarillo a azul se tomó como positivo para *C. gattii*.

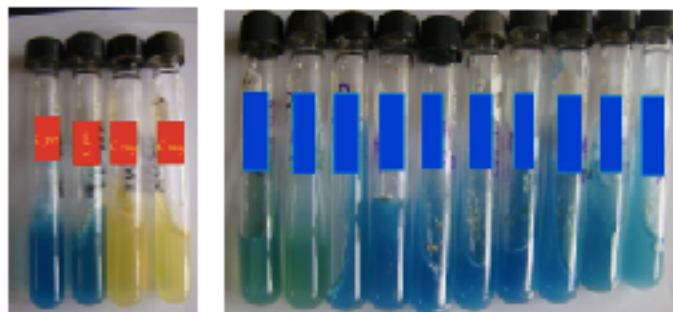
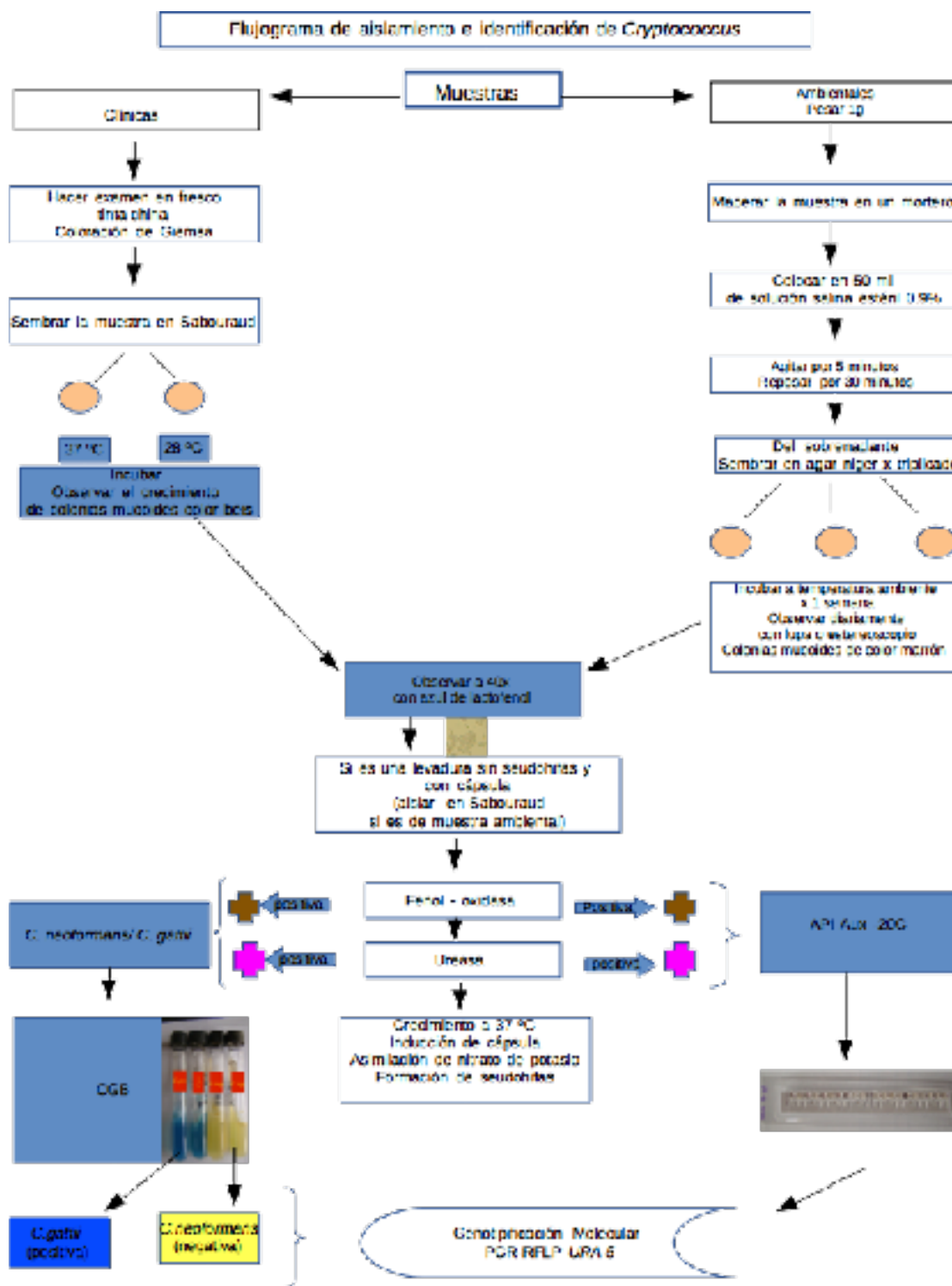


Figura - 22: Control de positivo y negativo de Prueba GCB, Prueba GCB a cepas de *Cryptococcus gattii* y *Cryptococcus neoformans*

Las cepas reaisladas fueron conservadas en viales tapón de rosca con agua destilada estéril a temperatura ambiente (127).



Elaborado por Lilia Acevala 2015

Figura- 23

Objetivo 3

Identificar los genotipos de las cepas de *Cryptococcus* aisladas en muestras clínicas y ambientales mediante la técnica molecular PCR-RFLP *URA5*.

6. 9 Extracción de ADN

Caracterización molecular de cepas de *Cryptococcus* spp : La extracción de ADN de las levaduras se realizó siguiendo este procedimiento: de una asada del cultivo previamente sembrado durante 48 horas en agar glucosado de Sabouraud o agar extracto de levadura, peptona, dextrosa (YEPD), se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, y se almacenó a -20 °C durante 30 minutos por lo menos, (o durante la noche). Se Adicionó 500 µl de buffer de lisis y 5 µl de 2-mercaptoetanol, se agitó vigorosamente en vórtex, se incubó a 65 °C durante 1 hora (se agitó en vórtex al menos 1 vez durante la incubación) . Luego se agregó 500 µl fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (v:v:v 25:24:1), y se mezcló en vórtex durante 2 minutos hasta obtener una suspensión homogénea. Después se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos. Se retiró la capa acuosa superior (sobrenadante), se transfirió a otro tubo de 1,5 ml y, se mezcló con un volumen igual de isopropanol. Se precipitó el sobrenadante a -20 °C durante 30 minutos por lo menos (la precipitación del ADN durante toda la noche a -20 °C mejoró el rendimiento de la extracción). Se centrifugó a 14000 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con una solución acuosa de etanol al 70%. Luego se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante, y el pellet se secó en horno de 37 °C. Después se resuspendió el ADN en 50 µl agua destilada estéril o buffer TE .

Se determinó la concentración del ADN en el NanoDrop 2000c (Laboratorio de Virología) y se diluyó según la concentración requerida para la PCR (10 ng /µl) (127).

6.10 Reacción en cadena polimerasa (PCR)

Para el desarrollo de esta técnica se utilizaron los siguientes iniciadores específicos que han sido diseñados para amplificar el ADN.

URA5 (5' ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC TCC G 3')

SJ101 (5' TTAAGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC 3')

Estos primers fueron corroborados usando el programa Primer blast en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> . Los *primers* fueron comprados a INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT) en Estados Unidos a través de su representante en Honduras. Los primers libres de sal se reconstituyeron de acuerdo a las indicaciones del fabricante para una concentración final de 100 μ M.

Los dNTPs utilizados se compraron en (PROMEGA) con sede en Estados Unidos.

Se estandarizó la concentración de $MgCl_2$ 25mM 10x la tabla siguiente muestra las cantidades utilizadas en el master mix. La

MgCl ₂ 25mM (10x) concentración problema	factor de dilución	vol MgCl ₂ 25mM (10x)/ μ l	master mix sin MgCl ₂ / μ l	agua/ μ l
0.3	83, 3	0, 24	13, 0	6, 76
1.0	25	0, 8	13, 0	6, 2
1.5	16, 6	1, 2	13, 0	5, 8
2.5	10	2, 0	13, 0	5, 0
3.0	8, 3	2, 4	13, 0	4, 6
volumen final				20, 0

Tabla - 8 Estandarización de la solución de $MgCl_2$.

mejor banda se observó a una concentración de 3mM. Se estandarizó la temperatura, se probó a 65 °C, 64 °C, 63 °C, 60,6 °C, 58,2 °C y 55 °C seleccionando la que presentó mejor banda esta fue a 64 °C.

	concentración	volumen para 1 muestra
Tampón 5x	1x	4 µl
dNTPs	2 mM	2 µl
Mgcl ₂ (10x)	3 mM	2 µl
primers URA5/SJ101	4 mM	4 µl
Taq DNA polymerasa	1U/µl	0.1 µl
ADN muestra	10 ng/µl	4 µl
Agua		4 µl
volumen final		20 µl

Tabla - 9 Reactivos para la realización de PCR para *Cryptococcus*

6.10 Cepas de referencia

Las cepas de referencia pertenecen a la Colección de Cultivos del Laboratorio de Micología del Hospital de enfermedades infecciosas "Dr. Francisco Javier Muñiz" de Buenos Aires, Argentina.

- (A) Control *C. neoformans* var. *grubii* tipo molecular VNI
- (B) Control *C. neoformans* var. *grubii* tipo tipo molecular VNII
- (C) Control *C. neoformans* híbrido AD patrón molecular VNIII
- (D) Control *C. neoformans* var. *neoformans* tipo molecular VNIV
- (E) Control *C. gattii* tipo molecular VGI
- (F) Control *C. gattii* tipo molecular VGII
- (G) Control *C. gattii* tipo molecular VGIII
- (H) Control *C. gattii* tipo molecular VGIV

6. 11 Técnica PCR-RFLP

Se empleó el RFLP del gen orotidina monofosfato pirofosforilasa (*URA5*) para diferenciar los 8 principales tipos moleculares de *C. neoformans* y *C. gattii*. Los productos de PCR amplificados del gen *URA5* fueron sometidos a una doble digestión enzimática con *HhaI* y *Sau96I*, y según los perfiles de RFLP las cepas se diferenciaron entre los ocho tipos moleculares principales de *C. neoformans* y *C. gattii*.

La amplificación por PCR se realiza usando el siguiente programa:

94 °C Denaturación inicial 3 min	}	35 ciclos
94 °C Denaturación 45 s		
64 °C Anillamiento 1 min		
72 °C Extensión 1 min		
72 °C Extensión final 7 min.		

Después de la amplificación por PCR, los productos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 1,4 % con 1X TBE para confirmar a cantidad y especificidad de la amplificación (el producto de PCR es de aproximadamente 779 pb)

Productos de PCR de la amplificación del gen *URA5*: Cepas de referencia y aislamientos clínico y ambientales, 10x buffer de restricción para *HhaI* (MTRB buffer) lote: 0061410 y *Sau96I* (NEB buffer) lote:0251410. Albumina Sérica Bovina BSA (10mg/ml).Enzimas de restricción *HhaI* (20.000U/ml) y *Sau96I* (5,000U/ml) New England Biolabs (128).

HhaI	Sitio de reconocimiento
aislada de Haemophilus haemolyticus (ATCC 10040)	5' G C G/C 3'
	3' C/G C G 5'
Sau96I	
(aislada de Staphylococcus aureus)	5`GG/NCC3`
	3`CCNG/G5`

Tabla - 10 Enzimas de restricción y sitios de reconocimiento

Reactivo	concentración	volumen en μl
CutSmart buffer	10x	3,0
HhaI	25,000 U/ml	0,3
Sau96I	5,000 U/ml	0,6
Albumina	10 mg/ml	0,3
	utilizar de la mezcla anterior 3,0 μl	3,0
Producto de PCR		17,0
volumen final		20,0

Tabla - 11 Reactivos para realizar la técnica PCR- RFLP URA - 5

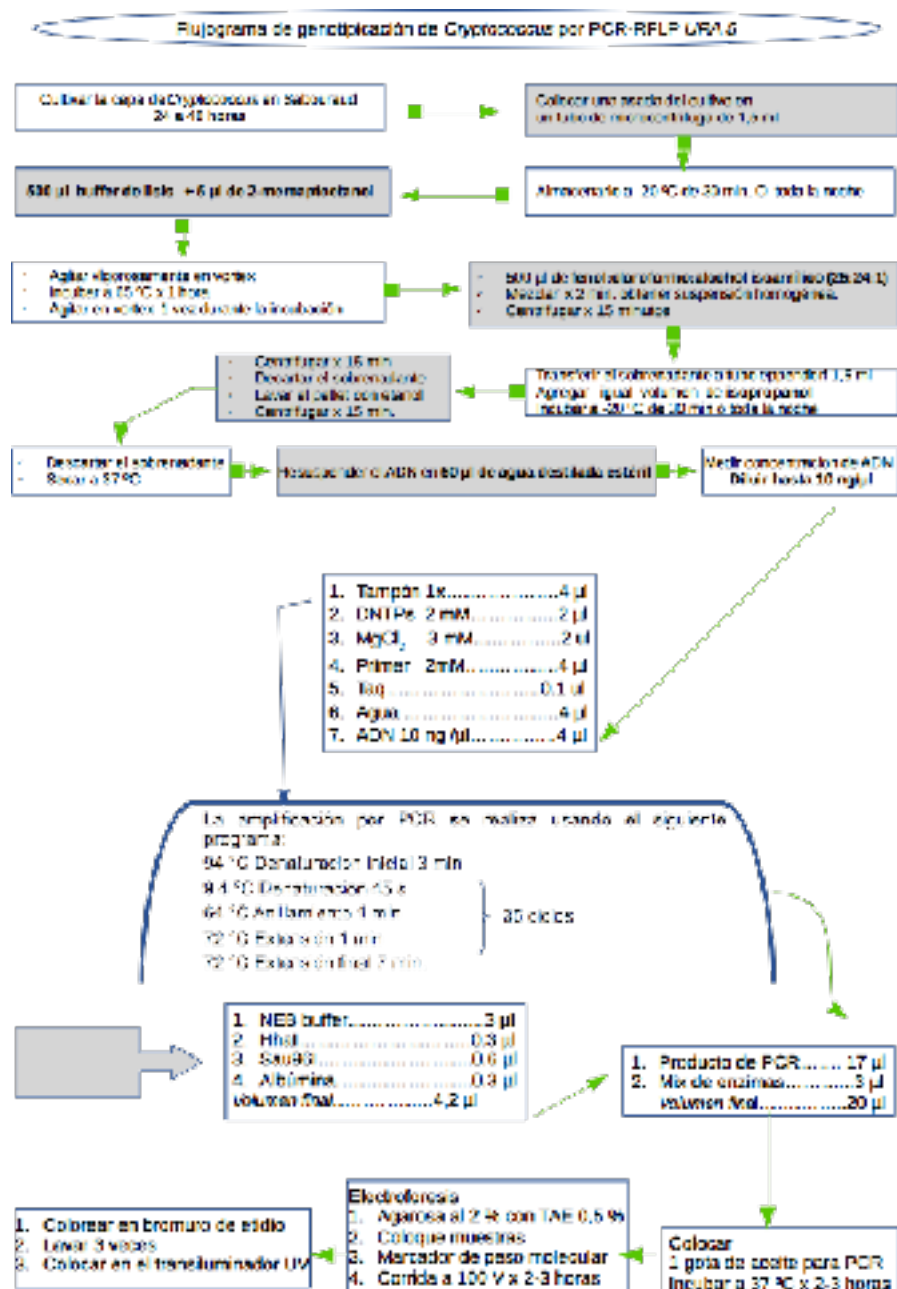


Figura- 24

Objetivo 5

Identificar los hongos ambientales que coexisten con cepas de *Cryptococcus*.

A partir de las muestras ambientales sembradas en Agar niger donde se obtuvo aislamientos de *Cryptococcus* se purificaron cepas de hongos filamentosos y levaduriformes en agar Sabouraud incubados a temperatura ambiente, en un periodo de 3 a 7 días. La identificación de los hongos se realizó en base a la morfología colonial analizando su anverso y el reverso, y su morfología celular. Las observaciones microscópicas se hicieron por disociación de las colonias mediante las técnicas de fragmento de la colonia y de la cinta adhesiva, haciendo los montajes en portaobjetos con azul de lactofenol. Los montajes fueron observados marca Olympus HX 21. Para la identificación morfológica se utilizaron las descripciones coloniales y celulares además, y claves utilizando diferentes libros de micología.

Objetivo 6

Analizar los datos demográficos y factores predisponentes en los pacientes con criptocosis.

Se elaboró un instrumento para recolectar los datos demográficos y los factores predisponentes en los pacientes en los cuales se aisló *Cryptococcus*, se obtuvo la aprobación del Comité de ética del INCP y la Autorización de la Directora del INCP para la revisión de los expedientes de los pacientes.

6.12. Análisis de resultados.

El análisis e interpretación de datos se realizó aplicando estadística descriptiva; frecuencia, medidas de tendencia central, medidas de variabilidad; rango desviación estándar y varianza utilizando el programa estadístico SPSS 20 (IBM) (129). Además se uso el programa de Microsoft Excel.

6.13 Este estudio fue aprobado por el comité de Etica del INCP.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo específico 1

Demostrar la presencia de la levadura de *Cryptococcus* en muestras clínicas y ambientales e identificarlas por métodos directos y pruebas bioquímicas.

Se recolectaron 300 muestras ambientales: 56 de excretas de aves y 244 muestras relacionadas con árboles: 58 de hojas, 35 de flores, 41 de corteza, 42 de detritus de oquedades, 26 de suelo, y 10 del ambiente. De las que se obtuvieron 29 aislamientos. Además se estudiaron 13 aislamientos de origen clínico.

zona	Frecuencia	Porcentaje
zona 1	8	19,0
zona 2	20	47,6
zona 3	1	2,4
sala	13	31,0
Total	42	100,0

Tabla - 12 Cepas de *Cryptococcus* aisladas por zonas en el INCP, Tegucigalpa, Honduras. 2014-2015

La zona de estudio de muestras ambientales se dividió en tres; Z1(zona 1) , Z2 (zona 2) , Z3 (zona 3). En la zona 1 se obtuvieron 8 (19%) aislamientos, en la zona 2 se observaron 20 (47,6%) aislamientos, y en la zona 3, 1 (2,4%) aislamiento de *Cryptococcus*. En la zona 1 y zona 2 se aisló el mayor número de cepas de *Cryptococcus*, probablemente porque aquí se concentra el mayor número de árboles, con predominio de *Eucalyptus camaldulensis* y, además con nidos de aves (*Columba livia*). El género *Cryptococcus* tiene como hábitat natural árboles, suelo, detritus, excretas de aves (15). El INCP es un hospital construido en 1948, de paredes de piedra, artesón de madera con cielorraso espacio que aprovechan las aves para hacer sus nidos y formar acumulación de excretas de más de 12,5 cm de espesor, estos nichos se encuentran en los techos de las salas de los

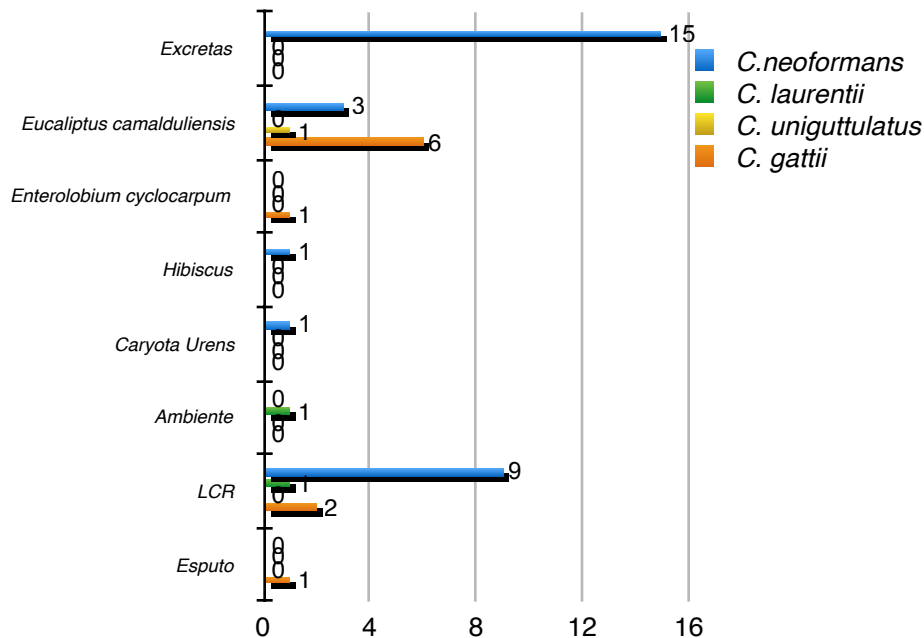


Figura - 25 Cepas de *Cryptococcus* aisladas en muestras ambientales y clínicas, Tegucigalpa, Honduras. 2014-2015

pacientes hospitalizados por tuberculosis y con VIH-SIDA, Es una fuente importante de contaminación, la arquitectura de estos techos brinda escasa iluminación, favoreciendo la multiplicación de la levadura, que además aprovecha los sustratos que le dan las excretas (130).

En la Z₃ solo se aisló una cepa, debido a la escasez de árboles y a la baja concentración de excretas que no favorecen la multiplicación de la levadura. En esta zona se recolectaron heces frescas sin éxito en el aislamiento de colonias características de *Cryptococcus*. Las altas concentraciones de amonio presente en las excretas frescas inhiben la multiplicación de la levadura, a diferencia de las heces secas y protegidas de los rayos ultravioletas del sol, donde se pueden detectar altas concentraciones de *Cryptococcus*, donde es capaz de sobrevivir más de un año si se renueva la fuente de nitrógeno (131). Las levaduras que en estas condiciones miden hasta 2 micrómetros son acapsuladas o con cápsulas muy pequeñas, lo que facilita su instalación en el pulmón del huésped (132).

Las colonias aisladas fueron purificadas mediante resiembra en Sabouraud, se identificaron por métodos directos y bioquímicos. Se analizaron un total de 42 (100%) cepas que

presentaban las características coloniales y bioquímicas del complejo *C. neoformans*/*C. gattii*. En todos los casos las pruebas de fenoloxidasa, ureasa y presencia de cápsula fueron positivas. Aunque *Trichosporon cutaneum* y otras especies de *Cryptococcus* diferentes del complejo *C. neoformans* pueden producir pigmentación, esto hace necesario la confirmación por otros métodos para reducir los errores en la identificación (3).

Las 42 cepas de *Cryptococcus* aisladas en muestras ambientales y clínicas se identificaron mediante API 20C AUX (125) de las cuales: 34 (81.0%) fueron identificadas como *C. neoformans*, 7 (16,6%) *C. laurentii* y 1 (2.38%) *C. uniguttulatus*.

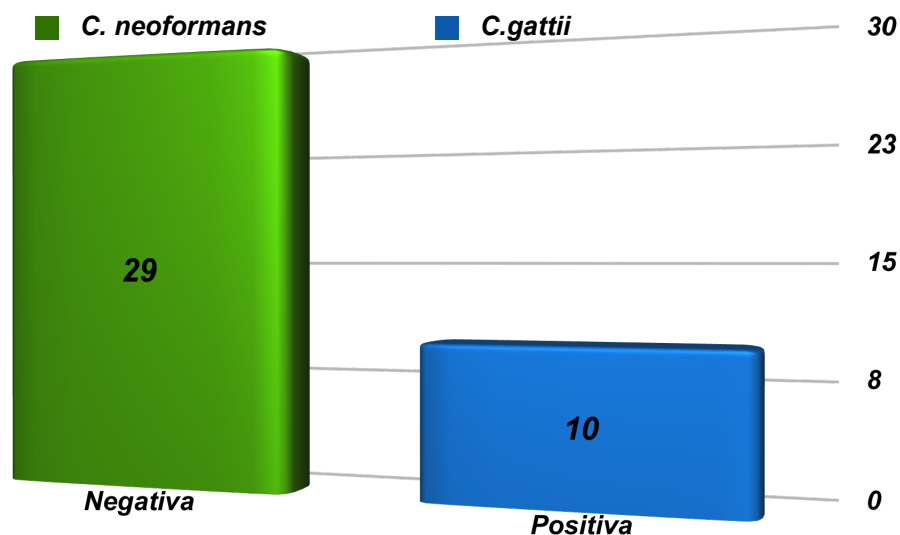


Figura - 26 Especies de *Cryptococcus* identificadas con agar CGB

Al realizarle la prueba de CGB para diferenciar las especies resultaron 29 (69,0 %) para *C. neoformans* y 10 (23,8 %) para *C. gattii*. Cabe resaltar que de estas 10 cepas de *C. gattii*, 5 fueron identificadas como *C. neoformans* y 5 como *C. laurentii* por API 20C AUX. De los tres aislamientos restantes: 2 (4,76%) eran *C. laurentii*: 1(2,4%) se encontró en ambiente, 1 (2,4%) en esputo y 1 (2,38%) *C. uniguttulatus*, en hojas de *Eucalyptus camaldulensis*.

OBJETIVO 3

Genotipos	Cepas ambientales	cepas clinicas	total
VNI	12	7	19
VNII	8	2	10
VGI	6	1	7
VGII	1	2	3
total	27	12	39

Tabla- 13 Genotipos de *C. neoformans/ C. gattii* por RFLP *URA-5* en muestras clinicas ambientales y clinicas aisladas en el INCP.

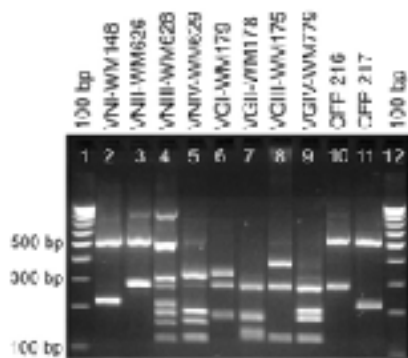


Figura - 35 Banding patterns generated by (RFLP) restriction fragment length polymorphism. Lanes 2-6; standard strains of the major molecular types; 7-11; the five strains isolated from anti (Pathogenic Fungi Collection (CFF) 216 [*Cryptococcus neoformans* (VNI)] and CFF 217 (VNI)-VG: *Cryptococcus gattii*; WM: Winand Meyer Culture Collection).

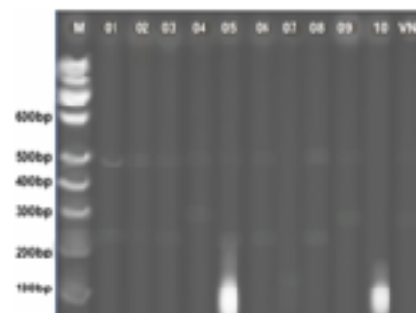


Figura-36 RFLP del gen *URA-5* de los 10/29 aislamientos ambientales aislados en el INCP de *C. neoformans* Línea 1: marcador de peso de 100 bp líneas 1, 2, 3, 5, 5 y 6, patrones moleculares VNI; líneas 4, 9 patrón molecular VNII y línea 11 cepa control VIII; Los productos de restricción fueron corridos en un gel a 2.5% de agarosa a 90 voltos/ 1 hora.

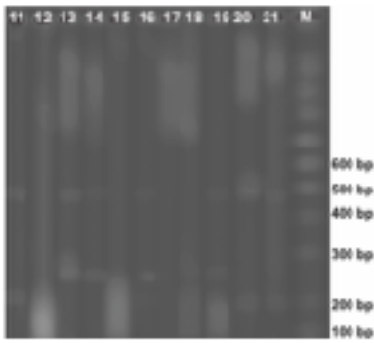


Figura-37 RFLP del gen *URA-5* de los 1129 cepas ambientales de *C. neoformans* aislados en el INCIP. Línea M: marcador de peso de 100 bp; líneas 11, 20 y 21: patrones moleculares VNII; líneas 13, 14, 16 y 19: patrones moleculares VNI. Los productos de restricción fueron coridos en un gel al 2,5% de agarosa, a 90 voltios/3 horas.

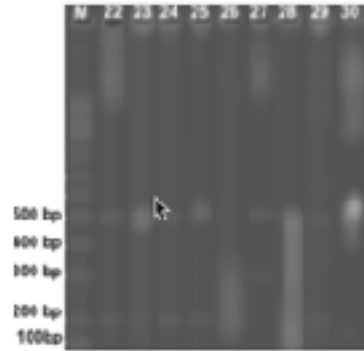


Figura-38 RFLP del gen *URA-5* de los 909 aislamientos clínicos en pacientes del INCIP de *C. neoformans*. Línea M: marcador de peso de 100 bp; líneas 22, 23, 24, 25, y 29: patrones moleculares VNI; línea 26: patrón molecular VNII. Los productos de restricción fueron coridos en un gel al 2,5% de agarosa, a 90 voltios/3 horas.

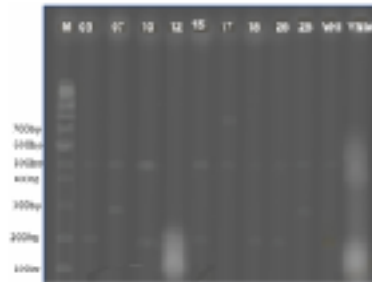


Figura-39 RFLP del gen *URA-5* aislamientos ambientales y clínicos en pacientes del INCIP de *C. neoformans*. Línea M: marcador de peso de 100 bp; líneas 5, 16, 15 y 18: aislamientos ambientales; línea 25: aislamiento clínico; patrones moleculares VNI; líneas 7: aislamiento ambiental; 26: aislamiento clínico; patrón molecular VNII y línea 11: cepa control VNII. Los productos de restricción fueron coridos en un gel al 2,5% de agarosa, a 90 voltios/3 horas.

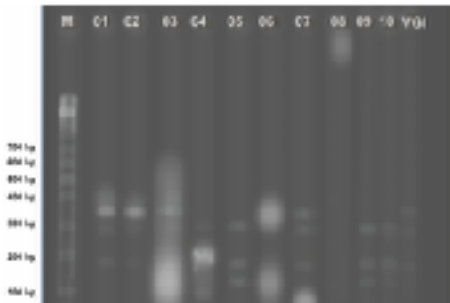


Figura-40 RFLP del gen *URA-5* cepas ambientales y clínicas de *C. gattii* aisladas en el INCIP. Línea M: marcador de peso de 100 bp; líneas 01, 02 y 07: aislamientos ambientales); patrones moleculares VGI; líneas: 05 (aislamiento ambiental), 09 y 10 (aislamiento clínico): patrón molecular VGI y línea 11: cepa control VGI. Los productos de restricción fueron coridos en un gel al 2,5% de agarosa, a 90 voltios/3 horas.

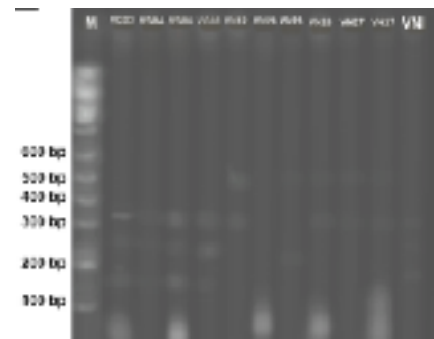


Figura-41 RFLP del gen *URA-5* cepas ambientales y clínicas de *C. gattii* *C. neoformans* aisladas en el INCIP. Línea M: marcador de peso de 100 bp; líneas VGG0, VGG4, VGG5, VGG8, VGG9, VGG12, VGG13, VGG14, VGG15, VGG16: cepas ambientales; VGG17: cepa clínic; patrones moleculares de VGI. VGG18: cepa ambiental; patrón molecular VNI; VGG9 (paciente con recuento) presenta: patrón molecular VNI y VNI en dos muestras diferentes; VGG20 (paciente con recuento) patrón molecular VNI en dos muestras diferentes y línea 12: cepa control VNI. Los productos de restricción fueron coridos en un gel al 2,5% de agarosa, a 90 voltios/3 horas.

De los 29 (69,04%) aislamientos de *C. neoformans* (19 VNI y 10 VNII): 15 aislamientos (12 VNI y 3 VNII) (51,7%), se obtuvieron en excretas de aves, 5 (17,24%) (5 VNII), en el ambiente y 9 (31,03%) (7 VNI y 2 VNII) en muestras de LCR.

Se analizaron 10 aislamientos de *C. gattii*: 3 de origen clínico y 7 ambientales, de los 10 (23,81%) 7 fueron VGI y 3 VGI : 7 (70%) (6 VGI y 1 VGI), en muestras ambientales: 6 aislamientos (42,85%) en *Eucalyptus camandulenses* y 1 (7,14%) en hojas de *Enterolobium cyclocarpum*, y 3 (30 %) (1 VGI y 2 VGI) de origen clínico: 2 (20%) (2 VGI) en LCR y 1 (10%) (VGI) en esputo.

1(7,14%) de *C. laurentii* se encontró en ambiente, 1(7,14%) en LCR, y 1 (7,14%) de *C. uniguttulatus* en hojas de *Eucalyptus camalduliensis* (13).

Estos resultados demuestran que, las excretas es el mejor nicho para el crecimiento de *C. neoformans*. La capacidad de *C. neoformans* para colonizar los excrementos de paloma se ha atribuido a la capacidad de esta especie para utilizar creatinina como fuente de nitrógeno (51). La creatinina, sin embargo, también es utilizada por *C. gattii* que, en contraste, es incapaz de sobrevivir en excretas de aves. Esto resulta del hecho de que en *C. neoformans* la síntesis de creatinina desaminasa, escinde la creatinina en amoníaco y metilhidantoína, este proceso es reprimido por el amoníaco presente en las heces, mientras que en *C. gattii* la enzima no es reprimida y la fuerte alcalinización inhibe su crecimiento (52).

Las concentraciones de esta levadura en el excremento de paloma a menudo exceden 10^6 organismos viables por gramo, su alta concentración en este substrato puede estar también relacionada con su habilidad para asimilar no sólo la creatinina, sino también xantina, la urea y ácido úrico, compuestos abundantes en los excrementos de las aves (130). Aunque *Cryptococcus* crece muy bien en nidos de aves que tienen como característica baja intensidad de luz y aire, no significa que sean vulnerables a las radiaciones solares. Diferentes estudios mencionan que la capacidad de la levadura de producir melanina la hace resistente a los rayos solares y a las altas temperaturas (133).

Kwon-Chung y otros autores han demostrado que las excretas no son el hábitat natural de *Cryptococcus*, estas levaduras viven en la vegetación y caen en las excretas para multiplicarse. Se ha demostrado que el árbol *Eucalyptus* no es el hábitat primario para *C. gattii* (134). Recientemente, se ha incrementado el número de reportes de aislamientos de esta especie a partir de una variedad de especies de árboles en diferentes partes del mundo, incluyendo Argentina (17), Colombia (18), Brasil (19), India (19), Sudáfrica(17) y Tailandia (20). Además, el aislamiento de esta especie se ha reportado a partir de otras fuentes como cuevas de murciélagos, frutas e insectos (21).

Aunque la frecuencia de *C. laurentii* es baja tiene alguna importancia como patógeno en humanos que presentan algún factor predisponente o de inmunodeficiencia. *C. laurentii* se estima que puede sobrevivir hasta dos años cuando se encuentra en la sombra (27). Desde 1995 hasta la fecha, se han reportado aproximadamente 12 casos por *C. laurentii*, en pacientes con: Leucemia mieloide aguda, trasplante, nacimiento prematuro, uso de catéter, Linfoma no Hodgkin y tumor sólido (135). Existen publicaciones de casos de fungemia y otras manifestaciones en huéspedes inmunocomprometidos (136). *C. uniguttulatus* recientemente se ha reportado causando meningitis (137). Aunque no se aisló *Cryptococcus* en materia orgánica en descomposición en el suelo o en las oquedades de árboles, se sabe que proporciona el substrato favorable para la propagación de *Cryptococcus*.

En *C. neoformans* / *C. gattii* la relación es variable para cada continente con un 68:1 en Europa, 33:1 en África, 7,6:1 en Asia, 4,5:1 en Centro y Sur América, 3,5:1 (138). Aunque el medio de CGB es útil, económico, práctico y de fácil interpretación para una identificación presuntiva, los resultados falsos positivos como falsos negativos se pueden presentar, para la identificación definitiva se debe utilizar un método molecular (139).

De los aislamientos de *C. laurentii* 2 presentaron una reacción débil en el medio agar CGB. Se puede decir que según los trabajos de Klein y Tay algunos aislamientos de *C. laurentii* pueden virar el medio de CGB pero que esto no es un problema en la identificación de especies del complejo *C. neoformans/C. gattii* ya que estas son las 2 únicas especies que producen fenoloxidasas (140).

El medio, que se describe como canavanina -glicina-azul de bromotimol agar (Agar CGB), diferencia *C. gattii* de otros *Cryptococcus* spp. Sobre la base de la resistencia inherente de *C. gattii* a L-canavanina. *C. gattii* éste puede crecer en presencia de L-canavanina y utilizar glicina como única fuente de carbono, iniciando así una reacción de color azul de bromotimol en el medio (141). Sin embargo, los aislamientos a partir de fuentes ambientales muestran una menor especificidad. En nuestros resultados se observó que el 7,1% de las cepas dio un resultado débil para CGB, algunos estudios han demostrado que un

reducido porcentaje de *C. neoformans* puede presentarlo (35). La criptococosis por *C. gattii* se observa en sólo un 20% de los enfermos a nivel mundial con mayor frecuencia en pacientes inmunocompetentes que *C. neoformans* (43).

La importancia práctica que tiene para el médico y el paciente un diagnóstico hasta nivel de especie, es que las dos especies pueden mostrar diferencias en resistencia o sensibilidad a algunos antifúngicos (142). Perfect (2014) concluye que para fines prácticos, los laboratorios de rutina identifican con métodos bioquímicos las dos especies de importancia médica *C. neoformans* y *C. gattii* (92).

Se aislaron 29 cepas de *C. neoformans* y 10 cepas *C. gattii*, que se genotipificaron por la técnica molecular de PCR-RFLP del gen *URA5*. De las 29 cepas de *C. neoformans*, 19 (65, 52%) presentaron patrón molecular VNI, de las cuales 12 (63,16%) eran de origen ambiental y 7 (36,84%) cepas clínicas. Las 10 (34,48%) cepas restantes de *C. neoformans* presentaron patrón molecular VNII, de éstas 8 (80,0%) eran de origen ambiental y 2 (20%) clínicas.

En este estudio la relación de *C. neoformans*/ *C. gattii* fue de 2,9:1, en Centro y Sur América, se ha reportado una relación de 3,5:1, nuestros datos mantienen la misma tendencia de que la especie predominante es *C. neoformans*. En América del Norte y en Oceanía la relación es de 1:1,5, donde *C. gattii* es la especie predominante. El genotipo predominante fue VNI coincidiendo con Colombia donde predomina el patrón VNI (38).

En relación a *C. gattii*, 7 (70%) de los 10 aislamientos presentaron patrón molecular VGI (6 cepas de origen ambiental y 1 cepa de origen clínico), y las 3 (30%) restantes fueron VGII (1 cepa de origen ambiental y 2 cepas de origen clínico). Este último patrón (*C. gattii* AFLP6 / VGII) ha sido reportada en el medio ambiente del Caribe holandés y Puerto Rico (143), lo que sugiere que *C. gattii* puede estar presente en otras localidades del Caribe. Además, poco se sabe sobre la epidemiología de *C. gattii* en América Central y el Caribe (125). Se encontraron diferencias en el patrón predominante de *C. gattii*, en nuestros resultados fue VGI, mientras que en otros estudios los aislamientos son agrupados

en su mayoría en el patrón VGII (38). *C. gattii* (serotipos B y C) habitualmente se encuentra en zonas tropicales y subtropicales (49). En 1999 se produjo un brote de criptococosis por *C. gattii* en Canadá, que plantea la posibilidad de que esta especie podría localizarse también en regiones de clima templado (144).

OBJETIVO 4

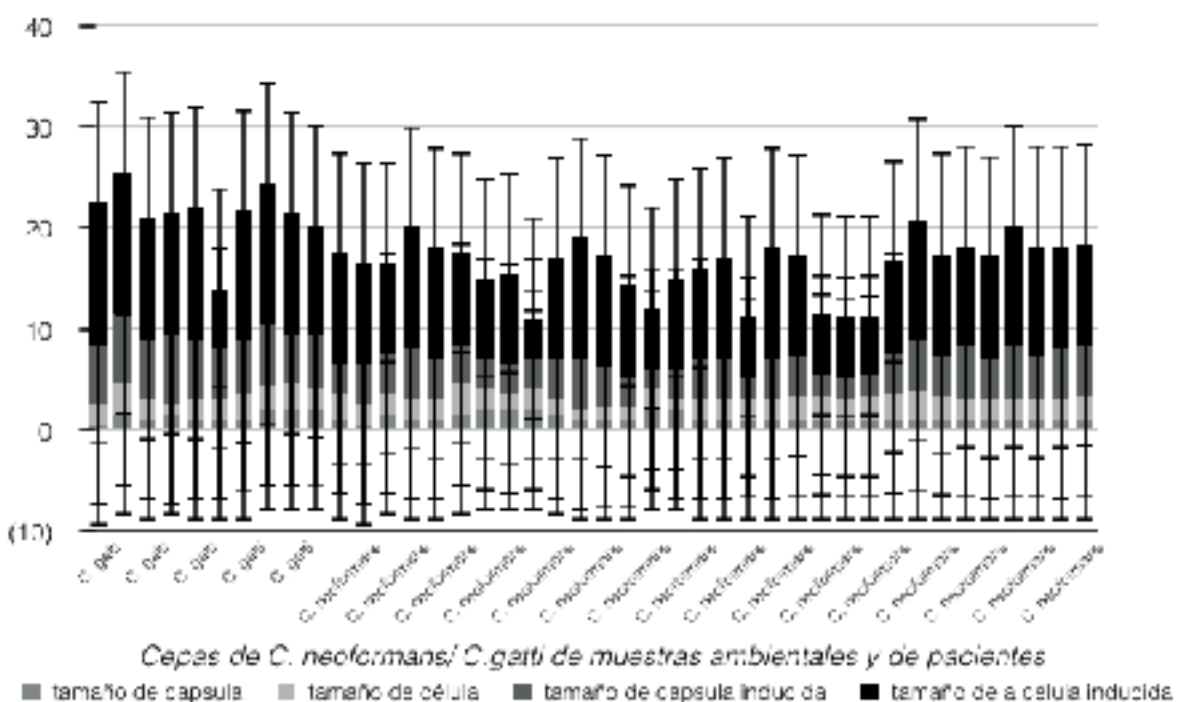


Figura - 27 Tamaño de cápsula y células en forma natural e inducida de *C. neoformans*/*C. gattii*

La cápsula es el principal factor de virulencia y de supervivencia de *Cryptococcus*. Se evaluó la capacidad de formación de cápsula en las cepas de origen clínico y ambientales. El tamaño inicial de la cápsula fue entre 0,5 a 2 micras y el tamaño de las células de 1 a 3 micras. Después de la inducción, el tamaño de la cápsula fue entre 2 a 6 micras y el de la célula entre 6 y 14 micras, este último dato, lo presentó una cepa de *C. gattii* (VG I) de origen ambiental. *C. neoformans* (VNI y VN II), fueron capaces de desarrollar una cápsula entre 6 a 12 micras ($F= 2,899$, $\text{sig} = 0,049$).

En las muestras ambientales se observó antes de la inducción un tamaño de la cápsula inferior a 2 micras; este tamaño facilita a la inhalación de la espora y levaduras de *Cryptococcus*. Aunque la fagocitosis se favorece por el pequeño tamaño de estos propágulos, la cápsula aumenta significativamente de tamaño en pocas horas (alcanza 5-10 μm) y evita la fagocitosis del microorganismo y lo protege de péptidos antimicrobianos y enzimas líticas incluyendo radicales libres (145), por lo que las esporas de las cepas ambientales analizadas en este estudio pueden ser altamente patógenas, si se tiene en cuenta sus crecimientos capsulares y celulares cuando fueron sometidas a una atmósfera reducida de CO_2 y a temperatura de 37 °C (146). Se ha demostrado que existe relación entre el crecimiento de la cápsula y el crecimiento de la célula, por lo que se puede suponer que estos dos procesos ocurren en forma simultánea durante el ciclo celular (147). Aunque se observó un crecimiento capsular y celular mayor en las muestras de origen clínico, las cepas ambientales mostraron un aumento considerable cuando fueron incubadas a temperaturas de 28 y 37 °C. La diferencia de tamaño de cápsula fue escasamente superior en cepas de *C. gattii*, coincidiendo con los resultados de otros estudios (148).

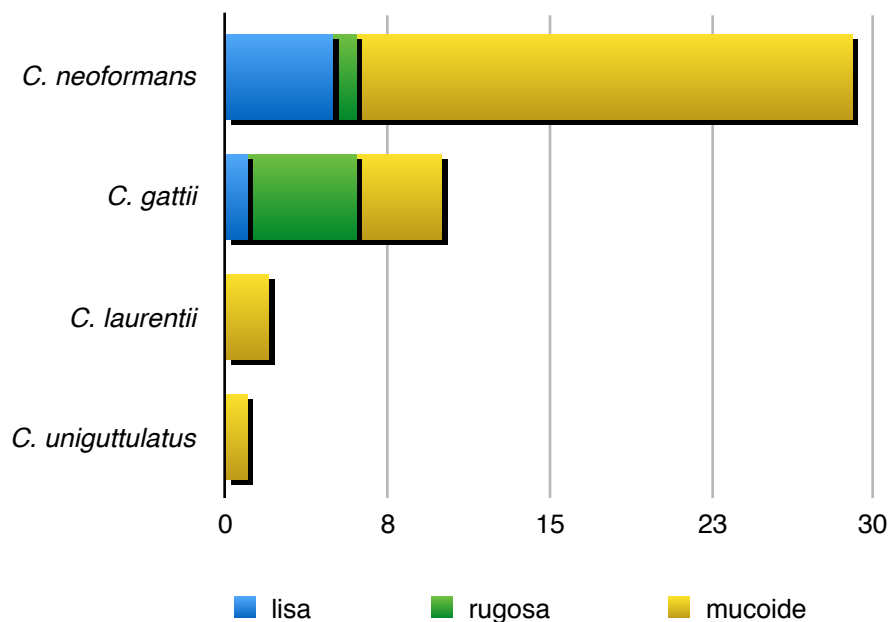


Figura - 28 Morfología colonial de cepas de *Cryptococcus*

De las 42 aislamientos sembrados en Sabouraud para estudiar su morfología colonial se encontraron 6 (14,3%) lisas, 6 (14,3%) rugosas y 30 (71,4%) mucoides, esto último está relacionado con cepas altamente patógenas (146).

Se observó que de los aislamientos mucoides: 23 (54,7 %) pertenecen a *C. neoformans* (18 VNI y 5 VNII) 7 VNI de origen clínico y 11 ambientales, de los 5 aislamientos VNII, fueron 2 clínicos y 3 ambientales: 4 (13,3%) aislamientos de *C. gattii* (4 VGI), 2 (6,6%) de *C. laurentii* y 1 (3,33%) *C. uniguttulatus*. De las 6 (14,3%) colonias rugosas, 5 (83,3%) eran de *C. gattii* (3 VGII y 2 VGI) y 1 (16,6%) de *C. neoformans* (VNI). De las 6 colonias lisas 5 (83,3%) eran aislamientos de *C. neoformans* (5 VNII) y 1 (16,6%) *C. gattii* (1 VGI) (F = 9,931, sig <0,0001). El aspecto mucoide de las colonias es de acuerdo con el tamaño de la cápsula de las células, además la rugosidad en la morfología colonial también es indicador de capacidad patogénica (29).

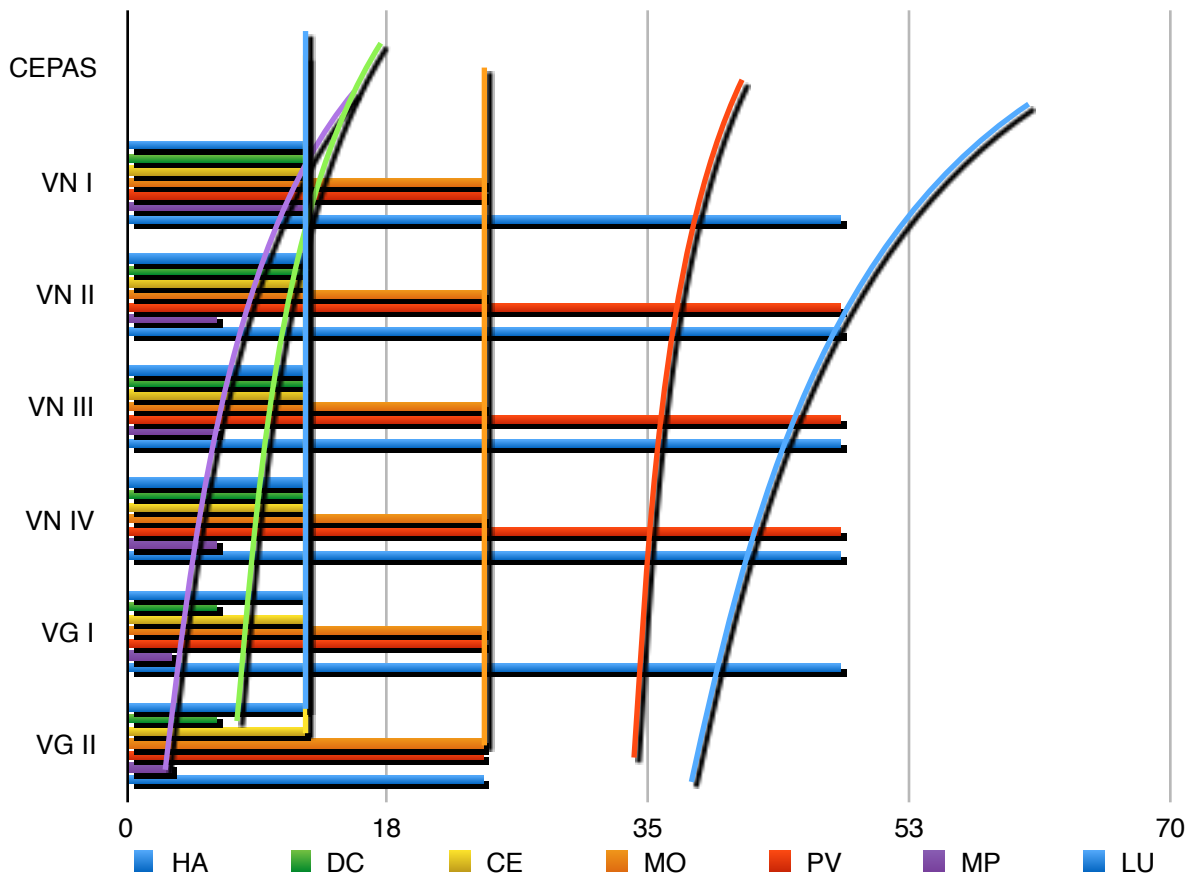


Figura - 29 Evaluación del tiempo de producción de fenoloxidasa de cepas de referencia de *Cryptococcus* en diferentes medios de cultivo naturales

Se evaluó la producción de fenoloxidasa en diferentes medios de cultivo, utilizando varias semillas con propiedades bioquímicas similares a *Helianthus annuus* (HA), agar semilla girasol. Se utilizó: *Dioclea megacarpa* (DM), *Canavalia ensiformis* (CE), *Moringa oleífera* (MO), *Phaseolus vulgaris* (PV), *Mucuna pruriens* (MP) y *Linun usitatissimum* (LU). Se estandarizaron con cepas de referencia de *Cryptococcus*, y se usó como control negativo una cepa de *Candida albicans*. El 50% de las cepas antes mencionadas, presentaron pigmento café de 3-6 horas en el medio MP, el 100% de las cepas presentaron pigmento café a las 48 horas de evidenciarse la colonia en todos los medios de cultivo (P = 0,010).

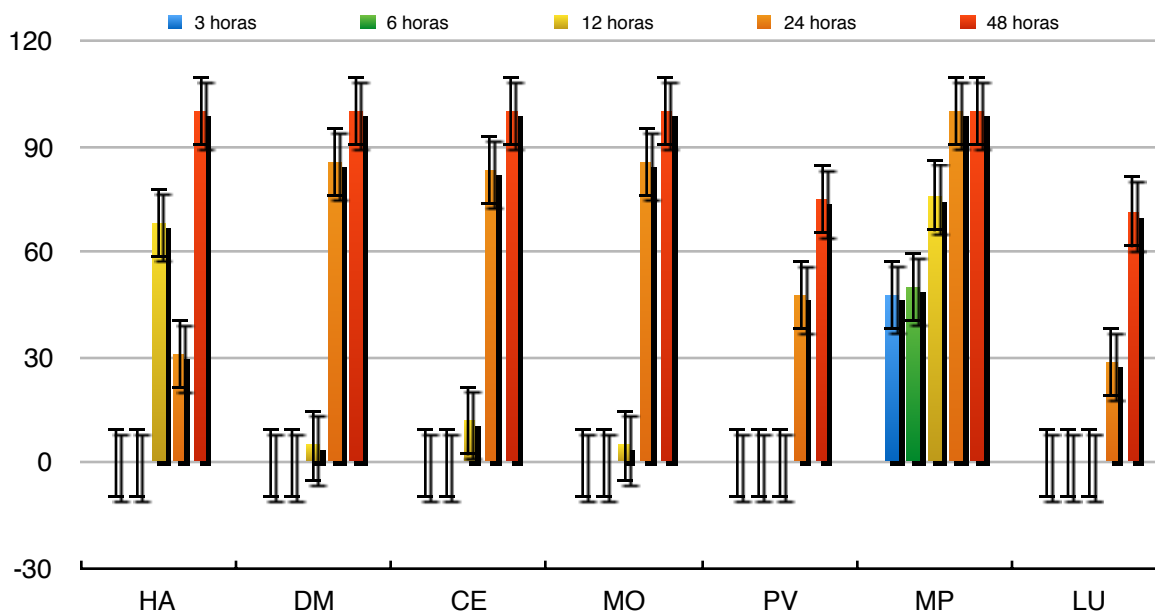


Figura - 30 Tiempo de producción de fenoloxidasa en medios de cultivo naturales por cepas de *Cryptococcus* ambientales y clínicas

En cuanto a las cepas de *C. neoformans* y *C. gattii*, clínicas y ambientales: en el medio de cultivo MP: 29 (69%) de las cepas presentaron pigmento a las seis horas, entre estas están: 15 VNI, (10 de origen ambiental y 5 clínicos), 6 VNII (4 ambientales y 2 clínicos), 5 VGI (4 ambientales y 1 clínico) 3 VGII (1 ambiental y de origen 1 clínico). 10 (24%) a las doce horas: 4 VNI (2 ambientales y 2 clínicos), 4 VNII (ambientales) y 2 VGI (ambientales) y el 100% a las 24 horas después de evidenciada la colonia. En los medios de cultivo MD, CE y MO presentaron pigmento a las 24 horas: 36 (85,7%), 35

(83,3%) y 36 (85,7%) respectivamente. Las 3 (7%) cepas: 1 *C. uniguttulatus* y 2 *C. laurentii* presentaron a una coloración tenue a las 72 horas.

Aunque todos los medios de cultivo mostraron producción de pigmento, fue el medio (MP) *Mucuna pruriens* el que presentó cambio de color a partir de las tres horas de haberse evidenciado la colonia, además fue el más intenso. Esta semilla tiene una gran cantidad de levodopa (149). El medio de (HA), conocido como agar semilla girasol es el más utilizado en la identificación de cepas de *Cryptococcus*, sobre todo de muestras muy contaminadas de origen ambiental, o humanas, diferentes estudios han demostrado que se pueden utilizar otros medios de cultivos a partir de semillas (150-152). Recientemente se ha propuesto el agar berenjena (153).

Además se observó que 19 cepas de las 27 de origen ambiental, fueron capaces de producir fenoloxidasa a las tres horas de evidenciada la colonia, lo que las hace altamente patógena.

En cuanto a las especies diferentes a *C. neoformans/C. gattii*, estas pueden presentar un tipo de coloración en medios selectivos pero no son productoras de fenoloxidasa (154).

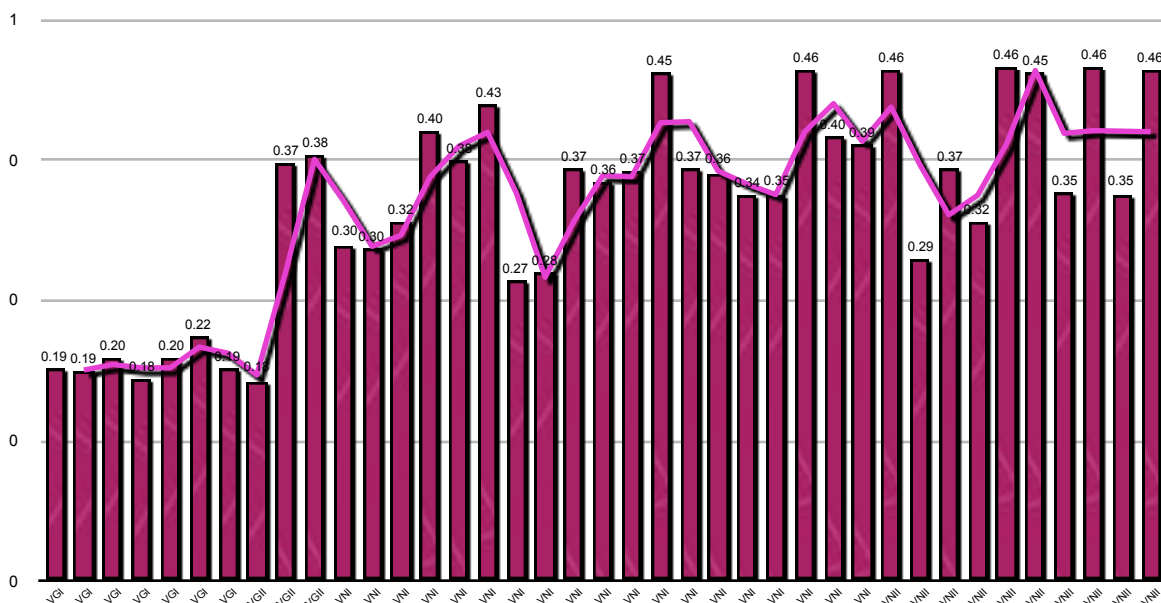


Figura - 31 Actividad de la ureasa en cepas de *C. neoformans/ C. gattii*

Se utilizaron cepas de referencia de *Cryptococcus* en la producción de la ureasa, los valores de las absorbancias fueron de 0,297 a 0,462.

La valoración de la producción de ureasa en cepas de *Cryptococcus* de origen ambiental y clínico fue entre 0,179 y 0,458 de absorbancia. Las cepas de *C. gattii*, (VGI) de origen ambiental presentaron los niveles de absorbancia mas bajos, entre 0,179 y 0,218. Las cepas que presentaron las absorbancias mas elevadas, 0,389 y 0,458 fue *C. neoformans* (VNI) 7 cepas de origen ambiental y 4 de origen clínico. Dos cepas de *C. gattii* VGII de origen ambiental presentaron valores elevados, 0,373 y 0,376 de absorbancia ($F=17,027$, sig.<0,005). *C. gattii* aunque presente valores más bajos con respecto a *C. neoformans* u otras especies la producción de ureasa siempre juega un papel importante en su virulencia (155).

Se ha demostrado en múltiples estudios sobre la capacidad de *Cryptococcus* para sintetizar ureasa, que es siendo considerado como un factor de virulencia. La prueba de la ureasa se realizó utilizando agar urea de Christensen y la prueba del micrométodo (80). En este estudio se observó un cambio de color evidente a las dos horas de su incubación y se estabilizó a las 48 horas. Decidimos medir la producción de ureasa en base a las absorbancias que presentaron los aislamientos a este tiempo de incubación en la prueba del micrométodo, valorando también el pH, el cual en la mayoría de las cepas fue entre 8-8,5. La ureasa parece tener un papel fundamental en la promoción del desplazamiento de estos hongos a través de las barreras epiteliales y la invasión cerebral (69). Polariza la respuesta del sistema inmune a una respuesta Th2, evitando la eliminación de la infección (70). Aunque la ureasa es un factor importante para la invasión cerebral, el sistema de activación enzimática no ha sido estudiado (56). Con respecto al origen de la muestra, las muestras ambientales pueden presentar la misma capacidad de producción de ureasa que las muestras clínicas (155).

OBJETIVO # 5

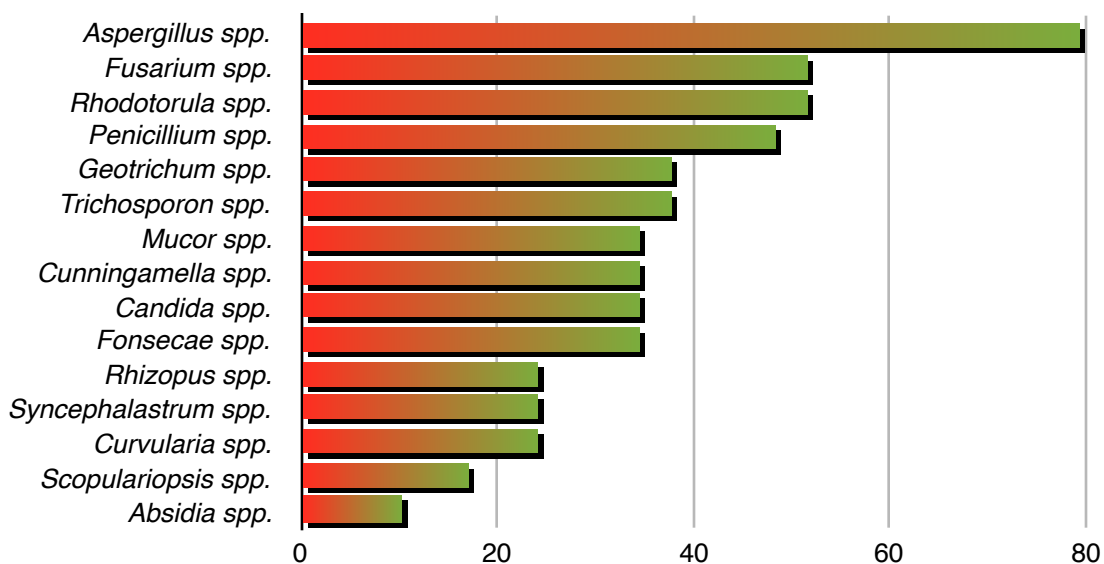


Figura - 32 Hongos contaminantes del ambiente asociados a cepas ambientales de *Cryptococcus*

Se identificaron los hongos filamentosos y levaduriformes asociados a los 29 cultivos donde se aisló *Cryptococcus*.

C. neoformans y *C. gattii* se encuentran en el medio ambiente generando interacciones con otros microorganismos y huéspedes. Las principales enfermedades fúngicas invasoras son, la candidiasis, la aspergilosis y la criptococosis.

El género más frecuente fue *Aspergillus spp* (79,3%) en 23 muestras de estas 13 (56,5%) fueron de excretas, este hongo filamentoso ha sido aislado en excretas y plumas de aves (156). Se ha considerado que el género *Aspergillus* tiene su origen en ambientes interiores y exteriores, tanto sus esporas como fragmentos de sus hifas son capaces de producir un amplio rango de enfermedades respiratorias y otras patologías, incluyendo alergias y aspergilosis.

Fusarium y *Rhodotorula* (51,7%) se aislaron en 15 muestras, una elevada asociación de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhodotorula* y *Penicillium* (48,3%) con *Cryptococcus* ha sido demostrada anteriormente (157). Además se aislaron *Trichosporon spp.* (37,9%) *Mucor spp.*

(34,5%), *Candida* spp. (34,5%) y *Curvularia* spp. (24,1%) coincidiendo estos datos con otros estudios (157). También se aislaron *Cunningamella* spp. (34,5%), *Fonsecae* spp. (34,5%), *Rhizopus* spp. (24,1%), *Syncephalastrum* spp. (24,1%), *Scopulariopsis* spp. (17,2%) *Absidia* spp. (10, 3%).

El hallazgo de estos hongos en muestras ambientales en donde existe una relación directa con huéspedes con un tipo de inmunosupresión, es una alerta para tomar medidas de prevención, estas medidas de prevención de las infecciones localmente invasoras o diseminadas causadas por el género *Candida* o incluso por otras levaduras, se fundamentan en su fisiopatología (115). No se encontraron diferencias significativas en cada genero (sig. < 0,708).

OBJETIVO # 5

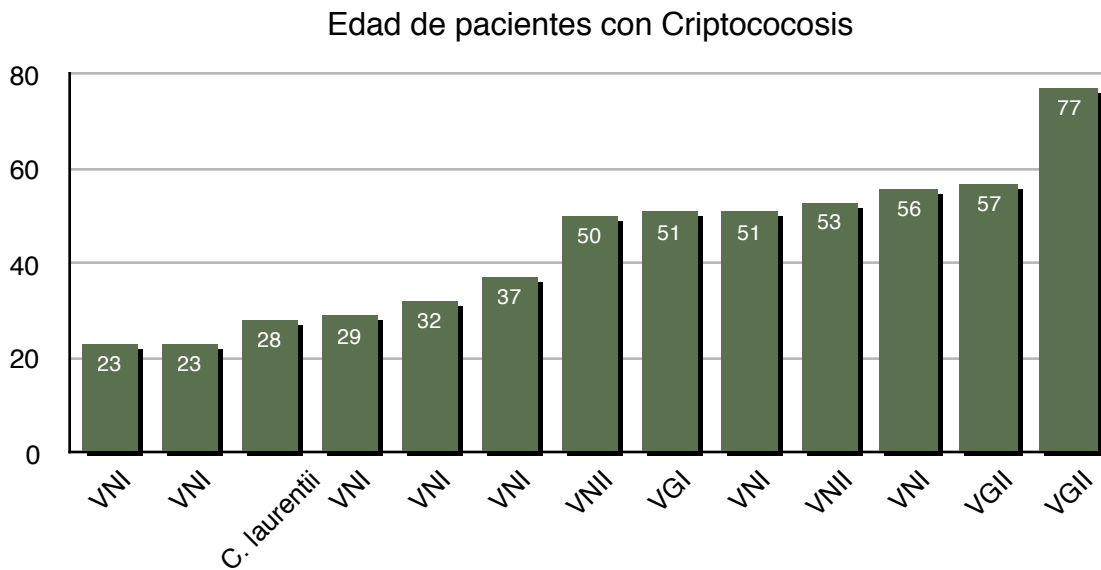


Figura - 33 Edad de los pacientes

Se estudiaron 13 aislamientos clínicos, 12 (92,3%) de LCR y 1(7,3%) de esputo. 9 fueron *C. neoformans*, 7 VNI y 2 VNII. 3 fueron *C. gattii*, 1 VGI y 2 VGII. 1 aislamiento de *C. laurentii* en LCR. El LCR es la muestra más frecuente ya que la infección por *Cryptococcus*

spp. es la principal causa de meningitis fúngica en pacientes inmunocomprometidos, con elevados índices de morbilidad y mortalidad (97). Las muestras de esputo se estudian con menos frecuencia a pesar de que el pulmón es invariablemente, la puerta de entrada y el sitio inicial de la infección, pero *Cryptococcus* tiene preferencia por el SNC (27). Entre el 70 al 90% de los pacientes con sida presenta compromiso del sistema nervioso central (22).

Las muestras fueron obtenidas de pacientes con edades comprendidas entre 23 años y 77 años, con una media de 44,6 años. En nuestra casuística 7 (53,8%) de los pacientes con CM tenían más de 50 años, en concordancia con el hecho de que la criptococosis se presenta con más frecuencia en la vida adulta (87, 158). La criptococosis es una micosis que afecta fundamentalmente adultos jóvenes inmunocomprometidos, particularmente en pacientes VIH positivos en fase de sida (158). Aunque la incidencia de la criptococosis invasiva ha disminuido sustancialmente desde el uso generalizado del TARGA, todavía se da en las poblaciones con acceso limitado a la atención médica, así como aquellos con falla o abandono de esta medicación (159). 12 (92,30%) de los pacientes estudiados eran VIH positivos y 1(7,70%) era VIH negativo, este paciente era hipertenso. La criptococosis además afecta a pacientes con enfermedades crónicas, como la diabetes mellitus, leucemia, tumores y los pacientes con trasplante de órganos son siempre propensos a esta enfermedad (41, 111) .

En Honduras según informe de Onusida, el Departamento de ITS/VIH/SIDA, han registrado 31.051 personas viviendo con VIH; el grupo poblacional más afectado es el de 20 a 39 años de edad con una frecuencia de 66%. La mayoría de los casos se dan en los departamentos de: Cortés, Francisco Morazán, Atlántida y Colón.

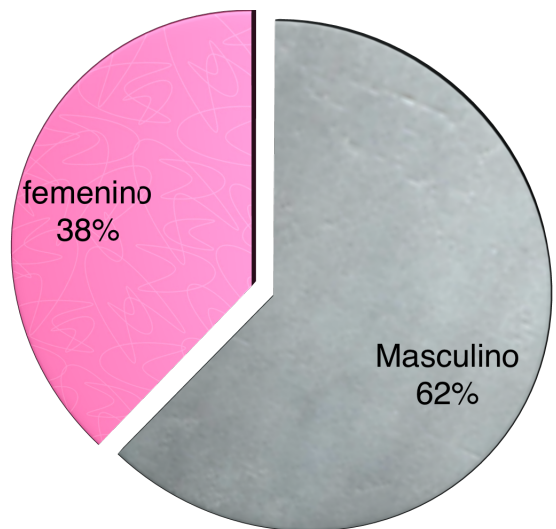


Figura - 34 Sexo de pacientes con criptococosis

De los pacientes analizados durante este período, 5 (38, 0%) eran del sexo femenino y 8 (62,0%) del sexo masculino con una razón de 1,5:1 hombre:mujer, esto coincide con la relación hombre/mujer en pacientes VIH en Honduras la cuál es de 1,1:1 (98).

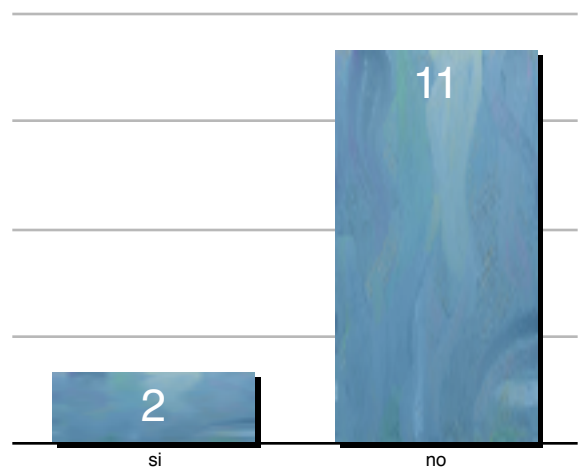


Figura - 35 Frecuencia de Pacientes con y sin recurrencia de criptococosis

De 13 pacientes estudiados, 2 (15,4%) (2 VNII) presentaron recurrencia 1, paciente presentó 3 episodios a lo largo de 9 meses y el otro mantuvo cultivos positivos durante 3 meses, estos pacientes. La recurrencia en la criptococosis se puede presentar por varios factores. El riesgo de recurrencia en criptococosis meníngea se presenta en un 18,0 % de los casos, dato que coincide con nuestros resultados. Generalmente se presenta en el primer año después de la finalización del tratamiento, con una media de 3,5 meses (160). Antes de la introducción del TARGA, las recaídas de criptococosis asociada al sida eran muy frecuentes tras finalizar el tratamiento de inducción, y distintos estudios demostraron la eficacia de la profilaxis secundaria para prevenirlas. Posteriormente se observó que en los pacientes que se recuperan inmunológicamente con el TARGA el riesgo de recidiva de criptococosis disminuye en gran medida (161). La persistencia de la infección criptocócica es causada mayormente por la co-infección con diferentes genotipos (162). Se ha definido a la criptococosis refractaria como la persistencia de cultivos positivos de LCR después de 4 semanas de terapia antifúngica a una dosis efectiva. La recaída de la infección tiene dos características importantes. En primer lugar, la recuperación de hongos viables desde un sitio estéril y segundo, la reaparición de los signos y síntomas en el sitio anterior de la enfermedad que determinan la presencia de la misma. En una infección recidivante, estas dos características se han normalizado y después re- aparecen (163).

8. CONCLUSIONES

- Con este estudio se demostró la presencia de la levadura de *C. neoformans* y su estrecha relación en las excretas de aves *Columba livia* que construyen sus nidos en el espacio del cielorraso que cubre las salas de internación de pacientes con VIH-sida y pacientes con tuberculosis.
- La estrecha relación que tienen las cepas de *C. gattii* con la vegetación se evidenció al aislar cepas de *C. gattii* (VGI y VGII) en diferentes árboles, con predominio en los árboles de *Eucalyptus camaldulensis* presentes en el área verde del INCP.
- Se aislaron otras especies de *Cryptococcus* diferentes a *C. neoformans* y *C. gattii* que pueden producir infecciones clínicas con baja frecuencia.
- Existe en Honduras la presencia de *C. neoformans* genotipos VNI y VNII y *C. gattii* VGI y VGII.
- El tamaño celular y capsular encontradas en las cepas ambientales favorece la inhalación de esporas y, el tamaño alcanzado por la cápsula, al ser inducida en condiciones de atmósfera reducida de CO₂, demostró que pueden ser altamente patógenas.
- Se demostró que las cepas con morfología colonial mucoide observada en las cepas de *C. neoformans*, y la rugosa en *C. gattii* eran las de mayor patogenicidad por la presencia de cápsula durante su crecimiento.
- El medio de cultivo a partir de semillas de *Mucuna pruriens*, por su alto contenido de L-Dopa, puede ser utilizado por *Cryptococcus*. para la producción de melanina para evidenciar la producción de fenoloxidasa por parte del género *Cryptococcus*.

- Las cepas de *Cryptococcus* aisladas del medio ambiente presentaron una fuerte capacidad de sintetizar ureasa, por lo que pueden ser altamente patógenas.
- Se demostró la coexistencia de hongos ambientales filamentosos y levaduriformes en ambientes donde se desarrolla *Cryptococcus*, constituyendo un factor de riesgo para el paciente inmunodeprimido.
- En este estudio los pacientes mas afectados con meningitis por *Cryptococcus* fueron los mayores de 40 años con predominio del sexo masculino.

9. RECOMENDACIONES

La presencia de las aves en los hospitales no constituyen una amenaza inminente para la salud de los pacientes, pero la acumulación de las excretas si pueden ser, por lo que se tiene que hacer limpieza constante del cielorraso y techos de las salas de internación en forma periódica.

Confirmada la presencia de *Cryptococcus* en las muestras vegetales, es necesario realizar estudios ambientales para establecer otros nichos ecológicos del hongo.

Implementar el medio de cultivo de CGB en los laboratorios clínicos donde se hace diagnóstico micológico, por ser una prueba fácil y económica.

Estandarizar pruebas moleculares que ayuden a confirmar las especies de *Cryptococcus* y sus genotipos, en laboratorios clínicos micológicos de referencia.

Determinar el patrón molecular de los aislamientos clínicos debido a que VNII puede presentar resistencia a fluconazol.

BIBLIOGRAFIA

1. Meyer W, Castaneda A, Jackson S, Huynh M, Castaneda E, IberoAmerican Cryptococcal Study G. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerging infectious diseases*. 2003;9:189-95.
2. Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics*. 2006;172:2223-38.
3. Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung J, Perfect J, Casadevall A. *Cryptococcus*: From Human Pathogen to model Yeast. ASM Press, Washinton, DC. 2011.
4. Barnett JA. A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*. *Yeast*. 2010;27:875-904.
5. Benham RW. Their identification by morphology and serology. *The Journal of infectious diseases*. 1935;57:255-74.
6. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal genetics and biology : FG & B*. 2015;78:16-48.
7. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37:838-40.
8. Evans EE. The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. I. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. *Journal of immunology*. 1950;64:423-30.
9. Wilson DE, Bennett JE, Bailey JW. Serologic grouping of *Cryptococcus neoformans*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1968;127:820-23.
10. Gatti F, Eeckels R. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. I. Description of the disease and of the strain. *Annales des Societes belges de medecine tropicale, de parasitologie, et de mycologie*. 1970;50:689-93.
11. Vanbreuseghem R, Takashio M. An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov. *Annales des Societes belges de medecine tropicale, de parasitologie, et de mycologie*. 1970;50:695-702.
12. Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Díaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *International Association for plant Taxonomy*. 2002;51:804-6.
13. Chen SC, Meyer W, Sorrell TC. *Cryptococcus gattii* infections. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27:980-1024.
14. Pedroso RS, Ferreira JC, Candido RC. The isolation and characterization of virulence factors of *Cryptococcus* spp. from saprophytic sources in the city of Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil. *Microbiological research*. 2009;164:221-7.

15. Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of clinical microbiology*. 1990;28:1642-4.
16. Caicedo LD, Alvarez MI, Delgado M, Cardenas A. *Cryptococcus neoformans* in bird excreta in the city zoo of Cali, Colombia. *Mycopathologia*. 1999;147:121-4.
17. Litvintseva AP, Mitchell TG. Most environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) are not lethal for mice. *Infection and immunity*. 2009;77:3188-95.
18. Callejas A, Ordonez N, Rodriguez MC, Castaneda E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colombia. *Medical mycology*. 1998;36:341-4.
19. Grover N, Nawange SR, Naidu J, Singh SM, Sharma A. Ecological niche of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* in decaying wood of trunk hollows of living trees in Jabalpur City of Central India. *Mycopathologia*. 2007;164:159-70.
20. Sriburee P, Khayhan S, Khamwan C, Panjaisee S, Tharavichitkul P. Serotype and PCR-fingerprints of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* in Chiang Mai, Thailand. *Mycopathologia*. 2004;158:25-31.
21. Ergin C, Ilkit M, Kaftanoglu O. Detection of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. *Mycoses*. 2004;47:431-4.
22. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*. 2013;2013:1-23.
23. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. PubMed. 2009;23:525-30.
24. Flores L, Lopez-Lutz E. Comportamiento clinico y epidemiologico de infecciones oportunistas por hongos en pacientes infectados con VIH del Instituto Nacional del Torax y Hospital Escuela. *Rev Med Post UNAH*. 1999;4:224- 31.
25. Viviani MA, Esposto MC, Cogliati M, Montagna MT, Wickes BL. Isolation of a *Cryptococcus neoformans* serotype A MATa strain from the Italian environment. *Medical mycology*. 2001;39:383-6.
26. Benham RW. *Cryptococcus neoformans*: an ascomycete. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1955;89:243-5.
27. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. *American Society for Microbiology*. 1998;44.
28. Lin X. *Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2009;9:401-16.
29. Chang YC, Khanal Lamichhane A, Bradley J, Rodgers L, Ngamskulrungraj P, Kwon-Chung KJ. Differences between *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in the Molecular Mechanisms Governing Utilization of D-Amino Acids as the Sole Nitrogen Source. *PloS one*. 2015;10:1-20.

30. Chen Y, Toffaletti DL, Tenor JL, Litvintseva AP, Fang C, Mitchell TG, et al. The *Cryptococcus neoformans* transcriptome at the site of human meningitis. *mBio*. 2014;5:1087-13.
31. <http://www.cbs.knaw.nl/Collections/Biolomics.aspx?Table=Yeasts%202011>.
32. Kwon-Chung KJ. A new species of *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia*. 1976;68:943-6.
33. Escandon P, Ngamskulrungraj P, Meyer W, Castaneda E. In vitro mating of Colombian isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2007;27:308-14.
34. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014;4:197-60.
35. Klein KR, Hall L, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47:3669-72.
36. Kwon-Chung KJ, Sorrell TC, Dromer F, Fung E, Levitz SM. Cryptococcosis: clinical and biological aspects. *Med Mycol*. 2000;38:205-13.
37. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*. 2001;147:891-907.
38. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:17258-63.
39. Banerjee A, Bhattacharya S. Cryptococcosis in advance state of Aids and its challenging therapeutic regimen: Is it really curable? *Asian J Pharm and Clin Res*. 2015;8:51-8.
40. Morgan J, McCarthy KM, Gould S, Fan K, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, et al. *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002-2004. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2006;43:1077-80.
41. Huanrong W, Xueqian Y, Lifeng Z. Latex agglutination: Diagnose early *Cryptococcus neoformans* test of capsular polysaccharide antigen. *Pak J Pharm Sci*. 2015;28:307-11.
42. Chen LC, Goldman DL, Doering TL, Pirofski L, Casadevall A. Antibody response to *Cryptococcus neoformans* proteins in rodents and humans. *Infection and immunity*. 1999;67:2218-24.
43. Leechawengwongs M, Milindankura S, Sathirapongsasuti K, Tangkoskul T, Punyagupta S. Primary cutaneous cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii* VGII in a tsunami survivor from Thailand. *Medical mycology case reports*. 2014:31-3.
44. Meyer W, Gilgado F, Ngamskulrungraj P, Trilles LH, Hagen F, Castaneda E, et al. Molecular typing of the *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* species complex. In *Cryptococcus: From human pathogen to model yeast*. ASM, Washington, DC. 2011:327-57.

45. Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung JK, Perfect J, Casadevall A. *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*. ASM Press, Washington, DC. 2011.
46. Kwon-Chung KJ, Kozel TR, Edman JC, Polacheck I, Ellis D, Shinoda T, et al. Recent advances in biology and immunology of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology*. 1992;30:133-42.
47. Amburgy JW, Miller JH, Ditty BJ, Vande Lune P, Muhammad S, Fisher III WS. *Cryptococcus gattii* in an Immunocompetent Patient in the Southeastern United States. *Hindawi*. 2016;2016:1- 4.
48. Byrnes EJ, Li W, Lewit Y, Ma H, Voelz K, Ren P, et al. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. *PLoS pathogens*. 2010;6:1-16.
49. Torres-Rodriguez JM, Baro T, Morera Y, Alia C, Lopez O, Hermoso de Mendoza M. Molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* causing epidemic outbreaks of cryptococcosis in goats. *Revista iberoamericana de micologia*. 1999;16:164-5.
50. Farrer RA, Desjardins CA, Sakthikumar S, Gujja S, Saif S, Zeng Q, et al. Genome Evolution and Innovation across the Four Major Lineages of *Cryptococcus gattii*. *mBio*. 2015;6:1-12.
51. Staib F. [*Cryptococcus neoformans* in canaries]. *Zentralblatt fur Bakteriologie : international journal of medical microbiology*. 1962;185:129-34.
52. Kwon-Chung KJ. The discovery of creatinine assimilation in *Cryptococcus neoformans*, and subsequent work on the characterization of the two varieties of *C. neoformans*. *Zentralblatt fur Bakteriologie : international journal of medical microbiology*. 1991;275:390-3.
53. Polacheck I, Kwon-Chung KJ. Creatinine metabolism in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus bacillisporus*. *Journal of bacteriology*. 1980;142:15-20.
54. Pedrosa RS, Lavrador MA, Ferreira JC, Candido RC, Maffei CM. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* - Pathogenicity of environmental isolates correlated to virulence factors, susceptibility to fluconazole and molecular profile. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010;105:993-1000.
55. Toh-e A, Ohkusu M, Li HM, Shimizu K, Takahashi-Nakaguchi A, Gono T, et al. Identification of genes involved in the phosphate metabolism in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal genetics and biology : FG & B*. 2015;80:19-30.
56. Coelho C, Bocca AL, Casadevall A. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Advances in applied microbiology*. 2014;87:1-41.
57. Rodrigues MLA, C.S. ; Travassos , L.R. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. *Microbes and infection*. 1999;1:293-301.
58. Hurtado IC, Lopez P, Osorio MA, López-Medina E. Criptococosis congénita en un neonato expuesto a VIH: presentación de un caso. *Infectio*. 2016;20:93-6.
59. Vecchiarelli A, Pericolini E, Gabrielli E, Kenno S, Perito S, Cenci E, et al. Elucidating the immunological function of the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Future microbiology*. 2013;8:1107-16.

60. Kumar P, Heiss C, Santiago-Tirado FH, Black I, Azadi P, Doering TL. Pbx proteins in *Cryptococcus neoformans* cell wall remodeling and capsule assembly. *Eukaryotic cell*. 2014;13:560-71.
61. Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Advances in applied microbiology*. 2009;68:133-216.
62. Giles SS, Dagenais TR, Botts MR, Keller NP, Hull CM. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infection and immunity*. 2009;77:3491-500.
63. Grechi J, Marinho-Carvalho M, Zancan P, Cinelli LP, Gomes AM, Rodrigues ML, et al. Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* down-regulates the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase of macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:14820-9.
64. Eisenman HC, Mues M, Weber SE, Frases S, Chaskes S, Gerfen G, et al. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. *Microbiology*. 2007;153:3954-62.
65. Singhal A, Choudhary G, Thakur IS. Characterization of laccase activity produced by *Cryptococcus albidus*. *Preparative biochemistry & biotechnology*. 2012;42:113-24.
66. Williamson PR. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 1997;2:99-107.
67. Williamson PR. Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *Journal of bacteriology*. 1994;176:656-64.
68. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Popkin TJ. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *Journal of bacteriology*. 1982;150:1414-21.
69. Singh A, Panting RJ, Varma A, Saijo T, Waldron KJ, Jong A, et al. Factors required for activation of urease as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*. 2013;4:220-13.
70. Olszewski MA, Noverr MC, Chen GH, Toews GB, Cox GM, Perfect JR, et al. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *The American journal of pathology*. 2004;164:1761-71.
71. Cox GM, McDade HC, Chen SC, Tucker SC, Gottfredsson M, Wright LC, et al. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular microbiology*. 2001;39:166-75.
72. Ganendren R, Carter E, Sorrell T, Widmer F, Wright L. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2006;8:1006-15.
73. Rodrigues ML, Nakayasu ES, Oliveira DL, Nimrichter L, Nosanchuk JD, Almeida IC, et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic cell*. 2008;7:58-67.

74. Benaducci T, Sardi Jde C, Lourencetti NM, Scorzoni L, Gullo FP, Rossi SA, et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms In Vitro and In Vivo using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:290.
75. Fica A, Soto A. Criptococosis en pacientes inmunosuprimidos sin infección por VIH/SIDA: un nuevo problema clínico en Chile. *Revista chilena de infectología : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*. 2015;32:73-9.
76. Almeida RLG, E. R. *Cryptococcus* spp. em Pacientes com HIV/SIDA: Revisão da Literatura. *Ensaio Cienc: Cienc Biol Agrar e da Saúde*. 2014;18:55-36.
77. Illnait-Zaragozi MT, Martinez-Machin GF, Fernandez-Andreu CM, Perurena-Lancha MR, Hagen F, Meis JF. *Cryptococcus* and cryptococcosis in Cuba. A minireview. *Mycoses*. 2014;57:707-17.
78. Viviani MA, Tortorano, A.M. *Cryptococcus*. The organism. 2006;9:231-49.
79. Bonifaz JA. *Micología Médica Básica*. Mc Graw-Hill. 2012;4.
80. Canteros CE, Rodero L, Rivas MC, Davel G. A rapid urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 1996;136:21-3.
81. Staib F, Seibold M, Antweiler E, Frohlich B, Weber S, Blisse A. The brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* infections in AIDS patients. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene 1 Abt Originale A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie = International journal of microbiology and hygiene A, Medical micro*. 1987;266:167-77.
82. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal of clinical microbiology*. 1982;15:535-7.
83. Dufait R, Velho R, De Vroey C. Rapid identification of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* by D-proline assimilation. *Mykosen*. 1987;30:483.
84. Cejudo MA, Gallego AG, Lacasa EC, Aller AI, Romero A, Garcia JP, et al. Evaluation of the VITEK 2 system to test the susceptibility of *Candida* spp., *Trichosporon asahii* and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, flucytosine, fluconazole and voriconazole: a comparison with the M27-A3 reference method. *Medical mycology*. 2010;48:710-9.
85. Mancini N, De Carolis E, L. I, Vella A, Clementi N, Vaccaro L, et al. Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51:2453-57.
86. Galán F, Garcia-Agudo L, Guerrero I, Marin P, Garcia-Tapia A, Garcia-Martos P, et al. Evaluación de la espectrometría de masas en la identificación de levaduras de interés clínico. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2014;33:372-78.
87. Negroni R. *Cryptococcosis*. *Clinics in Dermatology*, Elsevier. 2012;30:599-609.
88. Perfect JR, Bicanic T. *Cryptococcosis* diagnosis and treatment: What do we Know now. *Fungal genetics and biology : FG & B*. 2015;78:49-54.
89. Tintelnot K. HF, Ok Han C., Seibold M., Rickerts V. and Boekhout T. Pitfalls in Serological Diagnosis of *Cryptococcus gattii* Infections. *Med Mycol*. 2015.

90. Hansen J, Slechta ES, Gates-Hollingsworth MA, Neary B, Barker AP, Bauman S, et al. Large-scale evaluation of the immuno- mycologics lateral flow and enzyme-linked immunoassays for detection of cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid. *Clin Vaccine Immunol.* 2013;20:52–5.
91. Lizarazo J, Castañeda E. Cryptococcosis in AIDS patients, some considerations. *Infection.* 2012;16:94-9.
92. Perfect JR, Bicanic T. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genet Biol.* 2014;78:49-54.
93. Negroni R, Arechavala A, Santiso GM, Bonvehí P. Problemas clínicos en micología médica: problema número 46. *Revista iberoamericana de micología.* 2014;31:207-9.
94. Kwon--chung JKS, T. Is *Cryptococcus gattii* a Primary Pathogen? *Journal of fungi.* 2015;1:154-67.
95. Zhang LK, Qiu JW, Liang XL, Huang BY, Li Y, Du L, et al. Role of CD44 in monocyte transmigration across *Cryptococcus neoformans*-infected blood-brain barrier in vitro. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University.* 2015;35:468-73.
96. Subramaniam KS, Datta K, Quintero E, Manix C, Marks MS, Pirofski LA. The absence of serum IgM enhances the susceptibility of mice to pulmonary challenge with *Cryptococcus neoformans*. *Journal of immunology.* 2010;184:5755-67.
97. Pappalardo MCSM, Melhem MSC. Criptococose: revisao sobre a experiencia brasileira sobre a doenc. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.* 2003;45:299-305.
98. Ferrer Y, Muñoz-Cabas D, Hernandez A, Ferrer O, Ayubi A, Villasmil O, et al. experiencia clinica de la meningoencefalitis criptococócica en un hospital publico venezolano. *Rev Mex Neuroci.* 2012;13:301-5.
99. Galindo Portuondo ES, León Blasco AM, Pila Perez R, Ramírez Cancio O, Morell Artola AE. Meningoencefalitis causada por *Cryptococcus neoformans*: presentación de un caso. *Rev Cubana Neurol Neurocir.* 2014;4:148-52.
100. Newsome J, Nguyen D. Cryptococcal meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* in an immunocompetent soldier. *Military medicine.* 2014;179:1059-61.
101. Díaz-Pérez JA, Garcia-Vera JA, Mantilla-Hernandez JC, Pradilla-ardila G. Criptococoma en el sistema nervioso central de un paciente no inmunoafectado. *Rev Neurol.* 2008;46:97-101.
102. Guevara-Campos J, Gonzalez-Guevara L, Urbez-Cano J, Fermin S. *Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis in immunocompetent schoolchildren. *Investigacion clinica.* 2009;50:231-9.
103. Ramírez S, Roa L, Triana J, Marin J, Clavijo-Prado C, Cardenas K, et al. Criptococosis cerebral: descripción de una serie de casos con presentaciones típicas y atípicas en el Hospital Universitario San José Infantil de Bogotá. *Acta neurol Colomb.* 2015;31:158-66.
104. Chavéz-López G, Estrada-Chávez G, Estrada R, Bonifaz A, Hay R. Cutaneous cryptococcosis associated to T cell lymphoma. *Dermatol Rev Mex.* 2015;59:49-53.
105. Latino GA, Gago E, Vidau P, Vivanco B. Criptococosis cutánea en un paciente que recibe hemodiálisis crónica. *Nefrologia.* 2012;32:679-700.

106. Contreras - Steyls M, Vilchez F, Moyano B, Herrera E. Lesiones cutáneas moluscoides en paciente con VIH no conocido. *Med Cutan Iber Lat Am*. 2014;42:65-7.
107. Tello M, Gutierrez E, Bejar V, Galarza C, Ramos W, Ortega-Loayza AG. Criptococosis. *Rev Med Risalda*. 2013;19:147-53.
108. Ferreira-Paim K, Andrade-Silva L, Mora DJ, Silva PR, Machado AS, Das N, et al. Primary cutaneous cryptococcosis caused by *Cryptococcus gattii* in an immunocompetent host. *Medical mycology*. 2010;49.
109. Timurkaynak F, Arslan H, Kuru E, Habera N, Ankara TR. Necrotizing fasciitis caused by *Cryptococcus neoformans* in a renal transplant recipient. *Clinical Microbiology and Infection*. 2003;9:269.
110. Montoya C, Paulo JD, velásquez LF. Criptococosis ocular y retinitis por citomegalovirus en pacientes inmunosuprimidos. *Infectio*. 2012;16:100-3.
111. Negroni R. Cryptococcosis. *Clinics in Dermatology*. 2012;30:599-609.
112. Shukla S, Garg J, Mahajan G, Sharma S. Liver dysfunction as the presenting feature of disseminated cryptococcosis. *Southern African Journal of Infectious Diseases*. 2016;1:1-3.
113. Medaris LA, Ponce B, Hyde Z, Delgado D, Ennis D, Lapidus W, et al. Cryptococcal osteomyelitis: a report of 5 cases and a review of the recent literature. *Mycoses*. 2016;59:334-42.
114. Specht CA, Lee CK, Huang H, Tipper DJ, Shen ZT, Lodge JK, et al. Protection against Experimental Cryptococcosis following Vaccination with Glucan Particles Containing *Cryptococcus* Alkaline Extracts. *mBio*. 2015;6:1905-15.
115. Peman J, Salavert M. Epidemiología y prevención de las infecciones nosocomiales causadas por especies de hongos filamentosos y levaduras. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31:328 - 41.
116. Robinson PA, Bauer M, Leal MA, Evans SG, Holtom PD, Diamond DA, et al. Early mycological treatment failure in AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis*. 1999;28:82-92.
117. Trilles L, Fernandez-Torres B, Lazera Mdos S, Wanke B, Guarro J. In vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus gattii*. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42:4815-7.
118. Chong HS, Dagg R, Malik R, Chen S, Carter D. In vitro susceptibility of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48:4115-20.
119. Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Hagen F, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56:3107-13.
120. Castaneda E, Lizarazo J. Protocolo de estudio y manejo de los pacientes con criptococosis. Elsevier. 2012;16:123-5.
121. Reis MP, Carvalho CR, Andrade FA, Fernandes OF, Arruda W, Silva MR. Fisetin as a promising antifungal agent against *Cryptococcus neoformans* species complex. *Journal of applied microbiology*. 2016;121:373-9.

122. Shehu A, Isamail S, Khalili Rohin MA, Harun A, Aziz AA, Haque M. Antifungal Properties of Malaysian Tualang Honey and Stingless Bee Propolis against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Applied Pharmaceutical Science*. 2016;6:44-50.
123. Escandon P, Sanchez A, Martinez M, Meyer W, Castaneda E. Molecular epidemiology of clinical and environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex reveals a high genetic diversity and the presence of the molecular type VGII mating type a in Colombia. *FEMS yeast research*. 2006;6:625-35.
124. Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castanon-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56:5898-906.
125. Hagen F, Chowdhary A, Prakash A, Yntema JB, Meis JF. Molecular characterization of *Cryptococcus gattii* genotype AFLP6/VGII isolated from woody debris of divi-divi (*Caesalpinia coriaria*), Bonaire, Dutch Caribbean. *Revista iberoamericana de micología*. 2014;31:193-6.
126. USAID. Auditoria social a los fondos obtenidos por cobro de la cuota de recuperación por los servicios de salud en el Centro de Atención Integral del INCP. 2014.
127. Meyer W, Escandón P. Primer curso latinoamericano en diagnóstico, identificación molecular y epidemiología de hongos patógenos humanos. 1ra ed Bogota (Colombia). 2014;1:4-5.
128. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Medical mycology*. 2009;47:561-70.
129. IBM. Guía breve de IBM SPSS Statistics 20. 2011.
130. Ruiz A, Fromtling RA, Bulmer GS. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. *Infection and immunity*. 1981;31:560-3.
131. Hamasha AM, Yildiran ST, Gonlum A, Saracli MA, Doganci L. *Cryptococcus neoformans* varieties from material under the canopies of eucalyptus trees and pigeon dropping samples from four major cities in Jordan. *Mycopathologia*. 2004;158:195-9.
132. Botts MR, Hull CM. Dueling in the lung: how *Cryptococcus* spores race the host for survival. *Current opinion in microbiology*. 2010;13:437-42.
133. Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Current opinion in microbiology*. 2000;3:354-8.
134. Firacative C, Torres G, Rodriguez MC, Escandon P. First environmental isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B, from Cucuta, Colombia. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2011;31:118-23.
135. Neves RP, de Lima Neto RG, Leite MC, da Silva VK, dos Santos Fde A, Macedo DP. *Cryptococcus laurentii* fungaemia in a cervical cancer patient. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2015;19:660-3.

136. Kordossis T, Avlami A, Velegraki A, Stefanou I, Georgakopoulos G, Papalambrou C, et al. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. *Medical mycology*. 1998;36:335-9.
137. Animalu C, Mazumder S, Cleveland KO, Gelfand MS. *Cryptococcus uniguttulatus* Meningitis. *Amer J Med Sci*. 2015;350:421-2.
138. Cogliati M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*. 2013;2013:675213.
139. Cattana ME, Tracogna MF, Fernandez MS, Carol Rey MC, Sosa MA, Giusiano GE. Genotyping of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* complex clinical isolates from Hospital "Dr. Julio C. Perrando", Resistencia city (Chaco, Argentina). *Revista Argentina de microbiologia*. 2013;45:89-92.
140. Tay ST, Na SL, Tajuddin TH. Natural occurrence and growth reaction on canavanine-glycine-bromothymol blue agar of non-*neoformans* *Cryptococcus* spp. in Malaysia. *Mycoses*. 2008;51:515-9.
141. al K-Ce. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *Journal of clinical microbiology*. 1982;15:535.
142. Manfredi R, Fulgaro C, Sabbatani S, Legnani G, Fasulo G. Emergence of amphotericin B-resistant *Cryptococcus laurentii* meningoenzephalitis shortly after treatment for *Cryptococcus neoformans* meningitis in a patient with AIDS. *AIDS patient care and STDs*. 2006;20:227-32.
143. Barchiesi F, Cogliati M, Esposto MC, Spreghini E, Schimizzi AM, Wickes BL, et al. Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis. *The Journal of infection*. 2005;51:10-6.
144. Alvarado-Ramirez E, Torres-Rodriguez JM, Sellart M, Vidotto V. Laccase activity in *Cryptococcus gattii* strains isolated from goats. *Revista iberoamericana de micologia*. 2008;25:150-3.
145. Zaragoza O, Chrisman CJ, Castelli MV, Frases S, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL, et al. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cellular microbiology*. 2008;10:2043-57.
146. Sanchez A, Escandon P, Castaneda E. [In vitro determination of virulence factors activity associated with several *Cryptococcus neoformans* clinical isolates]. *Revista iberoamericana de micologia*. 2008;25:145-9.
147. Garcia-Rodas R, Cordero RJ, Trevijano-Contador N, Janbon G, Moyrand F, Casadevall A, et al. Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. *mBio*. 2014;5:945-14.
148. Huerfano S, Cepero MC, Castaneda E. [Phenotype characterization of environmental *Cryptococcus neoformans* isolates]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2003;23(3):328-40.
149. Cogliati M, Zani A, Rickerts V, McCormick I, Desnos-Ollivier M, Velegraki A, et al. Multilocus sequence typing analysis reveals that *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* is a recombinant population. *Fungal genetics and biology : FG B*. 2016;87:22-9.

150. Racicot TA, Bulmer GS. Comparison of Media for the Isolation of *Cryptococcus neoformans*. *Applied and environmental microbiology*. 1985;50:548-9.
151. Denning DW, Stevens DA, Hamilton JR. Comparison of Guizotia abyssinica seed extract (birdseed) agar with conventional media for selective identification of *Cryptococcus neoformans* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of clinical microbiology*. 1990;28:2565-7.
152. Gokulshankar S, Babu K, Valli S, Ranjitsingh AJ, Ranjith MS. Cowitch seed agar medium--a simple new medium for identification and melanin production of *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses*. 2011;54:e208-10.
153. Sengul M, Ergin C, Kartal T. [Evaluation of a new medium, eggplant (*Solanum melongena*) agar as a screening medium for *Cryptococcus neoformans* in environmental samples]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2014;48:292-9.
154. Duarte A, Ordonez N, Castaneda E. Association of yeasts of the *Cryptococcus* genus with *Eucalyptus* species in Santafe de Bogota. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1994;36:125-30.
155. Torres-Rodriguez JM, Alvarado-Ramirez E, Gutierrez-Gallego R. Urease activity in *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Revista iberoamericana de micologia*. 2008;25:27-31.
156. Mangiarotti AM, Caretta G, De Luca C, Piontelli Laforet E. Fungi isolated from feathers and faeces of hens in an avian industry of Monferrato, Pavia Italy. *Bol micol*. 1993;8:91-8.
157. Cermeno JR, Hernandez I, Cabello I, Orellan Y, Cermeno JJ, Albornoz R, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* in dove's (*Columbia livia*) excreta in Bolivar state, Venezuela. *Revista latinoamericana de microbiologia*. 2006;48:6-9.
158. Avila Sanchez D, Villalobos Zúniga MA. Perfil epidemiológico y respuesta terapéutica de la infección por *Cryptococcus* sp. en pacientes de Costa Rica en el Hospital San Juan de Dios, Periodo 2008-2012. *Rev CI EMed UCR*. 2016;1:8-30.
159. Park SH, Kim M, Joo SI, Hwang SM. Molecular Epidemiology of Clinical *Cryptococcus neoformans* Isolates in Seoul, Korea. *Mycobiology*. 2014;42:73-8.
160. Consenso em criptococose:. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008;41:524-44.
161. Aberg JA, Price RW, Heeren DM, Brecht B. A pilot study of the discontinuation of antifungal therapy for disseminated cryptococcal disease in patients with acquired immunodeficiency syndrome, following immunologic response to antiretroviral therapy. *The Journal of infectious diseases*. 2002;185:1170-82.
162. Illnait-Zaragozi MT, Martinez-Machin GF, Fernandez-Andreu CM, Perurena-Lancha MR, Theelen B, Boekhout T, et al. Environmental isolation and characterisation of *Cryptococcus* species from living trees in Havana city, Cuba. *Mycoses*. 2012;55:138-44.
163. Perfect JR, et al. Clinical practice guidelines for management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;50:291-322.

11. ANEXOS