

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO**



“Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas (*Columba livia*) encontradas en suelo y nidos dentro de las instalaciones del Hospital Nacional Rosales de El Salvador, en el periodo de junio-julio 2018”

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO**

Presentado por:

**Karen Lisseth López Flores
Francis Alfredo Segura Calderón
Jennifer Verónica Vásquez Munguía**

Asesora:

Licda. Flor De María López de Henríquez

Cuidad Universidad, septiembre 2018.

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

Msc. Roger Armando Arias Alvarado

VICERRECTOR ACADÉMICO

Dr. Manuel de Jesús Joya Ábrego

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

Ing. Nelson Bernabé Granados

DECANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA

Dra. Maritza Mercedes Bonilla Dimas

VICEDECANA DE LA FACULTAD DE MEDICINA

Licda. Nora Elizabeth Ábrego de Amado

DIRECTORA DE LA ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

Licda. Dálide Ramos de Linares

DIRECTORA DE LA CARRERA DE LICENCIATURA EN LABORATORIO CLÍNICO

Msp. Miriam Cecilia Recinos de Barrera

AGRADECIMIENTOS

No ha sido nada fácil llegar hasta este punto, ha implicado mucho esfuerzo, dedicación y sacrificio; pero nada habría sido posible si no hubiera tenido el apoyo necesario para lograrlo.

Agradezco en primer lugar a toda mi familia, principalmente a mi madre Milagro Calderón y mi padre Donaldo Segura, quienes me apoyaron en todo el proceso de mi formación, desde educación básica hasta la superior, fueron la pieza fundamental que me permitió superarme en cada momento.

Gracias a cada uno de los docentes que hicieron realidad mi formación profesional en la Universidad de El Salvador.

Agradezco especialmente a mi novia, amiga y compañera de trabajo de graduación, Karen López, quien me brindó su apoyo en las buenas y en las malas, juntos fuimos superando cada dificultad y celebrando cada logro.

Francis Alfredo Segura Calderón.

AGRADECIMIENTOS

Las palabras se quedarán cortas para todo lo que quiero expresar...

Eternas gracias...

A Dios, por ser quien ha guiado mis pasos, ha mostrado su amor para conmigo y ha sido el autor de esta hermosa historia de mi vida.

A mi padre, César Mauricio López Guevara, por siempre demostrarme que no hay límites que nos impidan lograr nuestros sueños, por esforzarse siempre por ser el mejor papá y por su amor incondicional.

A mi madre, Cecilia Flores, por ser una mujer inigualable, llena de virtudes y dedicada a su familia, por animarme siempre a jamás darme por vencida y abrirme sus brazos llenos de amor cada vez que lo necesité.

A mi hermano y su esposa, por motivarme a seguir adelante.

A la licda. Flor de María López de Henríquez, por su tiempo, paciencia y dedicación a lo largo no solo de este trabajo de investigación, si no, en su labor como docente, la cual desempeña de forma inigualable.

A la licda. Rita Evelyn de Recinos y al lic. Josué Enmanuel Orellana, por sus esfuerzos, motivación y dedicación, al contribuir a la formación de excelentes profesionales dentro de la Facultad de Medicina.

Al lic. José Alberto Argueta, por su entusiasmo al compartir sus conocimientos y, sobre todo, por su amistad.

A mi amiga y colega, Helen Ivonne Ramírez, por brindarme el tesoro de incalculable valor, que es su amistad.

A mi amado Francis, por ser mi colega, compañero y amigo, confidente de mis sueños y artífice de mi felicidad.

A todas y cada una de las personas que sin interés alguno contribuyeron a la realización de este sueño, brindando su tiempo, apoyo y disposición de servicio, que Dios les multiplique grandemente.

Karen Lisseth López Flores.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

Se la dedico al forjador de mi camino, a mi padre celestial el que me acompaña y siempre me levanta en cada tropiezo; mi luz y mi guía en mi largo camino de la vida, el que me regala sabiduría y entendimiento para ser mejor persona día con día, al que agradezco su infinito amor por permitirme finalizar mis estudios universitarios y poder cumplir mis sueños.

A mis padres.

Por su apoyo incondicional, por nunca dejar de creer en mí y en su futura licenciada, gracias por sus consejos, sus palabras de ánimo, gracias por ser mis dos grandes pilares y formarme como una gran persona y una futura profesional.

A mi madre Sonia Elizabeth Cerritos mujer virtuosa y valiente, que cada una de sus oraciones suben al cielo y bajan en forma de bendición, gracias por tanto amor, cariño y comprensión, por ser mi ayuda en cada uno de mis momentos difíciles, gracias por acompañarme en todo el camino universitario. Gracias madre.

A mi padre José Ovidio Vásquez que con mucho esfuerzo y sacrificio me ha acompañado y apoyado en este camino de formación profesional, gracias por ser un padre único y ejemplar, gracias por tu ayuda incondicional, y por nunca desmayar en esta lucha conmigo. Gracias padre.

Mi pequeña Lucia Verónica mí amada hija por ser mi mayor inspiración, y mi fuerza para seguir en la lucha para alcanzar mis sueños.

A mi persona amada.

Rafael Melgar un hombre maravilloso, único e ideal, gracias por confiar en mí, con tus lindas palabras de tú puedes, que ante las dificultades me dijo ya pasara y serás una gran profesional, gracias corazón por llegar en forma de bendición a mi vida, gracias por tu amor y cariño, quedando cortas mis palabras solo me resta decirte TE AMO.

A todas las personas que hicieron posible el logro de esta investigación, licenciada Flor de Henríquez por su apoyo y confianza en nosotros, por compartir cada uno de sus conocimientos.

Gracias a cada una de las personas que con su ayuda hizo posible el logro de este sueño, que mi Dios les multiplique, y siga bendiciendo cada una de sus vidas.

Jennifer Verónica Vásquez Munguía.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	9
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. OBJETIVOS	15
V. HIPÓTESIS	16
VI. MARCO TEÓRICO	17
Antecedentes históricos.....	17
Etiología.....	20
Taxonomía.....	22
Hábitat y fuentes de infección	22
Epidemiología.....	24
Factores predisponentes.....	25
Patogenia.....	27
Aspectos clínicos	31
Diagnóstico de laboratorio.....	35
Muestras clínicas.....	35
Examen directo	36
Cultivos.....	36
Histopatología	38
Pruebas inmunológicas	38
VII. DISEÑO METODOLÓGICO	39
VIII. RESULTADOS	43
IX. DISCUSIÓN	48
X. CONCLUSIONES	51
XI. RECOMENDACIONES	52
XII. ANEXOS	54
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

I. INTRODUCCIÓN

La criptococosis es una micosis producida por hongos levaduriformes pertenecientes al género *Cryptococcus*; esta enfermedad se caracteriza por tener una clara predilección hacia el sistema nervioso central (SNC), afectando a humanos y gran variedad de animales. Existen diversas especies pertenecientes al género, sin embargo, dos son las que con mayor frecuencia se aíslan en humanos: *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* (4).

Entre las diferencias que existen al comparar las dos especies, se encuentra que difieren significativamente en su población blanco, es decir, aquellas personas susceptibles a adquirir la enfermedad, ya que *C. neoformans* afecta exclusivamente a individuos inmunosuprimidos, caso contrario de *C. gattii*, el cual puede causar infección en cualquier persona, ya sea sana o con inmunosupresión. Otra diferencia importante entre *C. neoformans* y *C. gattii* radica en el hábitat donde se desarrollan, ya que el primero se asocia a excretas de palomas (*Columba livia*), mientras que el segundo, está íntimamente ligado con detritus vegetales de árboles gomíferos rojos y eucaliptos, sobre todo de *Eucalyptus camaldulensis* (7).

Siendo las palomas el principal reservorio de *C. neoformans* y las excretas de éstas el medio a través del cual las estructuras del hongo se distribuyen en el ambiente, resulta de vital importancia comprobar la presencia del microorganismo en aquellos lugares donde existe una alta cantidad de aves, sobre todo, en zonas donde el contacto con humanos es inminente, como es el caso de las instalaciones del Hospital Nacional Rosales (HNR).

El presente trabajo de investigación consistió en realizar cultivos a partir de excretas de palomas provenientes del suelo y restos de nidos que se encontraron en las instalaciones del HNR; con el propósito de conocer si está presente *C. neoformans* en dichas muestras, para ello se realizó la siembra en agar semilla de girasol (medio de cultivo diferencial), preparaciones al fresco y la prueba de ureasa, logrando así su identificación.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El complejo *Cryptococcus neoformans/ Cryptococcus gattii* es el responsable de la infección de distribución mundial denominada criptococosis. Dicho agente se caracteriza por ser una levadura capsulada con un elevado tropismo por el sistema nervioso central. Se conoce que *C. neoformans* afecta principalmente a pacientes inmunosuprimidos, con mayor frecuencia, a personas con virus de inmunodeficiencia humana en etapa avanzada, por lo cual, se considera una micosis sistémica oportunista. En cambio, *C. gattii* se ha aislado en personas que no sufrían de algún tipo de inmunosupresión, por lo que es considerada una especie patógena (9). Independientemente de la especie, la criptococosis inicia cuando penetran al organismo por vía aérea, estructuras infecciosas del hongo que se encuentran en el ambiente.

El hábitat de *C. gattii* se ha determinado que son los árboles eucaliptos, éstos juegan un papel importante en el ciclo de vida del hongo, sobre todo en su fase teleomórfica, pues el microorganismo infecta las semillas de estos árboles y es capaz de mantenerse ahí por mucho tiempo de forma latente; cabe destacar que se han realizado numerosos aislamientos de este hongo en tejidos vegetales de las especies *Eucalyptus camaldulensis* y *E. tereticornis*. Por otra parte, *Cryptococcus neoformans* está asociado a lugares contaminados con excretas de aves, especialmente de palomas (*Columba livia*); el guano de éstas generalmente es alcalino y representa una fuente rica en productos nitrogenados que mantienen viable al hongo hasta por varios meses, en especial si persiste cierta humedad (4).

En El Salvador, la población de estas aves se encuentra distribuida en numerosos lugares, desde domicilios particulares hasta sitios de uso público con afluencia de muchas personas, tal es el caso del Hospital Nacional Rosales (HNR) en donde la cantidad de aves aumenta con el pasar del tiempo. Un factor crucial que ha contribuido a este aumento se debe a que las personas alimentan a las aves, generando así un lugar propicio para la concentración de las mismas.

En el año 2011 se realizó un estudio a nivel nacional que consistió en el aislamiento de *C. neoformans* en muestras del ambiente contaminadas con excretas de palomas obtenidas en diferentes zonas del país, uno de los lugares evaluados fue el HNR, en donde se comprobó la existencia de *C. neoformans* en las instalaciones de la institución (2). Desde entonces, la población de palomas ha crecido con rapidez en el nosocomio, haciendo de éste su hogar permanente, donde anidan y se reproducen, por lo que es muy común ver en el ambiente restos de sus excretas. Debido a esto, resulta de mucha importancia comprobar si en la actualidad el hongo sigue presente en el lugar.

De acuerdo con lo antes expuesto, en relación con la numerosa población de palomas en el HNR, nos planteamos la siguiente interrogante:

¿Existe en la actualidad *Cryptococcus neoformans* en restos de nidos y excretas de palomas que habitan en las instalaciones del Hospital Nacional Rosales?

III. JUSTIFICACIÓN

Se conoce que las palomas urbanas (*Columba livia*) actúan como reservorio natural de la levadura *Cryptococcus neoformans*; sin embargo, éstas no adquieren la enfermedad debido a la temperatura corporal que poseen, a la cual el hongo puede reproducirse y no ser virulento; por tanto, no existe una transmisión por contacto directo con las aves, sino más bien, por la exposición a las estructuras del microorganismo presentes en sus excretas (4).

La criptococosis, una micosis sistémica oportunista producida por este hongo, se adquiere por inhalación de las estructuras infectantes las cuales en un paciente inmunocompetente son eliminadas por la respuesta inmune que se produce; sin embargo en un paciente inmunocomprometido (personas con enfermedades oncológicas, insuficiencia renal, diabetes mellitus, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) entre otras) el hongo se disemina principalmente por vía hematógena hacia el sistema nervioso central, su sitio anatómico predilecto.

El motivo por el que se realizó esta investigación es debido a que se desconoce si actualmente en las excretas de la población de palomas que habitan en el Hospital Nacional Rosales está presente la levadura del género *Cryptococcus neoformans*, y de esta manera establecer si se requiere la pronta implementación de un control sanitario de estas aves en la institución con el fin de disminuir el riesgo a adquirir criptococosis, siendo este nosocomio el lugar en el que consulta un número considerable de pacientes ambulatorios e internados que padecen diversas patologías, entre ellas las asociadas a

estados de inmunosupresión, que constituyen el grupo de riesgo para la infección por *C. neoformans*.

IV. OBJETIVOS

GENERAL:

Comprobar si actualmente existe la levadura capsulada *Cryptococcus neoformans* en las excretas de palomas que habitan dentro de las instalaciones del Hospital Nacional Rosales.

ESPECÍFICOS:

- Comprobar cuál es la muestra (excretas acumuladas o restos de nidos) en la que se aísla con mayor frecuencia *C. neoformans*.
- Comparar la frecuencia con la que se aísla *C. neoformans* en heces frescas/húmedas con respecto a excretas secas de las palomas.

V. HIPÓTESIS

Hipótesis de investigación:

- El aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de muestras provenientes de excretas acumuladas será diferente en comparación con las muestras obtenidas a partir de restos de nidos.
- La frecuencia con la que se aísla *C. neoformans* en muestras de heces secas será diferente comparación con aquellas que son frescas/húmedas.

Hipótesis nula:

- El aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de muestras provenientes de excretas acumuladas será igual en comparación con las muestras obtenidas a partir de restos de nidos.
- La frecuencia con la que se aísla *C. neoformans* en excretas secas será igual en comparación con aquellas muestras frescas/húmedas.

VI. MARCO TEÓRICO

La criptococosis es una micosis sistémica de evolución aguda, subaguda o crónica (6) causada principalmente por el complejo *Cryptococcus neoformans/C. gattii*, que se caracteriza por ser una levadura capsulada (19)

Su vía de entrada es respiratoria y su presentación principal es la pulmonar, aunque puede presentarse en otros órganos (ojos, próstata, huesos, riñón, hígado y articulaciones), teniendo afinidad por el sistema nervioso central, presentando diseminación en pacientes inmunodeprimidos, especialmente pacientes con virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en etapa avanzada (3).

Antecedentes históricos

En 1894, mediante los estudios realizados por el científico italiano F. Sanfelice, fundador del *Istituto di Igiene de la Università di Cagliari* en Italia, encontró en el jugo fermentado de melocotones, la presencia de una levadura capsulada, la cual, tras ensayos in vitro posteriores, demostró que en cobayos de experimentación generó una afectación cerebral, que en la actualidad se sabe bien que este hongo produce a nivel de sistema nervioso central en humanos; por tal razón le denominó: *Saccharomyces neoformans*. De manera simultánea, pero esta vez en Alemania, durante el mismo año, Otto Emil Franz Ulrich Busse y, en 1895, Abraham Buschke, notificaron, de forma independiente, el hallazgo del que al parecer era el primer caso de criptococosis con lesiones cutáneas y óseas en humanos, en este caso, una mujer. El patólogo Busse, tras la observación de las lesiones y posteriormente realizar el cultivo de la levadura, logró aislarla, y el hongo fue denominado: *Saccharomyces hominis* (3).

Posteriormente, en 1896 el científico Ferdinand Curtis, gracias al aislamiento logrado de un absceso inguinal, identificó un microorganismo al que llamó "parásito vegetal", el cual lo inoculó subcutáneamente a cierta variedad de animales de experimentación, observando que éste causaba en ellos lesiones enormes tumorales en pulmones, riñón y bazo, por lo que Curtis le llamó al agente patógeno *Saccharomyces subcutaneous tumefaciens* (3).

En los años siguientes, continuaron un sin número de aportaciones clínicas científicas que orientaban hacia lo que parecía ser un hongo más frecuente de lo que se pensaba. Ya para el año de 1901, en Francia, se verificó que este hongo presentaba características particulares, por ejemplo, éste no posee las típicas ascosporas del género *Saccharomyces*, además que no es fermentador de carbohidratos, por lo que Jean Paul Vuillemin micólogo francés, clasificó la levadura aislada en estos pacientes dentro del género *Cryptococcus*; llamó *Cryptococcus hominis* al hongo aislado por Busse, mientras que denominó *Cryptococcus neoformans* al hongo descubierto por Sanfelice (1).

El crédito de haber realizado la primera descripción de criptococosis meníngea, se le ha adjudicado al patólogo alemán David Paul von Hansemann en el año de 1905, quien logró el cultivo de la levadura a partir de este caso clínico. Pese a que años anteriores Zenter (1861) habría hecho un aporte sobre este tipo de criptococosis, no pudo respaldar sus aportes con el aislamiento del hongo, por lo cual, a Hansemann se considera el primero en haber observado la levadura capsulada en un caso criptocócico de meningitis.

Ya para el año de 1916, Stoddard y Cutler, describieron los aspectos clínicos de la enfermedad y denominaron al hongo *Torula hystolitica*, debido a que observaron una

zona lítica alrededor de los tejidos del huésped, que en realidad correspondía a la cápsula de la levadura; dicho término fue utilizado durante mucho tiempo entre la comunidad científica. Todos estos nombres que recibió el hongo crearon cierta confusión hasta que, en 1935, Rhoda Benham, micóloga estadounidense, definió los caracteres morfológicos y serológicos. Ella concluyó que todos los aislamientos humanos procedían posiblemente de una misma especie y propuso conservar el nombre de *Cryptococcus neoformans* dado por Vuillemin (3).

Chester Wilson Emmons, micólogo norteamericano, habría hecho en 1951, un aporte transcendental en la epidemiología de *Cryptococcus neoformans*, al conseguir su aislamiento ya no solo de lesiones de pacientes con cuadros clínicos criptocócicos, sino también de la tierra, de los nidos y del guano de las palomas, principalmente del género *Columba*.

En el año 1955, R. Baker y R. Haugen demostraron la presencia de la cápsula, además F. Staib en 1962 descubrió que *C. neoformans* producía colonias con pigmento café en un medio que contenía *Guizotia abyssinica*, (semilla de "negrito"), el cual es un medio de cultivo micológico ampliamente utilizado para el aislamiento del hongo. (1).

En 1970, el médico F. Gatti aisló en el líquido cefalorraquídeo de un niño de Zaire con meningoencefalitis una variedad de *Cryptococcus* a la que Vanbreuseghem le denominó *C. neoformans variedad gattii*, cuyas características morfológicas, bioquímicas, serología y epidemiológicas difieren con la variedad *neoformans*. En el año de 1990, los australianos Ellis y Pfeiffer propusieron que el nicho ecológico de *C. neoformans var. gattii* se asocia íntimamente con cierto tipo de árboles de eucalipto, especialmente de las

especies *Eucalyptus camaldulensis* y *E. tereticornis*. Actualmente, se considera a *C. gattii* como una especie independiente y, no como una variedad de *C. neoformans* (3).

Pese a que ya hace más de un siglo que el complejo *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* fue descrito por primera vez, en 1894, solo en los últimos 30 años los investigadores comenzaron a entender a este organismo tan complejo y devastador (12).

Etiología

El género *Cryptococcus* presenta dos tipos de reproducción: sexual (teleomorfa o perfecta) y asexual (anamorfa o imperfecta)

A. Reproducción sexual

Existen dos estados teleomórficos los cuales son *Filobasidiella neoformans* que se deriva de *Cryptococcus neoformans* y *Filobasidiella bacillispora* que se deriva de *Cryptococcus gattii*. El hongo se comporta como heterotálico, encontrándose dos tipos de aislamientos en la naturaleza: la variedad "α" y la "a"; más del 95% de los aislamientos clínicos corresponden a la variedad α (19).

En 1975, Kwon-Chung obtuvo por primera vez la forma sexual de *C. neoformans*, mediante la unión de cepas haploides compatibles de signo opuesto MAT^α y MAT^a usando medios naturales especiales (medio "V-8 juice agar" e incubadas a temperaturas entre 25° y 37°C) y la designó *Filobasidiella neoformans*. Un año más tarde la misma autora describió la especie *Filobasidiella bacillispora*. Esta especie se obtuvo por la confrontación de cepas compatibles de *C. gattii* (3).

Filobasidiella bacillispora difiere de *Filobasidiella neoformans* en que, la segunda produce basidiosporas de forma globosa y ovalada, de paredes rugosas, mientras que *F. bacillispora* tiene las basidiosporas alargadas o baciliformes con paredes lisas; un cruce entre el tipo de cultivo de *F. neoformans* y *F. bacillispora* produce basidios con esporas de ambas clases, pero son estériles (3).

Esta reproducción sexual se caracteriza por la formación de un micelio dicariótico con tabiques que presentan un poro central llamado doliporo y la formación de *clamp-connections*, seguido de una migración nuclear y fusión. Se produce la meiosis y esporulación con la producción de basidiosporas (3) (Ver anexo 1).

B. Reproducción asexual

C. neoformans es una levadura que se reproduce asexualmente por gemación. Sus levaduras tienen formas esféricas, ovoides y a veces de forma alargada con gemación unipolar o multipolar rodeadas de una cápsula polisacárida; ésta en el huésped infectado, puede ser muy voluminosa con un diámetro varias veces mayor que el de la misma célula (3.5 - 7 x 3.8 - 8 μm); en cambio el diámetro de la cápsula se reduce cuando se realizan cultivos sucesivos e incluso se puede llegar a perder; el hongo crece a 37°C (4).

En humanos se han informado cinco serotipos y tres variedades distintas desde el punto de vista biológico: *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipos D y AD) y var. *grubii* (Serotipo A), y *C. gattii* (serotipos B y C). Los serotipos se basan en las diferencias antigénicas de la cápsula (1).

Taxonomía

La clasificación taxonómica de las levaduras pertenecientes al género *Cryptococcus* se basa en dos fases reproductivas: la fase perfecta o teleomorfa en donde se forman basidiosporas, y una fase anamorfa o imperfecta con formación de levaduras

La clasificación es la siguiente:

- Reino: Fungi
- Phylum: Basidiomycota
- Orden: Tremellales
- Familia: Tremellaceae
- Género: *Cryptococcus*
- Especies: *C. neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. gattii*, *C. albidus*, *C. laurentii* y aproximadamente, otras 35 especies más que continuamente se están reclasificando.

Formalmente se reconoce a *C. neoformans* y *C. gattii*, como los agentes etiológicos de la criptococosis en mamíferos (6).

Hábitat y fuentes de infección

El hábitat de *C. neoformans* es muy conocido desde sus primeros aislamientos, a partir de algunas frutas como duraznos y peras; también se ha aislado de la leche y de los lugares relacionados con la ordeña. La presencia de *C. neoformans* en la leche y productos lácteos no origina un foco de infección para el ser humano, porque se sabe que a temperatura de 45°C el microorganismo muere, lo que indica que el proceso de pasteurización es suficiente para erradicarlo (4)

Cryptococcus neoformans var. *neoformans* y *grubii* (serotipos D y A) presentan una distribución mundial amplia y se han aislado de diversas fuentes, como son: suelo, raíces de vegetales, frutas, madera (detritus) y principalmente de desechos aviarios de pericos, loros, canarios y en especial de las palomas (*Columba livia*) por tanto, es habitual el aislamiento en palomares, atrios de iglesias, edificios viejos o abandonados, entre otros lugares. Las palomas y diversas aves se convierten en reservorios o vectores indirectos que mantienen al microorganismo, pero no adquieren la enfermedad; esto se ha atribuido, entre otras cosas, al estado inmune y a su temperatura corporal que es de 40 a 42°C, a la cual *C. neoformans* se puede reproducir, pero es poco virulento; la presencia de esta levadura en las aves se cree que se mantiene de manera similar a la de *Histoplasma capsulatum* en los quirópteros, es decir, provoca una infección asintomática en el intestino, por lo que el guano sale infestado del hongo y se puede mantener en el ambiente, en especial si persiste cierta humedad (4). El guano de las aves proporciona el medio ideal para el desarrollo de *C. neoformans* debido a su alcalinidad y a una elevada concentración de nitrógeno y creatinina. Las levaduras pueden mantenerse viables en excremento de palomas por un periodo largo de tiempo, incluso años si está protegido de los rayos del sol (3).

Mientras, para *Cryptococcus gattii* se determinó que su hábitat son los eucaliptos; estos últimos juegan un papel importante en su ciclo de vida, en particular en su forma teleomórfica (*Filobasidiella*), pues el hongo llega a infectar sus semillas y mantenerse por mucho tiempo en latencia. Se ha aislado de manera especial en las variedades *Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus tereticornis*, entre otros, y también de almendros como *Terminalia catappa* (4).

La relación que presenta *Cryptococcus gattii* con los árboles lo hace mostrarse como un hongo epífito (tizón), es decir, que su reproducción está íntimamente ligada al desarrollo y ciclo de vida de la planta; Xue *et al.*, han comprobado que *Cryptococcus gattii* completa su ciclo sexual durante una asociación patogénica con diversas plantas. La degradación de productos arborícolas es debida a la lacasa la cual degrada la lignina que es una sustancia natural que forma parte de la pared celular de muchas células vegetales, a las cuales da dureza y resistencia (4).

Autores como Steenbergen *et al.*, presentaron un estudio que ha dado nueva información sobre el hábitat y mantenimiento de la virulencia de *C. neoformans*, descubrieron que algunas amebas y nemátodos del suelo, como *Acanthamoeba castellanii* y *Caenorhabditis elegans*, pueden fagocitar las levaduras, y éstas mantenerse en ambos organismos, desarrollando cápsula y produciendo fosfolipasas, ureasa y melanina; este fenómeno indica que tanto amebas como nemátodos llegan a ser reservorios, y sobre todo que hacen que las levaduras mantengan sus factores de virulencia actuando como lo harían los macrófagos (4).

Epidemiología

La criptococosis es una enfermedad cosmopolita; en cambio, los agentes etiológicos y sus variedades tienen localizaciones definidas, por lo que tenemos que las variedades *neoformans* y *grubii* de la especie *C. neoformans* son las que tienen mayor distribución; la primera se da más en climas templados (serotipo D), y la segunda en países de Europa y resto del mundo (serotipo A) con climas variados. La especie *C. gattii* predomina en zonas tropicales y subtropicales; en Australia y el sur de California (serotipos B y C) y en el resto del mundo sólo el serotipo B, en especial en la Columbia

Británica (Canadá), la costa noroeste (Washington y Oregón) de Estados Unidos; en Latinoamérica (Argentina, Brasil, Colombia, México, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela (4).

C. neoformans es responsable de la mayoría de casos de criptococosis en pacientes inmunodeprimidos, mientras que *C. gattii* se le ha asociado con individuos que presentan un estatus inmunológico normal (3).

La criptococosis se presentaba en un 6 a 13 y hasta 50% de los pacientes con VIH en etapa avanzada; era la cuarta infección más importante en infectados por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); después de la terapia antirretroviral muy activa se ha disminuido a cifras de 0.2 a 0.9 casos por 100,000 habitantes. En África, junto con la tuberculosis, es la infección oportunista más importante especialmente en el SIDA, pero muchos casos se han informado mediante los registros nacionales en Francia y Atlanta (1).

Factores predisponentes

La incidencia de criptococosis ha mostrado un comportamiento ascendente en los últimos años, debido al aumento en el número de personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) además, del uso cada vez más frecuente de terapias inmunosupresoras, lo cual trae como consecuencia la vulnerabilidad de dichos individuos inmunocomprometidos para adquirir la infección micótica producida por un patógeno oportunista, la criptococosis (10).

Actualmente, son varios los procesos patológicos que se aceptan como factores o situaciones de riesgo para la criptococosis, entre ellos se pueden mencionar:

- A. Antecedente de infección por VIH.
- B. Uso de esteroides.
- C. Enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso y artritis reumatoidea.
- D. Neoplasias malignas.
- E. Trasplantes.
- F. Diabetes mellitus.
- G. Cirrosis hepática.
- H. Falla renal crónica.
- I. Causa no establecida.

Cada uno de los factores antes mencionados, han sido citados de acuerdo a un orden de mayor a menor, con respecto al nivel de frecuencia con la que se asocian al desarrollo de pacientes que han presentado criptococosis; tales datos han sido obtenidos tras estudios realizados en países americanos (21).

Diversos estudios, advierten además que existen también otros factores asociados con el desarrollo de la infección micótica, además de los mencionados, entre ellos están: tabaquismo, diálisis peritoneal, uso de anticuerpos monoclonales, malnutrición, síndrome de Cushing, sarcoidosis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (21).

Estudios recientes, hechos por investigadores cubanos, mencionan que la criptococosis se considera la infección fúngica más común (6%) en pacientes con trasplante de órgano sólido después de candidiasis (68%), y aspergilosis (23%). Ocurre

exclusivamente en el período postrasplante, transcurrido 6 meses de haber iniciado el tratamiento inmunosupresor. Las micosis oportunistas son una causa importante de morbilidad-mortalidad entre los pacientes con inmunosupresión relacionada con el trasplante de órgano sólido. Las infecciones son particularmente severas en el desarrollo de los primeros meses postrasplante; porque es una consecuencia inevitable de la inmunosupresión (17).

Patogenia

En la criptococosis, la vía de entrada es casi siempre respiratoria a través de la inhalación de propágulos, los cuales pueden estar compuestos de las levaduras, fragmentos de micelio o pseudomicelio, y esporas (basidiosporas) de su fase teleomórfica; cualquiera de estas estructuras llega hasta los alvéolos, atravesando las vías respiratorias, para generar el primo contacto pulmonar (4). La respuesta inmunitaria es iniciada por los macrófagos y los linfocitos CD₄₊ y CD₈₊. La presencia de linfocitos CD₄₊ es crucial para el éxito de la defensa en personas inmunocompetentes, pero los linfocitos CD₈₊ pueden participar en la activación de citocinas con un efecto anticriptocócico el cual es un factor fungistático (1). Sin embargo, hay reportes de casos cutáneos primarios que se inician por la inoculación a través de una solución de continuidad. *C. neoformans* también puede ingresar por vía oral (frutos, leche), pero la lisozima salival y el pH ácido del estómago lo inactivan la mayoría de las veces (4).

C. neoformans prolifera con rapidez si no existe una adecuada defensa celular, si el proceso infeccioso no se detiene, los microorganismos se diseminan con facilidad por vía linfática y hematógena, especialmente hacia el sistema nervioso central (SNC), en donde el líquido cefalorraquídeo (LCR) es más deficiente en el factor anticriptocócico,

por lo cual pueden evadir con habilidad la respuesta inmune; de hecho, la predilección por el SNC y su fácil diseminación a éste, han sido ampliamente estudiadas por diversos grupos. Se ha comprobado que las levaduras pueden atravesar las paredes de los capilares sanguíneos cerebrales, es decir, que traspasan fácilmente la barrera hematoencefálica; para esto es fundamental la acción de la ureasa, la cual se considera su mayor factor de virulencia (4). La ureasa además de contribuir al paso de estas levaduras a través de la barrera hematoencefálica desempeña un papel importante en el aumento del pH fisiológico debido a la hidrólisis de la urea, con la consecuente producción de iones amonio, favoreciendo así la supervivencia de la levadura in vivo (16).

En 10% de los afectados ocurre diseminación hematógena, principalmente en sujetos debilitados, en particular con SIDA por la falta de inmunidad celular eficaz (linfocitos CD4 <100). Puede afectar cualquier órgano, de preferencia el cerebro y las meninges; se cree que esta afinidad se debe a la baja respuesta fagocítica y presencia de factores nutricionales en esos órganos o a la ausencia de factores inhibitorios séricos. En las últimas etapas de fungemia, puede haber criptococomas en los pulmones y el cerebro. Las lesiones en la piel tal vez precedan hasta por 2 a 8 meses a las manifestaciones sistémicas (1).

Una segunda vía comprobada que tiene *C. neoformans* de llegar al SNC, es a través del denominado “mecanismo del caballo de Troya”, en donde las levaduras aprovechan especialmente los monocitos, para atravesar de la sangre al cerebro, como auténticos “pasajeros”. Una vez ubicados los microorganismos en el SNC, generan lesiones que se desarrollan en las meninges y afectan los nervios craneales, tallo cerebral

y cerebelo; el cuadro provocado es, en general, de una meningitis crónica. A partir de este foco puede diseminarse hacia otros órganos como vísceras, piel y huesos (4).

Es preciso resaltar que *C. neoformans* actúa como un clásico hongo patógeno oportunista, que requiere de condiciones especiales del huésped, mientras que *C. gattii* es un patógeno primario, que puede afectar tanto a pacientes inmunocompetentes como inmunosuprimidos (4).

C. neoformans (var. *neoformans* y *grubii*) y *C. gattii* tienen una serie de factores de virulencia que favorecen el desarrollo y establecimiento de la enfermedad; dentro de los tres más importantes o factores mayores se encuentran: la cápsula, síntesis de la enzima fenoloxidasa (lacasa) que es responsable de la producción de melanina (in vivo) y la ureasa. Así mismo tienen gran importancia diversas enzimas: fosfolipasas, proteasas y superóxido dismutasa, así como la capacidad de adaptación o conexión celular (switching), estabilidad térmica y la producción de manitol (4).

La cápsula está constituida por polisacáridos, el glucoronoxilmanano (xilosa, manosa y ácido glucoronido) su aumento se ve favorecido por varias condiciones, como incremento de CO₂, presencia de iones hierro y pH alcalino; su función básica es evadir o retrasar la respuesta inmune (4). Los mutantes hipocapsulados o acapsulados son menos virulentos, así como los que carecen de actividad fenoloxidasa. Los mutantes que no crecen a 37° C son avirulentos, de hecho, *Cryptococcus gattii* es más sensible a altas temperaturas que la especie *C. neoformans* (1)

La producción de melanina y el crecimiento a 37° C son factores de virulencia que también disminuyen el complemento y la respuesta de anticuerpos, alteran la producción de citocinas, interfieren con la presentación de antígenos, y tienen toxicidad local (1).

La melanogénesis a partir de 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) es realizada por la enzima difenoloxidasa, que por oxidación convierte las catecolaminas (difenoles) tales como la L-Dopa en dopaquinona, siendo este el paso limitante; puesto que presumiblemente los siguientes pasos en la vía, tales como el rearreglo de dopaquinona a dopacromo y finalmente la autopolimerización a melaninas, son espontáneas. La melanina es un polímero que se deposita en la pared celular y que contribuye a la virulencia. (Ver anexo 2). En el año 2002, Vidotto y cois, observaron que un aumento en la concentración de potasio (K⁺) inhibe la actividad de la enzima fenoloxidasa tanto en las cepas de origen humano como en las de origen aviar. Sin embargo, los cationes Fe²⁺ y Cu²⁺ aumentan la actividad fenoloxidasa de *Cryptococcus neoformans* (18).

Esta enzima es inhibida en las células de los mamíferos por las concentraciones bajas de glucosa. Sin embargo, la fenoloxidasa de *C. neoformans* es dependiente del hierro, lo cual le permite ser activa en condiciones bajas de glucosa, siendo por tanto el encéfalo el marco ideal de actuación (18).

Esta enzima puede utilizar otros sustratos fenólicos como la adrenalina; esta capacidad quizá proteja la levadura en el sistema nervioso central y explique su virulencia o neurotropismo (1).

Aspectos clínicos

Clasificación de criptococosis:

- Pulmonar
- Del sistema nervioso
- Cutánea
- Ósea
- Ocular
- Diseminada

La afección pulmonar es una entidad clínica que generalmente cursa de forma asintomática y subclínica, y sólo se puede detectar mediante correlación de cambios radiológicos sugestivos y serología, a través de la detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFA). Los pocos casos sintomáticos se manifiestan desde estadios leves hasta graves, según el estado inmune del paciente. La enfermedad casi siempre se localiza de manera bilateral confinada al lóbulo superior; sin embargo, hay casos unilaterales (3). Las manifestaciones clínicas que presenta la criptococosis leve pulmonar se manifiestan con tos seca; en ocasiones hay expectoración, hemoptisis, dolor torácico y fiebre. En casos graves se produce síndrome de dificultad respiratoria. El agente etiológico se disemina hacia cualquier órgano, en especial el sistema nervioso central (SNC) (60% en pacientes con SIDA), hígado, riñón, próstata, huesos o articulaciones y ojos (1).

En el SNC la criptococosis se puede presentar en tres formas: meningitis, meningoencefalitis y criptococomas.

Meningitis

Esta es la variedad clínica que con más frecuencia se reporta, su manifestación puede ser subaguda, crónica y gradual; la mayoría de las criptococosis que se diagnostican son meníngeas, y en ésta, las condiciones del LCR son muy específicas; en un inicio es un fluido casi normal, pero en casos crónicos sus características cambian (Ver cuadro 1). Inicia con cefalea intensa o frontal (este síntoma es el más constante y está entre 85 a 100% de los casos), así como dolor retroocular; hay fiebre constante pero no intensa (38°C). Los signos de meningitis crónica están presentes: rigidez y dolor de cuello, además, los signos de Kerning y Brundzinski son positivos. Conforme el padecimiento se hace crónico, el enfermo presenta vómito constante, vértigo, delirio, alucinaciones, irritabilidad y cambios de personalidad; convulsiones jacksonianas (crisis epiléptica) y pérdida temporal de la memoria. En algunos casos hay compromiso oftálmico en forma de neurorretinitis y por la misma afección neuronal se presentan fotofobia, estrabismo, diplopía y nistagmo. La meningitis criptococósica toma un rumbo crónico dependiendo de las condiciones del paciente, con reportes de cronicidad de hasta 20 años. Cuando el padecimiento progresa con rapidez, el ataque al estado general es severo; se manifiesta con gran pérdida de peso, astenia y adinamia, dando paso al coma y por lo regular el paciente muere por insuficiencia respiratoria. Cuando los casos son ocasionados por *C. gattii*, las secuelas neurológicas asociadas son mayores aún y requieren de un agresivo manejo neuroquirúrgico (4).

Cuadro N° 1.

Características del LCR en casos de criptococosis crónica.

Características del LCR	Parámetros
Turbidez	Presente
Hipoglucorraquia	Alrededor de 10 mg glucosa/100 ml
Hiperproteíorraquia	Entre 50-600 mg proteínas/100 ml
Aumento de densidad	Entre 1 006-1 800 unidades
Aumento de celularidad	Aproximadamente 800 células/ml

FUENTE: Bonifaz A. Micología médica básica 4ª ed. Criptococosis.

Meningoencefalitis

Entidad clínica rara, la mayoría de las ocasiones de curso agudo y fulminante; se presenta en pacientes con inmunodepresión severa, como aquellos sometidos a intensa terapia inmunosupresora (trasplantes) o con VIH en etapa avanzada. El enfermo presenta todos los síntomas y signos de una meningoencefalitis aguda y de inmediato cae en coma, fallece en un término de 2 a 3 días (4).

Criptococomas

Entidad rara, aunque son más frecuentes cuando son ocasionados por *C. gattii*; se conforman por masas fúngicas que se desarrollan en el cerebro en forma de abscesos y que habitualmente se confunden con neoplasias (4).

Los pacientes en un inicio presentan cefalea, náuseas, vómito y convulsiones de tipo jacksoniano; la compresión cerebral y medular genera diversas manifestaciones

oftálmicas, hemiplejía y hemiparesia. El curso de esta variedad también es grave y migra fácilmente al coma, paro respiratorio y muerte (4)

Cutánea

La criptococosis en la piel se presenta con lesiones cutáneas debido a diseminación, estas lesiones pueden ser variables, lo que incluye pápulas, placas, púrpura, vesículas, lesiones semejantes a tumores y exantemas. El espectro de la criptococosis en pacientes infectados con VIH es variado y ha cambiado mucho desde el advenimiento del tratamiento antirretroviral, por lo que ya no es pertinente la distinción entre criptococosis relacionada y no relacionada con VIH. En pacientes con SIDA y en receptores de trasplantes de órganos sólidos, las lesiones cutáneas de la criptococosis a menudo simulan las del molusco contagioso (17).

Criptococosis ósea

Es una entidad clínica más o menos frecuente y se calcula que en promedio 10% de los casos de criptococosis tienen afección ósea. Se origina a partir de focos pulmonares o meníngeos; tiene una predilección en orden decreciente por huesos largos (fémur, tibia, esternón, entre otros.), huesos craneales y vértebras. Afecta también las articulaciones. Las lesiones más comunes son de periostitis, osteofibrosis y, sobre todo, francas zonas de osteólisis; en este último tipo de lesiones se llegan a originar fístulas que salen a piel y drenan un material seropurulento mucoso. La sintomatología más frecuente es de intenso dolor óseo y artralgias (4).

Criptococosis ocular

Es una entidad rara; la mayoría de los casos oculares son consecuencia de diseminación del padecimiento. Se presenta en general con papiledema, parálisis motora y coriorretinitis. Los casos con edema papilar casi siempre son consecuencia de la diseminación del cuadro meníngeo, por el aumento de la presión intracraneal (4).

Criptococosis diseminada

Se observa en pacientes severamente inmunosuprimidos o en estados pre mortem. *C. neoformans* y *C. gattii* pueden invadir casi todos los órganos, sobresaliendo hígado, intestino, bazo, corazón, próstata, testículos, entre otros; en todos los niveles se observan lesiones granulomatosas y de aspecto gelatinoso (4).

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la criptococosis se basa en evidenciar las levaduras capsuladas del hongo, a través del examen directo, aislamiento por cultivo, pruebas bioquímicas y fisiológicas que permitan su identificación.

Muestras clínicas

La muestra dependerá del tipo de criptococosis que se curse, por lo que se tiene: esputo, lavado bronquial, líquido cefalorraquídeo (LCR), exudados, tejidos, orina entre otras (1, 4).

Otro tipo de muestra que se puede procesar no específicamente para el diagnóstico de la enfermedad, sino para el aislamiento del agente causal a partir de su hábitat, son las muestras ambientales, éstas varían de acuerdo a la especie de

Cryptococcus que se desee aislar; tomando en cuenta que las especies *C. neoformans* y *C. gattii* son las más comúnmente asociadas a enfermedades humanas, se tiene así dos tipos de muestras ambientales, el guano de palomas en el caso de *C. neoformans* y detritus vegetales para aislamiento de *C. gattii* (2, 3, 7, 9,15, 16, 18, 20).

Examen directo

- Examen directo con tinta china:

Es el método más sencillo de realizar; consiste en poner una gota de fluido (LCR, suero, orina) previamente centrifugado o porción de colonias a partir de un cultivo aislado de muestras ambientales, sobre una lámina portaobjeto, y a ésta adicionarle una gota de tinta china diluida con agua destilada (1:5), colocarle una lámina cubreobjeto y observar al microscopio. El objetivo es crear una tinción de contraste que permita resaltar la cápsula del microorganismo (4). La levadura aparece sobre un fondo oscuro envuelta de una zona no teñida o halo claro que rodea el cuerpo de ésta, que no es más que la cápsula (3). Es importante buscar levaduras gemantes, aunque también pueden observarse pseudohifas (4).

Cultivos

Los medios de cultivos más útiles son agar glucosado de Sabouraud, agar semilla de girasol y agar extracto de levadura; el hongo crece en 2 a 3 días y cuya temperatura óptima es de 37°C, sin embargo, también puede crecer a 25°C (3). No se debe utilizar agar MycoCel porque la cicloheximida (actidiona) inhibe a *Cryptococcus neoformans*/ *C. gattii* (4) Es importante mencionar que, en caso de procesar muestras de origen ambiental, como excretas de palomas o detritus vegetales, se debe hacer un tratamiento

previo a la muestra con antibióticos, con el fin de garantizar la eliminación de contaminación bacteriana acompañante que pueda estar presente.

Estos agentes etiológicos utilizan la enzima fenoloxidasa, por lo que el medio Agar semilla de girasol es una herramienta útil que permite evidenciar la presencia de esta enzima, ya que éste proporciona el ácido cafeínico, que actúa como sustrato para la fenoloxidasa, produciendo así melanina. Estos productos fenólicos hacen que las colonias adopten un color marrón a pardo, que permite diferenciarlas de otras levaduras como *Candida spp* (3).

Además, otro procedimiento de laboratorio del que se hace uso para la identificación del género es la prueba de hidrólisis de la urea. Para ello, la ureasa, una metaloenzima, cataliza la hidrólisis de la urea a amonio y carbamato. La actividad de esta enzima se puede detectar en el medio Agar urea de Christensen a través de un cambio de color en el indicador rojo fenol de amarillento a rosado, lo que representa una reacción positiva debido a la alcalinización del medio mediante la producción de amoníaco; el género *Cryptococcus* se caracteriza por ser ureasa positiva (3,18).

Pruebas para diferenciar entre especies: *C. neoformans* y *C. gattii*

C. gattii es resistente a la L-canavanina y, a diferencia de *C. neoformans*, puede asimilarla; por lo que al sembrarse en agar canavanina-glicina-azul de bromotimol sódico (CGB), ocurre un cambio de color del medio: de amarillo oro al azul cobalto, mientras que dicho cambio no se observa en colonias de *C. neoformans* (1)

Histopatología

Tejido obtenido por biopsia, es útil sobre todo para los casos cutáneos, donde se presenta por lo regular una reacción inflamatoria crónica constituida por abundantes células gigantes, linfocitos y eosinófilos. Las levaduras se distinguen con facilidad con tinciones de hematoxilina y eosina, Ácido Peryódico de Schiff (PAS) o mucicarmín de Mayer (4).

Pruebas inmunológicas

Se han probado muchas y muy diversas, pero ninguna con resultados satisfactorios en su totalidad. La prueba que resulta más útil para el diagnóstico es la determinación del antígeno criptocócico más frecuente en cápsula de *C. neoformans* y *C. gattii*, es la del glucorono-xilomanano (GXM) en LCR o suero; se hace por aglutinación directa de partículas de látex revestidas por anticuerpos anticápsula (DACAD) (4)

Esta prueba, tiene una sensibilidad muy alta (> 90%), sin embargo, puede tener reacciones cruzadas con el factor reumatoideo o infecciones por *Trichosporon spp* (4).

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio:

Esta investigación fue de tipo experimental, transversal, prospectiva y descriptiva.

Población y muestra:

El universo y muestra del presente proyecto de investigación fueron todas las excretas de palomas que se encontraron acumuladas dentro de las instalaciones del Hospital Nacional Rosales.

Fuente y procedimiento de obtención de datos:

Los datos del estudio se obtuvieron a través del procesamiento de muestras de excretas de palomas, auxiliándose para ello de procedimientos de laboratorio, tales como: cultivo micológico, pruebas fisiológicas y preparaciones al fresco a partir de cultivos.

Observaciones sobre el proceso:

Se identificó en las instalaciones del hospital aquellas zonas que cumplían con el criterio de inclusión tomado, el cual fue la presencia de excretas acumuladas que podrían albergar a la levadura.

Para la recolección de las muestras se identificaron 4 zonas (área administrativa, servicio 2º medicina interna hombres, edificio de consulta externa y torre de comité gestor de camas) (ver anexo 3), dentro de las instalaciones del hospital, estas áreas comprendían bodegas, escaleras, techos y pasillos en donde las excretas de palomas se encuentran expuestas a condiciones medioambientales variables (Ver anexo 4). Las

muestras recuperadas fueron clasificadas en excretas acumuladas y restos de nidos; además, estas muestras podían presentar una o más de las siguientes características: heces frescas/húmedas o secas, con o sin alta exposición a la luz solar; todo con el fin de evaluar si las condiciones ambientales favorecen la existencia de *C. neoformans* (2); esta información fue recolectada utilizando un instrumento de clasificación de muestras (ver anexo 5)

Las excretas de palomas fueron recolectadas utilizando espátulas de latón, raspando el área seleccionada con el fin de obtener la mayor cantidad de muestra posible (Ver anexo 6), haciendo uso del equipo de protección personal: gabacha, guantes, mascarilla (N95), gorro y gafas protectoras (2). Cada muestra colectada fue depositada en una bolsa de polietileno de cierre hermético previamente rotulada con un número de identificación asignado. Posteriormente, las muestras fueron transportadas, cumpliendo el triple embalaje, hacia el laboratorio del departamento de Microbiología de la facultad de Medicina en la Universidad de El Salvador, donde se procesaron de acuerdo con el protocolo de identificación micológico establecido (ver anexo 7).

El procesamiento inicial de las muestras consistió en la eliminación de cualquier contaminación bacteriana acompañante, para ello se realizó una suspensión de 10 gramos de la muestra en un Erlenmeyer con 30 ml de solución salina al 0.85% estéril con una combinación de antibióticos (Estreptomicina y Penicilina). A continuación, se colocaron los frascos que contenían la suspensión en un rotador para homogenizar durante 30 minutos (ver anexo 8), luego se dejó reposar durante aproximadamente 45 minutos (19). Posteriormente se procedió a inocular 3 placas (A, B y C) de Agar Semilla de Girasol (ASG) más cloranfenicol por muestra, utilizando 100 µl de sobrenadante por

placa; incubando cada una a 37° C en un tiempo de 3 a 7 días, haciendo observaciones diarias y registrando el desarrollo de cada cultivo (2).

Cabe destacar que, para garantizar el aislamiento adecuado del hongo, se realizó a los medios de cultivo, previo a la inoculación de las muestras, un control de funcionalidad, haciendo uso de cepas conocidas de *C. neoformans* proporcionadas por el departamento de Microbiología de la facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador, obteniendo resultados favorables que garantizó el correcto funcionamiento del medio de cultivo (ver anexo 9).

Identificación de *Cryptococcus neoformans*

En el agar semilla de girasol, un medio diferencial, el crecimiento de *Cryptococcus neoformans/C. gattii* se desarrolla en forma de colonias brillantes u opacas, cremosas de color marrón (2); a todas aquellas muestras que presentaron colonias que cumplían con estas características se les realizó un aislamiento en una segunda placa de agar semilla de girasol para la obtención de un cultivo puro (ver anexo 10). A estos aislamientos se les hizo 2 suspensiones, una con lactofenol azul algodón y otra con tinta china negra diluida 1:5 (2), todo esto para la comprobación de morfología microscópica (ver anexo 11). A continuación, se procedió a realizar un repique de la colonia sospechosa en Agar Glucosado de Sabouraud para la posterior realización de la prueba de hidrólisis de la urea (ver anexo 12) con la que se confirma el género *Cryptococcus*, que da como resultado prueba de ureasa positiva (ver anexo 13) (2). Por epidemiología se conoce que el hábitat de *C. neoformans* está relacionado al guano de aves, en especial palomas

(*Columba livia*) y siendo ésta la muestra procesada se concluye que todos los aislamientos corresponden a *C. neoformans*. Para materiales y reactivos, ver anexo 14.

Presentación de resultados

Para la presentación de los datos obtenidos en la investigación se hace uso de tablas y gráficos que reflejan de forma clara y sencilla los resultados encontrados.

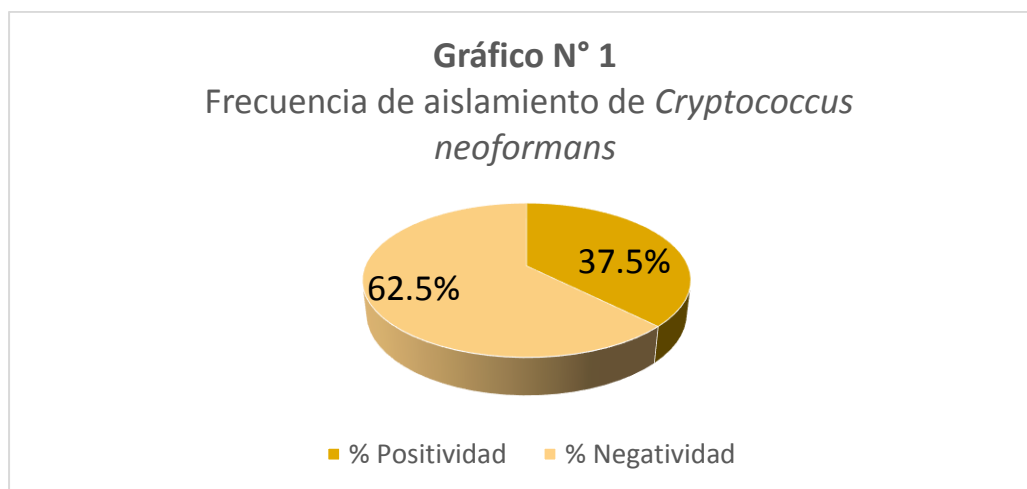
En lo relacionado a la comprobación de hipótesis, se hizo uso de estadística descriptiva, aplicando el estadístico de prueba no paramétrico Chi cuadrada (X^2) utilizando el software Epi Info para la ejecución de ésta.

Delimitación tiempo-espacio

El estudio se llevó a cabo en el período comprendido entre los meses de junio a julio de 2018.

VIII. RESULTADOS

Se recolectó y procesó un total de 16 muestras correspondientes a 4 zonas dentro de las instalaciones del Hospital Nacional Rosales, en 6 se logró aislar *C. neoformans*, constituyendo así un 37.5 % de positividad total (Ver gráfico 1)



Las zonas dentro del Hospital Nacional Rosales en las que se aisló *C. neoformans* fueron: área administrativa y área de consulta externa (Ver tabla 1). Siendo entonces el porcentaje de positividad de 66.6% (4 muestras) y 33.3% (2 muestras) respectivamente (Ver gráfico 2).

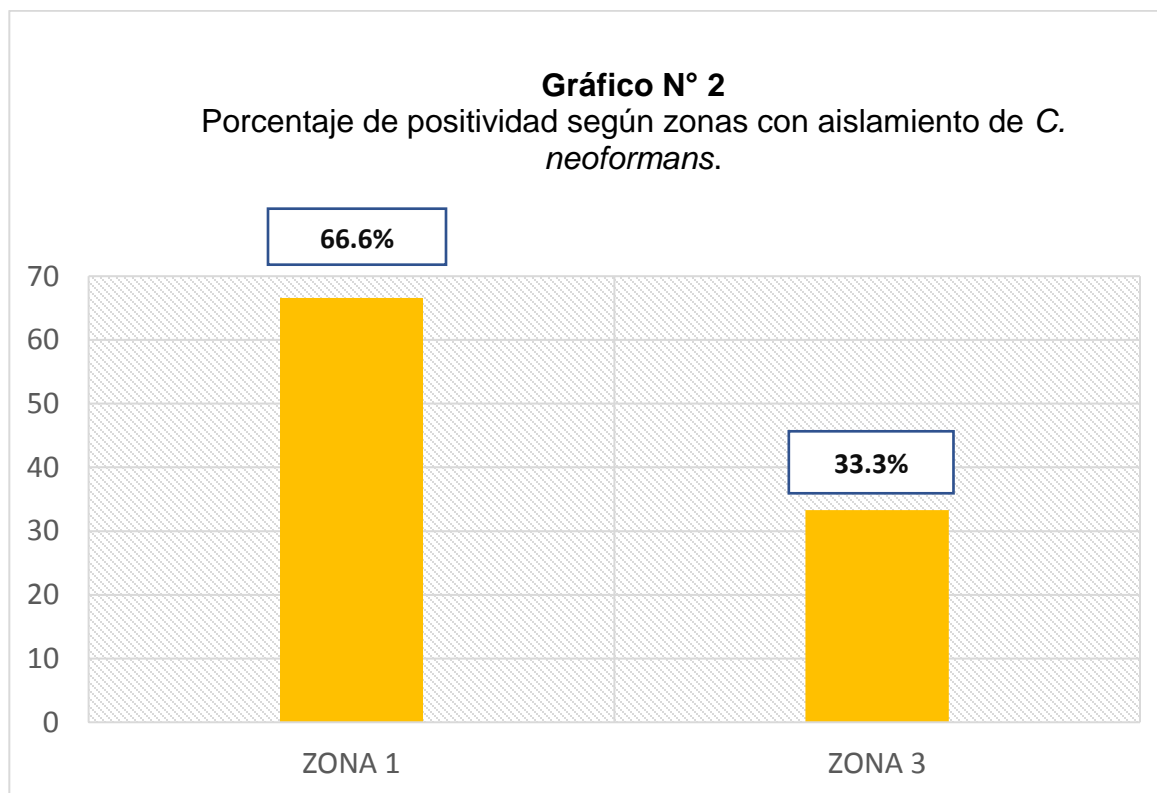
Tabla N° 1

Positividad a *Cryptococcus neoformans* de acuerdo con su distribución por zonas

Zona	N° de muestras	Muestras positivas
Área administrativa	10	4
Servicio de 2° MI hombres	2	0
Consulta externa	3	2
Torre comité gestor de camas	1	0
TOTAL	16	6

Gráfico N° 2

Porcentaje de positividad según zonas con aislamiento de *C. neoformans*.



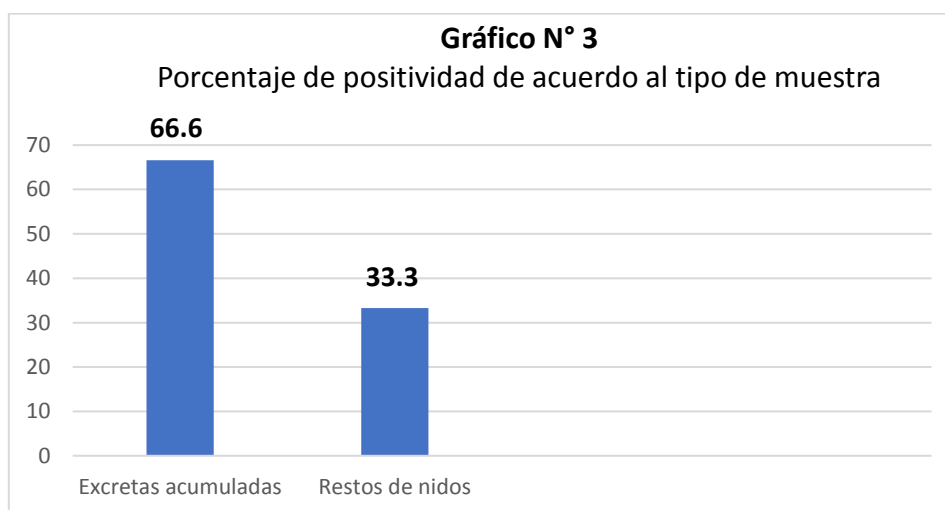
Según la clasificación de muestras, 11 fueron recuperadas a partir de excretas acumuladas y 5 provenientes de restos de nidos. Cada muestra cumplía con diferentes características, las cuales son detalladas en la tabla 2.

Tabla N° 2

Características de las muestras colectadas

Tipo de muestra	Condiciones de la Mx		Subtotal
	Secas	Frescas/Húmedas	
Excretas acumuladas	9	2	11
Restos de nidos	5	0	5
Total	14	2	16

Con lo que respecta a la positividad del tipo de muestra, se obtienen los siguientes resultados: 4 de las 6 muestras positivas eran provenientes de excretas acumuladas constituyendo así un 66.6% del total de positividad, y el restante 33.3% corresponde a restos de nidos (2 de las 6 muestras positivas) (Ver gráfico 3).



Al aplicar el estadístico de prueba Chi cuadrada (X^2), para determinar si existe diferencia estadística significativa respecto a la frecuencia de aislamiento de *C. neoformans* de acuerdo con el tipo de muestra, el resultado obtenido fue de 0.020 para un valor crítico de 3.84 (Ver tabla 3).

Tabla N° 3

Frecuencia en el aislamiento de *Cryptococcus neoformans* con respecto al tipo de muestra.

	+ <i>C. neoformans</i>	- <i>C. neoformans</i>	Sub Total
Material de nidos con excretas	2	3	5
Excretas Acumuladas	4	7	11
TOTAL	6	10	16

$$X^2 = 0.020$$

En cuanto a la exposición a la luz solar de las muestras recolectadas, 5 presentaban tiempos variables de exposición durante el día (ver tabla 4)

Tabla N°4

Muestras con exposición a rayos solares

Número de muestras	Tiempo de Exposición	Muestras positivas
3	De 2 a 3 horas	2
2	De 6 a 8 horas	0
Total: 5		2

Al comparar la frecuencia de aislamiento en excretas con características de ser frescas/húmedas respecto a las secas se obtiene lo siguiente: ninguna de las 2 muestras frescas resultó positivas para *C. neoformans*, mientras que, en 6 de 14 muestras secas se logró aislar el microorganismo. El valor de Chi cuadrada (X^2) fue de 1.37 para un valor crítico de 3.84 (Ver tabla 5).

Tabla N° 5

Frecuencia en el aislamiento de *C. neoformans* con respecto a las características de la muestra.

	+ <i>C. neoformans</i>	- <i>C. neoformans</i>	Sub Total
Muestras Frescas/húmedas	0	2	2
Muestras Secas	6	8	14
TOTAL	6	10	16

$X^2 = 1.37$

IX. DISCUSIÓN

La levadura capsulada de *Cryptococcus neoformans* posee una amplia distribución mundial, cuyo hábitat está ligado a las aves, primordialmente palomas *Columba livia*, puesto que es a partir de las excretas de éstas donde se aísla con mayor frecuencia en la naturaleza (16)

Se recolectó un total de 16 muestras de excretas de palomas provenientes de 4 áreas diferentes dentro de las instalaciones del Hospital Nacional Rosales, que corresponden a: área administrativa (zona 1), servicio de 2ª Medicina Interna Hombres (zona 2), edificio de consulta externa (zona 3), torre de comité gestor de camas (zona 4) (ver anexo 3). De acuerdo con esta distribución, se obtuvo el siguiente número de muestras correspondiente a cada zona respectivamente: 10, 2, 3 y 1. Todas las zonas cumplían con el criterio de inclusión de la investigación, por lo que la cantidad de muestras por zona dependió exclusivamente de éste (ver tabla 1).

En el presente trabajo se obtuvieron 6 muestras positivas, que corresponde a un 37.5% de aislamiento de *C. neoformans*, un resultado comparable con el logrado en 2011 por Chavarría *et al.* en diversos lugares de El Salvador (2), el cual fue de 36.5%; cabe destacar que en ese estudio se procesaron 2 muestras recolectadas de las instalaciones del HNR y una de ellas fue positiva al aislamiento de esta levadura. Además, un estudio reciente sobre este mismo tema es el realizado en Colombia por Vallejo *et al.* en el año 2016, en el que obtuvo un porcentaje de positividad del 26.56% (20). Sin embargo, el porcentaje de positividad obtenido en la presente investigación es 3 veces mayor al obtenido en el estudio realizado por Curo *et al.* en Perú durante el 2002 que fue de 12.5%,

este resultado probablemente sea debido a que en esa investigación los autores incluyeron como muestras no solo excretas de palomas, sino también, de ambiente aéreo y suelo de palomares (7).

Es importante mencionar que, del total de muestras positivas obtenidas (6 muestras), 4 de éstas (66.6%) provienen del área administrativa (Zona 1) y el restante 33.3% (2 muestras) del área de consulta externa (zona 3) del HNR, lo que refleja el riesgo que representa la zona 1, al poseer un elevado porcentaje de positividad a *C. neoformans*. En el trabajo de Chavarria *et al.*, no se especifica las zonas del hospital de donde obtuvieron sus muestras, por lo que no es posible determinar si la muestra que resultó ser positiva en esa ocasión, se encontraba dentro de las zonas muestreadas en el presente estudio (ver gráfico 2).

Con relación a la muestra en la que con mayor frecuencia se aísla *C. neoformans*, se obtuvo un 66.6% del total de positividad, en muestras correspondientes a excretas acumuladas, y el restante 33.3% de restos de nidos, para lo cual se determinó que no existe una diferencia estadística significativa al obtener un valor de 0.020 para chi cuadrada entre los dos tipos de muestra estudiados. Este resultado indica que la posibilidad de recuperar a la levadura es igual independientemente de qué muestra se trate.

Del total de muestras procesadas (16 muestras), 2 eran muestras frescas/húmedas, y 14 eran muestras secas. Todas las muestras húmedas fueron negativas al aislamiento de *C. neoformans* por lo que la totalidad de muestras positivas corresponde a muestras secas. Al aplicar el estadístico de prueba se obtiene un resultado

de 1.37 para chi cuadrada, por tanto, no existe diferencia estadística significativa que indique mayor probabilidad de aislar al hongo en excretas secas respecto a las frescas.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Vallejo *et al.*, quienes demuestran que, existe mayor probabilidad de aislar al microorganismo en excretas secas (19), y con los hallazgos de otras investigaciones como la ejecutada por Mattson *et al.*, que sugiere, que dicho hongo no suele aislarse en deyecciones recientes (frescas) (14).

Además, se tomó en cuenta la exposición a la luz solar en los sitios de muestreo, es así como, 5 muestras presentaban exposición variable a los rayos solares, de éstas, 3 muestras presentaron una exposición entre 2 a 3 horas y 2 lo hacían entre 6-8 horas. Se aisló *C. neoformans* en 2 muestras, ambas coinciden en que tenían una exposición a la luz solar entre 2 a 3 horas, lo cual indica que es posible aislar la levadura aún bajo estas condiciones; este resultado es comparable con el obtenido en Colombia por Vallejo *et al.*, en donde se aisló el hongo en zonas con alta exposición a la luz solar (20). Hasta hace poco se consideraba que esta condición inhibía por completo el crecimiento del microorganismo (3) e incluso se creyó que los rayos solares eran letales para la levadura (5), sin embargo, el estudio realizado por Dadachova *et al.* en 2007, demostró en sus ensayos que las especies patógenas de *Cryptococcus* productoras de pigmentos melanoides reflejan un aumento en la actividad metabólica de la célula al ser sometidas a radiación ionizante, lo que mejora las propiedades químicas de la melanina y, esto le permitiría al microorganismo sobrevivir (8,15,18).

X. CONCLUSIONES

- El hongo levaduriforme *Cryptococcus neoformans* actualmente sigue presente en las instalaciones del Hospital Nacional Rosales.
- Independientemente de la procedencia de las muestras ambientales para el aislamiento de *C. neoformans*, excretas acumuladas o restos de nidos, la posibilidad de recuperar al hongo es la misma.
- Con base a los aislamientos obtenidos, se comprueba que existe igual posibilidad de recuperar a la levadura capsulada independientemente se trate de excretas secas o frescas/húmedas.

XI. RECOMENDACIONES

Con base a los hallazgos encontrados al realizar este informe de investigación y comprobar la presencia de la levadura capsulada de *Cryptococcus neoformans* en las excretas acumuladas y restos de nidos dentro de las instalaciones del Hospital Nacional Rosales, se sugiere a:

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social:

- Crear acciones conjuntas con el Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales con el objetivo de alcanzar un común acuerdo para el control de plagas (en este caso, de palomas *Columba livia*) en instituciones bajo la dirección del MINSAL, como es el caso del Hospital Nacional Rosales.

Hospital Nacional Rosales:

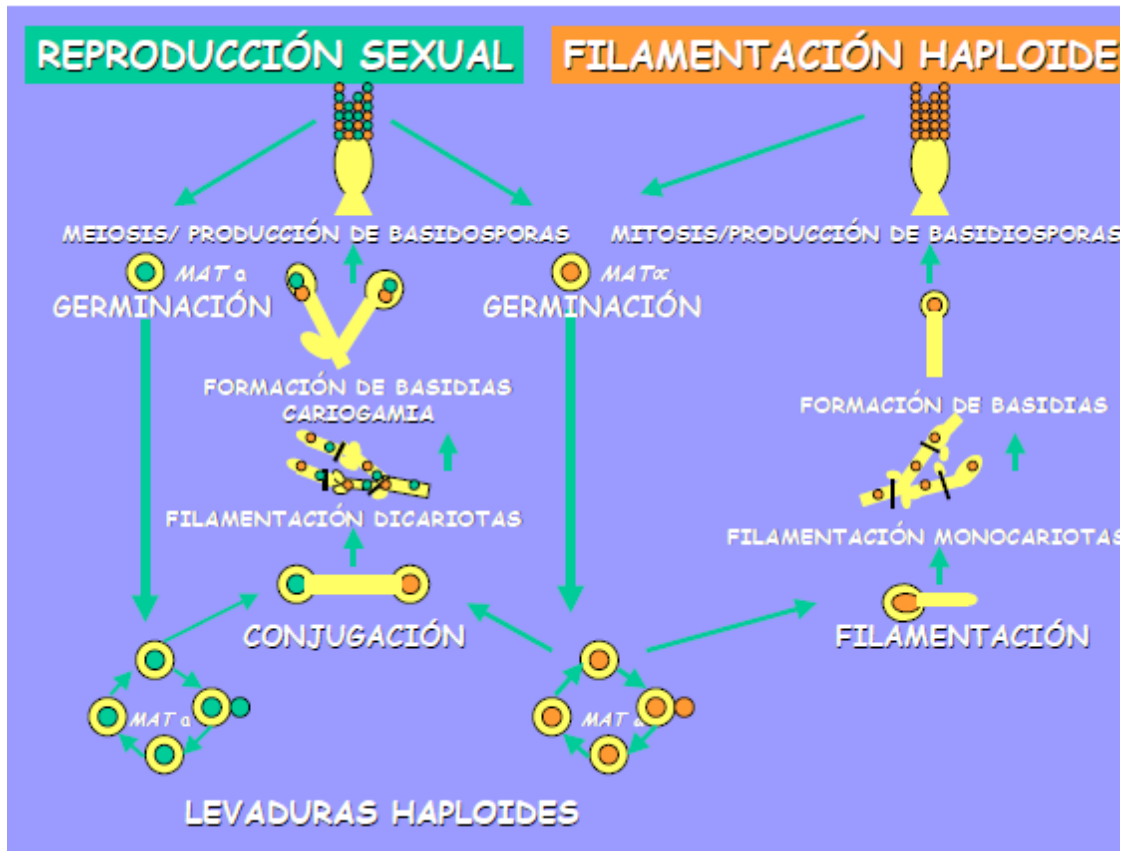
- Crear un plan que comprenda la eliminación completa de nidos en el hospital, además de imposibilitar la llegada y establecimiento de las palomas cubriendo huecos, ventanas, cielos falsos deteriorados o cualquier otro sitio que podría servir de refugio y/o anidación para ellas.
- Promover campañas de limpieza periódicas encaminadas a la eficaz y adecuada eliminación de excretas acumuladas en la totalidad de la infraestructura de dicho nosocomio, haciendo uso de las medidas de bioseguridad correspondientes.
- Realizar campañas informativas para el público en general mediante el uso de letreros que aborden aspectos importantes sobre la criptococosis: agente causal, forma de transmisión, personas susceptibles y cómo evitar la enfermedad.

- Promover la realización de trabajos de investigación similares a éste, que evidencien la presencia o no de microorganismos que representan un riesgo potencial para la salud.

XII. ANEXOS

ANEXO 1

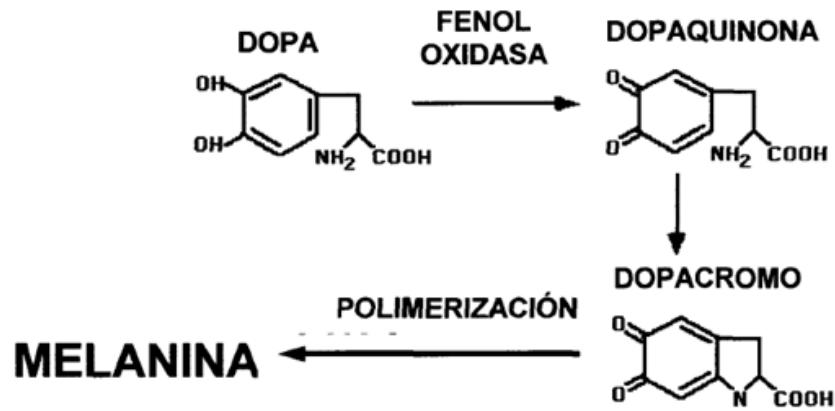
Ciclo sexual de *Cryptococcus neoformans*



FUENTE: BARÓ TOMÁS, MARÍA TERESA; 2002; Epidemiología de la Criptococosis en España

ANEXO 2

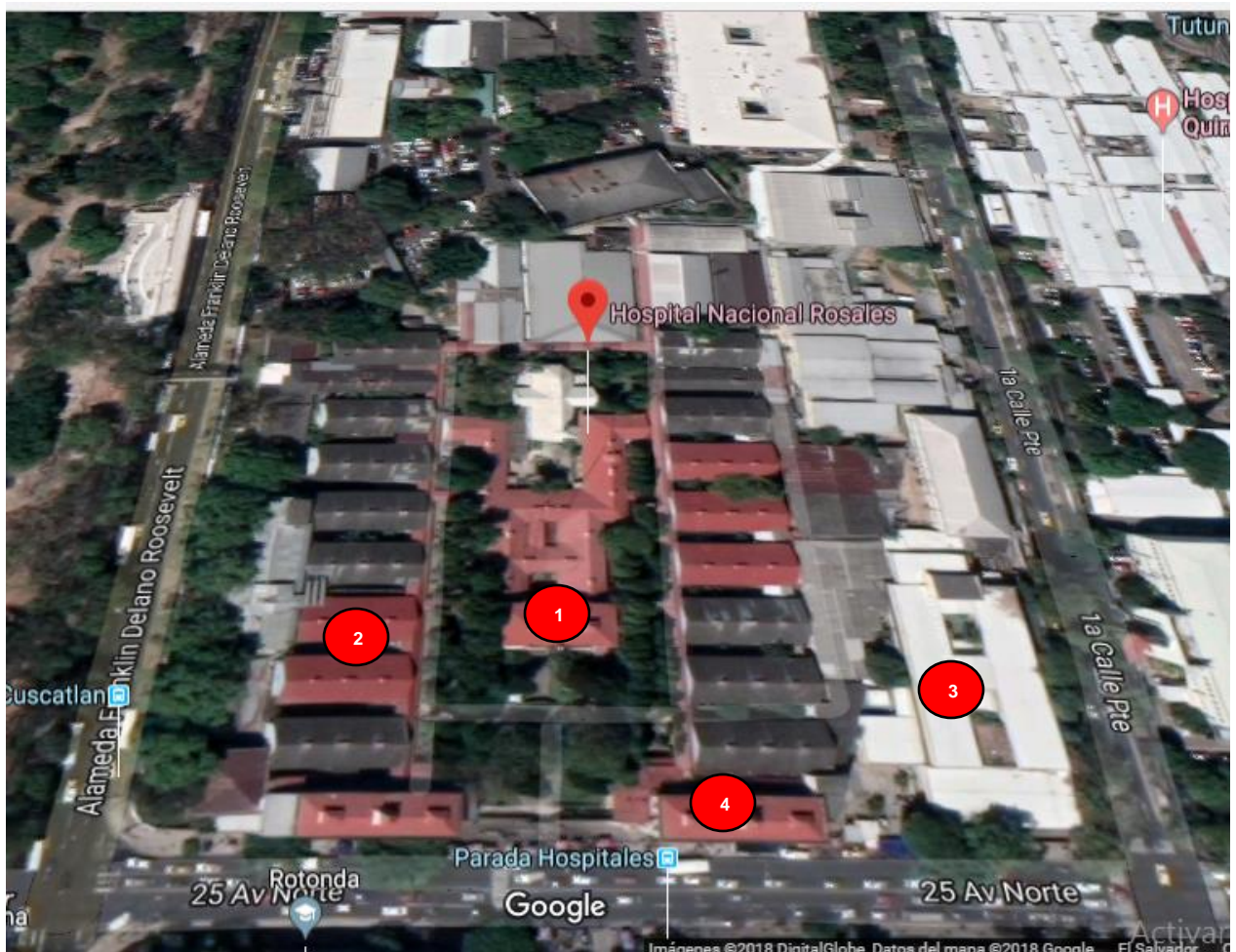
Melanogénesis.



FUENTE: ROSARIO MEDINA, M.I; Las Palmas de Gran Canaria, 2004.

ANEXO 3

Foto satelital: Zonas de recolección de muestras en el Hospital Nacional Rosales



Zona 1: Área administrativa

Zona 2: Servicio de 2° medicina hombres

Zona 3: Edificio consulta externa

Zona 4: Torre de comité gestor de camas

ANEXO 4

Ejemplos de lugares de muestreo: las muestras se encuentran expuestas a condiciones medioambientales diversas.



ANEXO 5

Instrumento de clasificación de muestras

Zona de recolección: _____

Número de muestra: _____

Clasificación de la muestra:

Tipo de muestra:

- Excretas acumuladas
- Restos de nidos

Condiciones de la muestra

- ✓ Heces frescas/húmedas
- ✓ Secas
- ✓ Exposición a la luz solar

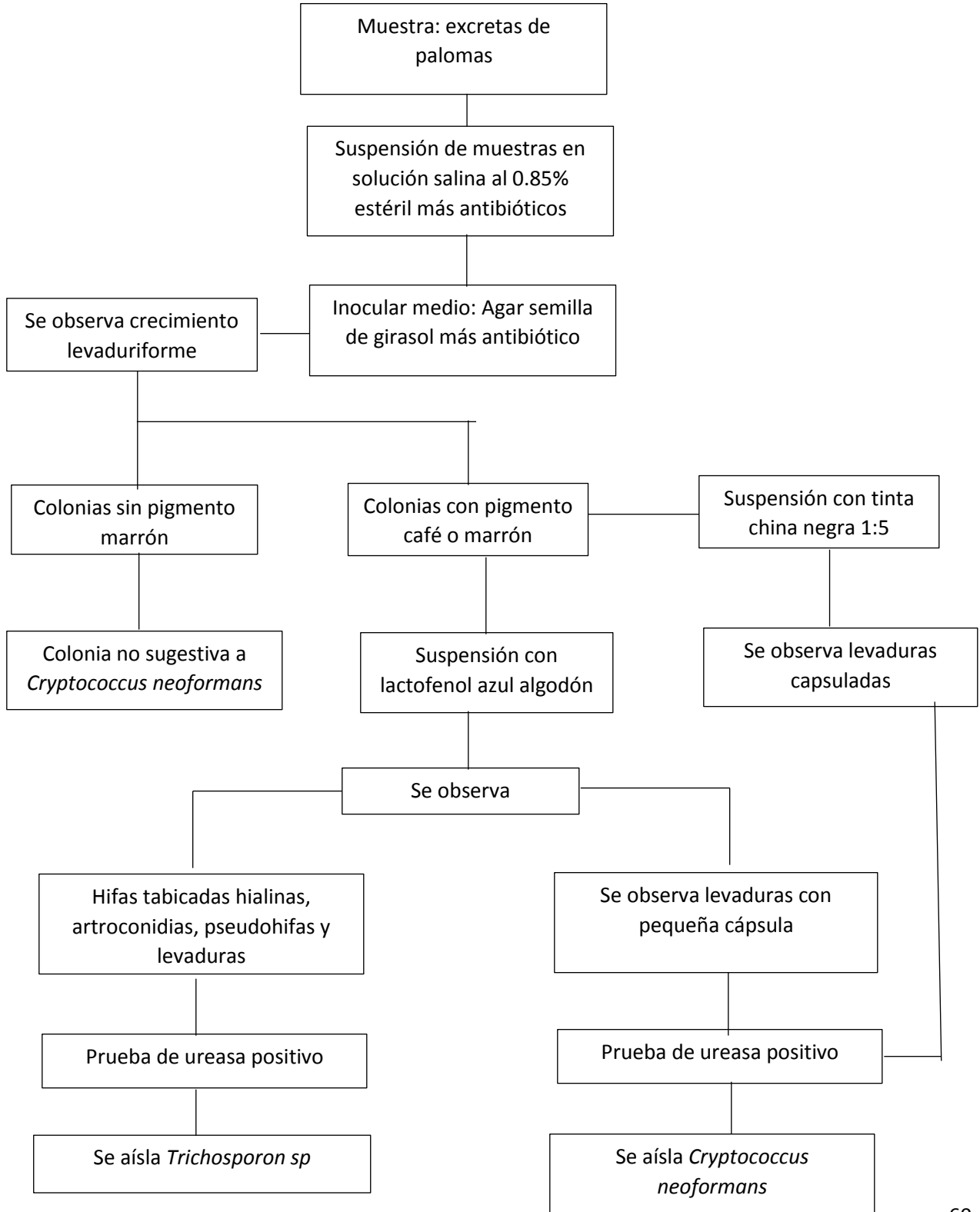
ANEXO 6

Forma de recolección de muestras, utilizando espátulas de latón



ANEXO 7

Protocolo para identificación de *Cryptococcus neoformans*



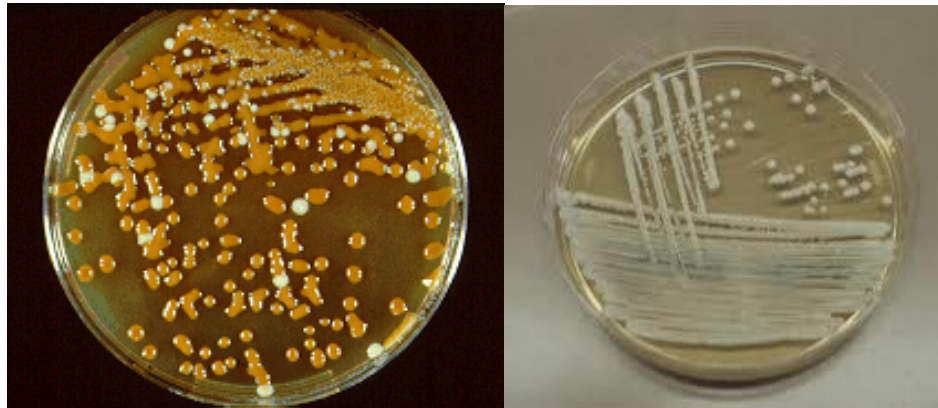
ANEXO 8

Procesamiento de las muestras, pesaje y homogenización



ANEXO 9

Resultado de control de funcionalidad del medio Agar Semilla de Girasol



A

B

A: control positivo, *Cryptococcus neoformans*; **B:** control negativo *Candida albicans*

ANEXO 10

Resultado obtenido a partir de cultivo de muestra. Señalado con flechas colonias sugestivas de *Cryptococcus neoformans* (figura A); Cultivo puro de colonias sugestivas de ser *C. neoformans* (figura B)

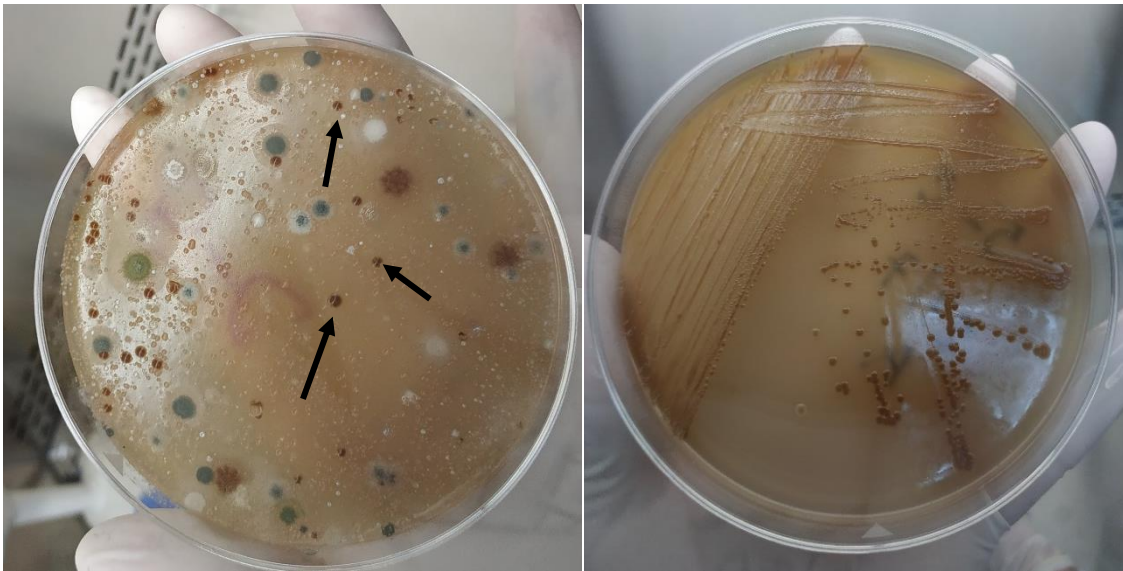
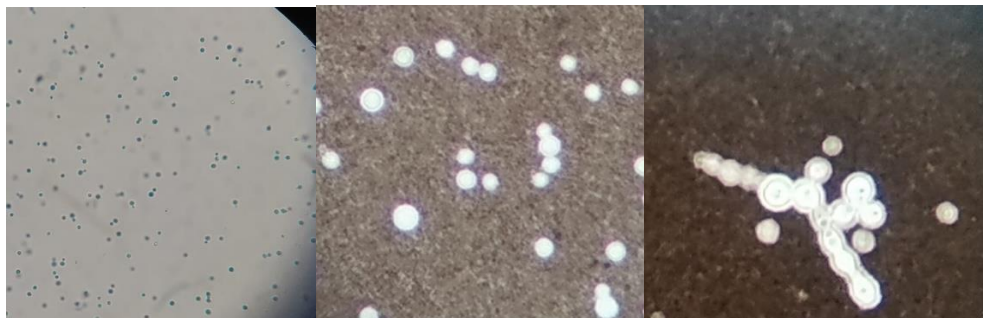


Figura A

Figura B

ANEXO 11

Preparaciones al fresco para comprobación de morfología microscópica.



A

B

C

Figura A: suspensión en lactofenol azul algodón, se observan levaduras esféricas u ovoides y a veces de forma alargada con gemación unipolar.

Figura B y C: suspensión con tinta china negra diluida 1:5, se observan levaduras y pseudohifas respectivamente con presencia de cápsula polisacárida, que se evidencia por la presencia de un espacio claro alrededor de la célula (tinción negativa)

ANEXO 12

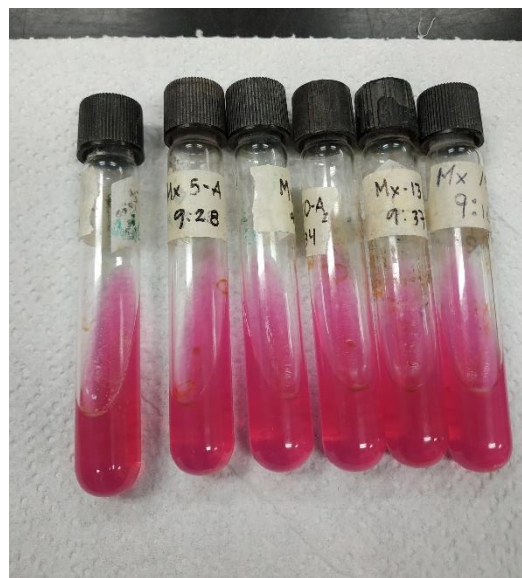
Aislamiento en agar glucosado de Sabouraud



La presencia de cápsula confiere a las colonias un aspecto mucoide con textura cremosa, de un color blanco amarillento característico.

ANEXO 13

Prueba para la confirmación de género: hidrólisis de la urea



Nótese el color rosa fucsia que demuestra un resultado positivo.

ANEXO 14

Materiales, Reactivos y Equipo.

A. Para la toma y transporte de muestras

- Espátulas de latón.
- Equipo de protección personal compuesto por: lentes protectores, gorro, guantes, mascarilla N- 95, gabacha.
- Bolsas de polietileno estériles de cierre hermético.
- Tirro.
- Plumones permanentes.
- Cajas de cartón (para cumplir el triple embalaje).

B. Materiales para la preparación de medios de cultivo

- Probeta.
- Frascos Erlenmeyer con volumen de 500 ml.
- Guantes de asbesto.
- Cerillos
- Hot plate.
- Autoclave.
- Cinta testigo.
- Balanza granataria.
- Agua destilada.

- Placas de Petri estériles descartables.
- Tubos de vidrio de 13x100 mm con tapón de rosca (para verter el medio Agar urea de Christensen)
- Tubos de vidrio de 16x150 mm con tapón de gasa (para verter el Agar glucosado de Sabouraud).
- Manta de gasa.
- Algodón.

C. Preparación de medios de cultivo

➤ Agar semilla de girasol

Componentes:

1. Semillas de girasol pulverizadas 170 g.
2. Glucosa 1 g.
3. Creatina 0.78 g.
4. Cloranfenicol 0.05 g.
5. Agar 18 g.
6. Agua destilada 1000 mL

Preparación:

1. Colocar en un Erlenmeyer 850 ml de agua destilada y agregar la semilla de girasol pulverizada, llevar a su ebullición y dejar enfriar.
2. Con la manta de gasa filtrar la preparación a fin de obtener el extracto de semilla de girasol.

3. Colocar el extracto obtenido en un Erlenmeyer, adicionar la glucosa, creatina y agar. Agregar agua destilada suficiente para obtener un volumen total de 1000 ml.
4. Autoclavar a 121°C a 15 libras de presión por 15 minutos; dejar enfriar, agregar el cloranfenicol y posteriormente verter en las placas de Petri estériles descartables.

➤ Agar urea de Christensen

Componentes:

A. Agar base

1. Peptona 1g
2. Glucosa 1g
3. Cloruro de sodio 5g
4. Fosfato monopotásico 2g
5. Rojo fenol 12 mg
6. Agar 15 g
7. Agua destilada 900 mL

B. Suspensión de urea al 50%

1. Urea 50 g
2. Agua destilada 100 mL

Preparación:

1. Preparar la solución de urea al 50% y esterilizar por filtración.

2. Preparar agar base, disolviendo el resto de los ingredientes en el agua destilada, dispensar en frascos con 80 ml cada uno y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión a 121°C.
3. Añadir a cada 80 ml de agar base estéril, enfriando a 50°C, 20 ml de solución de urea estéril, mezclar y dispensar en tubos de tapón de rosca y colocarlos inclinados para formar bisel.

➤ Agar glucosado de Sabouraud

Componentes:

1. Glucosa 20 g
2. Peptona 10 g
3. Agar 65 g
4. Agua destilada 1000 mL

Preparación

1. Suspender los gramos de medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada.
2. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante un minuto para disolver completamente los ingredientes. Evitar el sobrecalentamiento.
3. Esterilizar en autoclave a 121° a 15 libras de presión durante 15 minutos.
4. Dejar enfriar para luego verter en los tubos.

D. Aislamiento y pruebas de identificación.

- Balanza digital.
- Pinza sin garra estéril.
- Trozos de papel bond.
- Penicilina G (Bencilpenicilina)
- Estreptomina
- Rotador
- Frascos Erlenmeyer con volumen de 125 mL. (para realizar suspensión)
- Esparcidores estériles descartables para inoculación de medios
- Agar semilla de girasol.
- Agar glucosado de Sabouraud.
- Medio urea de Christensen
- Asa bacteriológica en anillo y aguja bacteriológica.
- Incubadora
- Micropipetas (20uL - 200uL)
- Puntas estériles para micropipeta
- Incinerador.
- Cámara de flujo laminar.
- Lápiz graso.
- Tirro.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Bulbos de hule.
- Frascos de vidrio estériles con tapa de rosca (para transferir el sobrenadante).

- Descartes de material contaminado.

E. Para examen directo

- Láminas portaobjetos 3 x 1 pulgadas.
- Láminas cubreobjetos 22 x 22 milímetros.
- Asa bacteriológica en anillo
- Lactofenol azul algodón.
- Tinta china negra diluida 1:5 con agua destilada.
- Microscopio.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARENAS R. Micología médica ilustrada. 5ª ed. México D. F.: McGraw Hill; 2014. pp 261-269.
2. AYALA DE CHAVARRÍA D., LÓPEZ DE HENRÍQUEZ F.M., VALENCIA DE RECINOS R.E. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras del ambiente contaminadas con excrementos de palomas en diferentes zonas de El Salvador. Minerva [Revista en línea] DIC-UES. 2011 junio; Vol.2, (1); pp: 21-27.
3. BARÓ TOMÁS M.T. Epidemiología de la Criptococosis en España. Caracterización de los aislados *Cryptococcus neoformans* [Tesis doctoral] Barcelona, España. 2002.
4. BONIFAZ A. Micología médica básica 4ª ed. México D. F.: McGraw Hill; 2012. pp. 348-362.
5. CAICEDO L.D., ÁLVAREZ M.I., LLANOS C.E., MOLINA D. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas del perímetro urbano de Cali. Colombia Med 1996; 27: 106-109.
6. CASTAÑÓN OLIVARES L.R. Criptococosis. Universidad Autónoma de México. 2015 [Consultado el 17 de abril de 2018]; Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/criptococosis.html>.
7. CURO M., SALINAS M., CASQUERO J. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas, suelo y aire de los palomares del perímetro urbano de Ica 2002. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. 2005; Vol 22 (4): pp 262-266.
8. DADACHOVA E, BRYAN R.A., HUANG X., MOADEL T., SCHWEITZER A.D., AISEN P., NOSANCHUK J.D., CASADEVALL A. Ionizing radiation changes the

- electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. 2007; [PubMed: 17520016]
9. DUARTE A., ORDOÑEZ N., CASTAÑEDA E. Asociación de levaduras del género *Cryptococcus* con especies de *Eucalyptus* en Santafé de Bogotá. Revista de Instituto de Medicina Tropical. 1994; Vol 36 (2): pp 125-30.
 10. ESCANDÓN P., MONTILLA A. Tipificación molecular de aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans* / *C. gattii*. Asociación colombiana de microbiología, Revista Infectio. 2010; pp. 127-130.
 11. GÓMEZ ARIAS B., ZARCO MONTERO L.A. Criptococosis meníngea: características clínicas y de laboratorio. Acta Neurológica Colombiana. 2011; Vol.27 (1): pp. 19-27.
 12. HANI A. C., VARGAS R., CONCHA A., COSTA V. A. Criptococosis esófago-gastroduodenal: reporte de caso. Revista Colombiana de Gastroenterología. 2014; Vol. 29 (3): p. 299.
 13. LEDFORD H. Hungry fungi chomp on radiation. news.nature.com. 070521. 2007.
 14. LONGO D., KASPER D., JAMESON L., FAUCI A., HAUSER S., LOSCALZO J. HARRISON, Principios de medicina interna 18^a ed. México D. F.: MacGraw Hill; 2012. pp. 1648-1650
 15. MATTSSON R, HAEMING PD, OLSEN B. Feral pigeons as carriers of *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus* and *Debaryomyces hansenii*. Med Mycol 1999; 37.
 16. MARÍN RICART M.R.L. Fenotipificación y factores de virulencia del complejo *Cryptococcus neoformans*/ *Cryptococcus gattii* de origen clínico de algunos

- hospitales de Paraguay [Tesis]. Paraguay: Universidad Nacional del Nordeste; 2017.
17. PANEQUE R.I., VALDIVIA J., AGUILAR A.A., CASTILLO C.I., MARTÍNEZ A.M., DELGADO A.E., Criptococosis en pacientes con trasplante renal. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2007; Vol. 59 (2): pp. 169-172.
 18. ROSARIO MEDINA M. I., La paloma (*Columba livia*) como portadora de *Cryptococcus spp.* Y otros hongos levaduriformes con impacto en la salud pública; estudio en la Isla de Gran canaria [tesis doctoral] Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 2004: pp. 28-29
 19. TELLO M., GUTIÉRREZ E., BÉJAR V., GALARZA C., RAMOS W., ORTEGA LOAYZA A. Criptococosis. *Revista Médica Risaralda Lima, Perú*. 2013 Vol.19 (2): pp. 147-153.
 20. VALLEJO D.A., BENAVIDES C.J., CHAVES C.A., MORILLO M.I., CASTILLO A.M. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en el casco urbano del municipio de Pasto, Colombia. *Revista Biosalud* 2016; Vol.15 (1): pp. 62-71.
 21. ZAMORA BASTIDAS T. O., AGREDO REYES D. K., AGREDO SALAZAR J. S. Criptococosis cerebral: análisis de 12 casos y revisión de la literatura; *Medicina Artículo de Investigación*. 2013; Vol. 35 (2): pp. 104-121.