

DETERMINACIÓN DE *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* A PARTIR  
DE AISLADOS AMBIENTALES PROVENIENTES DE LOS PARQUES  
SANTANDER, MERCEDES ABREGO, JUANA RANGEL DE CUELLAR Y  
FUENTE DE LEONES EN EL MUNICIPIO DE SAN JOSE DE CUCUTA, NORTE  
DE SANTANDER, COLOMBIA.

ERIKA YINETT GUERRERO MARTINEZ  
ELIANA JULIETH MORENO MORA  
KELLY JHOANA CARRASCAL QUINTERO

UNIVERSIDAD DE SANTANDER  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA  
2018

DETERMINACIÓN DE *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* A PARTIR  
DE AISLADOS AMBIENTALES PROVENIENTES DE LOS PARQUES  
SANTANDER, MERCEDES ABREGO, JUANA RANGEL DE CUELLAR Y  
FUENTE DE LEONES EN EL MUNICIPIO DE SAN JOSE DE CUCUTA, NORTE  
DE SANTANDER, COLOMBIA.

ERIKA YINETT GUERRERO MARTINEZ  
ELIANA JULIETH MORENO MORA  
KELLY JHOANA CARRASCAL QUINTERO

Trabajo de Grado realizado Para optar el título de  
Bacteriología y laboratorista clínico

Director  
DRA. DENNY MILEY CARDENAS  
MSc. Ciencias Biológicas, Inmunología

Asesor Científico  
BLC. ASBLEIDE KARINA ANGARITA

Asesor metodológico  
MSc. JAEL CONTRERAS RANGEL

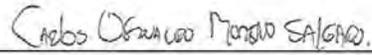
UNIVERSIDAD DE SANTANDER  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA  
2018

## NOTA DE ACEPTACIÓN

DETERMINACIÓN DE *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* A PARTIR DE AISLADOS AMBIENTALES PROVENIENTES DE LOS PARQUES SANTANDER, MERCEDES ABREGO, JUANA RANGEL DE CUELLAR Y FUENTE DE LEONES EN EL MUNICIPIO DE SAN JOSE DE CÚCUTA, NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA.

### NOTA DE ACEPTACIÓN

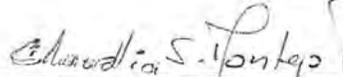
Aprobado - 4.6



Carlos Oswaldo Moreno Salgado  
Jurado



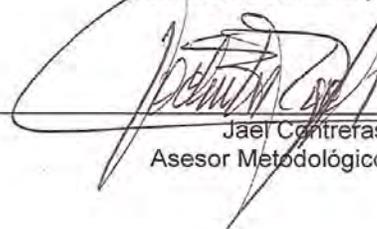
Yesmit Karina Ríos  
Jurado



Claudia Sofia Montejo Torres  
Coordinadora del Programa



Denny Miley Cárdenas  
Directora del Trabajo



Jael Contreras  
Asesor Metodológico

San José de Cúcuta, 15 de Junio del 2018

## **ADVERTENCIA**

La autoras, ERIKA YINETT GUERRERO MARTINEZ, ELIANA JULIETH MORENO MORA, KELLY JHOANA CARRASCAL QUINTERO, la reproducción total o parcial de este documento, con la debida cita de reconocimiento de la autoría y cedemos a la misma Universidad los derechos patrimoniales con fines de investigación, docencia e institucionales, consagrado en el artículo 72 de la Ley 23 de 1982 y las normas que lo instituyan o modifiquen.

**(Artículo 4°, Acuerdo 0066 de 2003)**

## DEDICATORIA

**De: Eliana a:**

Este trabajo de investigación se lo dedico primeramente a **Dios**, por ser mi guía espiritual, por darme el don de la vida, el don de la sabiduría y entendimiento para poder avanzar y llegar a esta etapa crucial de mi formación profesional. Por no dejarme decaer en los momentos difíciles, porque cada día me da una razón para continuar y cumplir mis metas.

A **LA SANTISIMA VIRGEN MARÍA**, por ser mi mensajera para con Dios y no dejarme doblegar nunca a pesar de lo difícil que se tornaba.

A **Mis Padres** por ser mi motor cada día, por brindarme un apoyo incondicional y confiar en mí para poder cumplir unos de mis grandes sueños y porque con su amor, responsabilidad y empeño logramos esta meta juntos; en especial a ti **Mamita** porque siempre me has demostrado lo luchadora y fuerte que eres y que a pesar de todo siempre estás ahí venciendo cada obstáculo con la ayuda de Dios porque no puedo tener un mejor ejemplo que el tuyo; Gracias por todo lo Amo infinitamente.

A **Mi Hermano** por ser paciente y estar allí en cada momento en que lo he necesitado a lo largo de mi vida; por demostrarme su amor incondicional y porque a pesar de los momentos difíciles siempre los hemos superado; Gracias por todo lo Amo.

A Mis Compañeras de Tesis sin ellas no hubiera sido posible lograr este objetivo trazado porque a pesar de cada dificultad la pudimos resolver en equipo y este es el comienzo de un futuro exitoso para cada una de nosotras.

A Mis Amigos de universidad quienes han compartido conmigo esta aventura juntos porque a lo largo de 5 años me han demostrado el valor de la Amistad y que con sus locuras hicieron que cada día fuese más llevadero gracias por que se convirtieron en mi segunda Familia. Siempre los recordaré los llevo en mi corazón, Los Quiero.

**De: Erika**

Este trabajo está dedicado primeramente a **Dios** mi padre, **Jesucristo** mi señor y al **Espíritu Santo** que mora en mí, quienes supieron guiarme, y darme fuerzas para seguir adelante sin desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades de la vida sin perder nunca la fe, ni desfallecer en el intento. Hoy digo con alegría valió la pena todos los esfuerzos, además doy fe de que los sueños se pueden cumplir aunque no sea fácil el camino siempre hay que ser perseverante y confiar en él porque siempre los planes de Dios son mejores.

**A mis padres** por haber sido mi ejemplo de superación, humildad y sacrificio; Enseñándome a valorar y agradecer a Dios por todo lo que tengo. A ellos que se esmeraron día a día por formarme con valores, ideales y una gran visión hacia el futuro con proyección a ser una profesional. Además constantemente me motivaron para alcanzar mis metas. En especial a mi padre por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue. Aunque ya no estés aquí siempre está presente en mi memoria y recuerdos, gracias padre por haber existido y por ser hoy la luz de mi vida.

**Hijo**, posiblemente en este momento no entiendas mis palabras, pero para cuando seas capaz, quiero que te des cuenta de lo que significas para mí. Aun a tu corta edad, me has enseñado y me sigues enseñando muchas cosas como el amor incondicional, además de tener la oportunidad de ser Mamá lo cual ha sido una etapa maravillosa. Aunque todos estos años no fueron fáciles y más aún de sobrellevar varias responsabilidades al tiempo. Sin embargo, con tu presencia me llenaba de fuerzas para no renunciar a esta meta. Eres la razón por la cual me levanto cada día a esforzarme por el presente y construir el futuro, eres mi principal motivación. Hoy puedo decir hijo lo logramos.

**A mis compañeros**, ya que con ellos vivimos muchas experiencias a lo largo de la carrera, además la oportunidad de compartir buenos momentos algunos inolvidables que hacen parte de mi vida. Gracias muchachos este paso por la universidad fue una etapa bonita, donde disfrute, y aprendí pues cada uno es una historia de vida diferente. Por eso, algunos más que compañeros se convirtieron en verdaderamente amigos. Los quiero y siempre los recordare.

**De: KELLY**

Dedico a Dios todo lo alcanzado en mi carrera y agradezco lo recibido de él para lograr esta nueva meta; le debo todo lo que soy; y lo que he hecho. Su infinita bondad y amor fueron y serán mi fortaleza.

A mis padres DENIS CARRASCAL y EDILMA QUINTERO por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores y esfuerzo. Por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien y por todo su amor, perseverancia y constancia que los ha caracterizado siempre.

A mi hermana Andrea Jimena carrascal que es mi razón de sentirme tan orgullosa de culminar mi meta, gracias por haber confiado en mí y apoyado durante mi carrera.

A mi novio por sus palabras de confianza, su amor y brindarme todo su apoyo, a mis familiares, amigos y compañeras de tesis ELIANA MORENO y ERIKA MARTINEZ quiero agradecerles por habernos apoyado mutuamente en nuestra formación profesional y los momentos armoniosos y compartidos que pasamos en el proceso.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por guiarnos en cada paso del camino, por ser nuestra fuerza, por darnos las herramientas necesarias día a día para poder salir adelante y llegar a la meta. A la Universidad de Santander, a la facultad de salud, a BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO, por ser nuestra casa de estudios, un segundo hogar, por formarnos como personas íntegras y además profesionales, llenas de valores y conocimientos, por cada uno de los docentes, porque fueron quienes nos alentaban día a día y nos exigían porque sabían que podíamos dar mucho más siempre.

A NUESTROS PADRES, Por brindarnos su apoyo incondicional, porque a pesar de todas las dificultades que se presentaron en el camino nunca nos dijeron que no podían, gracias a ustedes hoy somos profesionales y llenas de valores, sin olvidar nunca que la humildad jamás puede perderse, GRACIAS por confiar en nosotras.

A la Doctora Karina Angarita por aceptarnos para realizar la tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en nuestro trabajo y su capacidad para haber liderado la investigación lo cual ha sido un aporte invaluable no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también es nuestra formación como profesionales. Además agradecemos el haber facilitado siempre los recursos económicos suficientes para llevar a cabo la tesis.

A la Doctora Denny Cárdenas, agradecemos sinceramente por habernos brindado sus conocimientos científicos, y su participación activa en el desarrollo de la tesis. Destacamos por encima de toda su disponibilidad y paciencia. No cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo, además ha significado el surgimiento de una sólida amistad. La apreciamos mucho Doctora y nunca la vamos a olvidar pues ha marcado nuestras vidas como una mujer ejemplar quien lucha día a día por cumplir sus metas a pesar de las dificultades; también resaltamos su excelencia como docente.

A Jael Contreras, a usted quien, con todos sus conocimientos, sabiduría amor y paciencia nos enseñó poco a poco los valores de la vida y como ser personas correctas y justas, además de enseñarnos paso a paso a ser grandes emprendedoras.

**DETERMINACIÓN DE *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* A PARTIR DE AISLADOS AMBIENTALES PROVENIENTES DE LOS PARQUES SANTANDER, MERCEDES ABREGO, JUANA RANGEL DE CUELLAR Y FUENTES DE LEONES EN EL MUNICIPIO DE SAN JOSE DE CUCUTA, NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA.**

**Autores**

Eliana Moreno Mora, Erika Guerrero Martínez, Kelly Carrascal Quintero

**RESUMEN**

**Introducción:** La Criptococosis es una micosis oportunista, con predilección por el sistema nervioso central. Afecta individuos inmunodeprimidos e inmunocompetentes y se ha relacionado con la exposición de las personas a excretas de aves, de las cuales la paloma urbana (*Columba livia*) es la más importante como reservorio del hongo. *C. neoformans* (serotipo A) es el principal agente etiológico (95% casos), causando 99% de las infecciones en pacientes con SIDA. En contraste, *C. neoformans* var. *Neoformans* (serotipo D) causa un 5% de las infecciones a nivel mundial. **Objetivo:** Determinar la presencia de *C. neoformans* y *C. gattii* a partir de aislados ambientales de parques del municipio de San José de Cúcuta. **Materiales y métodos:** Se realizó muestreo en los parques Juana Rangel de Cuellar, Santander, Mercedes Abrego y Fuente de Leones. Las muestras de corteza, tierra, hojas y frutos secos de distintas especies de árboles se homogenizaron en laboratorio y sembraron en el agar *Guizotia abyssinica*; a las colonias melanogénicas se les realizó prueba de ureasa y de crecimiento en CGB, con observación microscópica empleando tinta china. Finalmente se empleó identificación molecular de especie mediante PCR huella digital. **Resultados:** De un total de 389 muestras obtenidas a partir de 147 individuos de diversa especie arbórea, en los 4 parques objeto estudio, se aislaron 12 colonias sospechosas en árboles Oití, Mango, Ficus, Samán y Tamarindo, de las cuales 11 se identificaron como *Cryptococcus neoformans* genotipo VNI y 1 como *Cryptococcus gattii* genotipo VGII, con prevalencias de 7,5% y 0,7%, respectivamente. **Conclusión:** nuestra investigación evidenció la presencia de especies patógenas de *Cryptococcus sp* en el 75% de las zonas públicas estudiadas, resaltando el hallazgo sin antecedente de *Cryptococcus gattii* en el parque Mercedes Abrego, y sentando bases para investigación continua que permita caracterizar el nicho ecológico de éste hongo en la ciudad de Cúcuta.

**Palabras claves:** Criptococosis, Inmunocompetente, inmudeprimidos, Hongo, PCR Huella Digital.

**DETERMINATION OF *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*  
ENVIRONMENTAL ISOLATIONS FROM THE SANTANDER, MERCEDES  
ABREGO, JUANA RANGEL DE CUELLAR AND FUENTE DE LEONES PARKS  
IN THE MUNICIPALITY OF SAN JOSE DE CUCUTA, NORTH OF SANTANDER,  
COLOMBIA.**

**AUTHORS**

Eliana Moreno Mora, Erika Guerrero Martínez, Kelly Carrascal Quintero.

**SUMMARY**

**Introduction:** The Cryptococcosis is an opportunistic mycosis, with predilection for the Central Nervous System. It affects immunosuppressed and immunocompetent individuals and has been related to the exposure of people to bird droppings, of which the urban pigeon (*Columba livia*) is the most important reservoir of the fungus. *C. neoformans* (serotype A) is the main etiological agent (95% cases), causing 99% of infections in patients with AIDS. In contrast, *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D) causes 5% of infections worldwide. **Objective:** To determine the presence of *C. neoformans* and *C. gattii* from environmental isolates of parks in the municipality of San José de Cúcuta. **Materials and methods:** Sampling was carried out in the Juana Rangel de Cuellar, Santander, Mercedes Abrego and Fuente de Leones parks. The samples of bark, soil, leaves and nuts of different tree species were homogenized in the laboratory and seeded in *Guizotia abyssinica* agar. The melanogenic colonies were tested for urease and growth in CGB, with microscopic observation employing Chinese ink. Finally, molecular identification of species was used by PCR fingerprint. **Results:** From a total of 389 samples obtained from 147 individuals of different arboreal species in the 4 parks under study, 12 suspect colonies were isolated in Oiti, Mango, Ficus, Samán and Tamarindo trees, of which 11 were identified as *Cryptococcus neoformans* genotype VNI and 1 as *Cryptococcus gattii* genotype VGII, with prevalences of 7.5% and 0.7%, respectively.

**Conclusion:** our research showed the presence of pathogenic species of *Cryptococcus sp* in 75% of the public areas studied, highlighting the unprecedented finding of *Cryptococcus gattii* in the Mercedes Abrego park, and promoting continuous research to characterize the ecological niche of this fungus in the city of Cúcuta.

**Keywords:** Cryptococcosis, immunocompetent, immunosuppressed, fungus, PCR Fingerprint.

## GLOSARIO

**CRUPTOCOCOSIS:** Infección provocada por hongos del genero *Cryptococcus spp* que penetran en el organismo por vía respiratoria. El primer foco que se produce es pulmonar, pero en etapas posteriores de la enfermedad provoca meningitis, afecciones en el riñón, lesiones cutáneas y óseas.<sup>1</sup>

**HONGO:** Organismo eucariótico heterótrofo con paredes celulares quitinosas y cuerpo, por lo común, en forma de micelio con hifas filiformes ramificadas, pluri o unicelular. La mayor parte de los hongos son descomponedores y algunos son parásitos. No contienen clorofila. **2**

**INMUNOCOMPETENTE:** Habilidad de las células linfoides de dar una respuesta humoral o celular inmunitaria al enfrentar un antígeno.<sup>3</sup>

**INMUNOSUPRIMIDO:** Se define como la inhibición de uno o más componentes del sistema inmunitario adaptativo o innato, que puede producirse como resultado de una enfermedad subyacente o de forma intencional mediante el uso de medicamentos u otros tratamientos, como radiación o cirugía.<sup>4</sup>

**LCR:** Líquido que circula por los espacios huecos del cerebro y la médula espinal y entre dos de las meninges (las capas finas de tejido que cubren y protegen el cerebro y la médula espinal). El líquido cefalorraquídeo es elaborado por un tejido en los ventrículos (espacios huecos) del cerebro que se llama plexo coroideo. También se llama LCR.<sup>5</sup>

**MENINGITIS MICÓTICA:** Suelen ocurrir en pacientes con inmunodeficiencias primarias o secundarias, como los enfermos con SIDA o quienes están en tratamiento con quimioterapia. Los hongos implicados son: *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomycosis*, y *Coccidioides immitis*. Estos gérmenes se transmiten de persona a persona, por vía aérea y luego que afectan el aparato respiratorio, su diseminación al sistema nervioso central es por vía hematógena. La aparición de los síntomas es

---

<sup>1</sup> DICCIONARIO MEDICO. Criptococcosis. [citado 15 de marzo 2018]. [Disponible en internet] En: <http://www.doctissimo.com/es/salud/diccionario-medico/criptococosis>

<sup>2</sup> DICCIONARIO MEDICO DE LA MEDICINA. Hongo. [citado 15 de marzo 2018]. [Disponible en internet] En: <http://dic.idiomamedico.net/hongo>

<sup>3</sup> DICCIONARIO MEDICO. Inmunocompetente. [citado 15 de marzo 2018]. [Disponible en internet] En: <http://elsalvador.medicosdoctores.com/diccionario-medico/inmunocompetente/i>

<sup>4</sup> ENCICLOPEDIA SALUD. Inmunosupresión. [citado 15 de marzo 2018] [Disponible en internet] En: <https://educalingo.com/es/dic-es/inmunosupresion>

<sup>5</sup> DICCIONARIO DE CANCER. Líquido Cefalorraquídeo. [citado 15 de marzo 2018]. [Disponible en internet] En: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/liquido-cefalorraquideo>

subaguda con: fiebre, alteración del estado mental, cefalea, náusea, vómito y rigidez de nuca.<sup>6</sup>

**MICOSIS OPORTUNISTA:** Las micosis oportunistas se definen como afecciones producidas por hongos que se comportan como saprófitos o comensales del hombre, formando parte de su flora normal de piel, mucosas, tracto digestivo o respiratorio, o bien, por aquellos que integran la micótica ambiental (suelo, agua, aire). Estos hongos ante determinadas oportunidades que les ofrece el hospedador, al disminuir su capacidad defensiva, pueden colonizar, infectar y producir enfermedad. En ocasiones y según el estado inmunitario pueden invadir tejidos y producir alteraciones que pueden llevar a la muerte.<sup>7</sup>

**NICHO ECOLOGICO:** Difiere de hábitat (dónde habita la especie), en que es una idea donde se resumen las tolerancias y requerimientos de los organismos así como su rol funcional, no es el punto geográfico-espacial donde se ubica la especie sino que incluye las características que definen que ahí pueda subsistir.<sup>8</sup>

**PALOMA:** Ave domesticada que provino de la paloma silvestre, de la que hay muchas variedades que se diferencian principalmente por el tamaño o el color del plumaje. El rango de longitud va de los 20 a los 36 cm mientras que su peso fluctúa entre 340 y 360 g. La especie es originaria de Europa, África y Asia; su domesticación inició hace cinco mil años, por lo que las poblaciones urbanas han sido resultado de selección artificial. Fue introducida en Norteamérica a principios del siglo XVII.<sup>9</sup>

---

<sup>6</sup> GARCÍA S y col. Procesos infecciosos del sistema nervioso central en el preludeo del siglo XXI; una revisión analítica [Artículo científico en línea][consulta 12/03/2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2013/mim133h.pdf>.

<sup>7</sup> GIUSIANO. MICOSIS OPORTUNISTAS [Artículo científico en línea] En: Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Vol. 2 pp 1-9 [consulta 12/03/2018]. Disponible en: <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE%20Micosis%20oportunistas.pdf>.

<sup>8</sup> MARTÍNEZ Ainsworth, El nicho ecológico / CIENCIORAMA. Vol, 2 pp 1-11 [consulta 12/03/2018]. Disponible en: [http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/273\\_cienciorama.pdf](http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/273_cienciorama.pdf)

<sup>9</sup> OLALLA, Ruiz y Cols. "PALOMAS, ESPECIES INVASORAS" [Artículo científico en línea] En: CONABIO. Biodiversitas vol, 82, pp 1-4 [consulta 12/03/2018]. Disponible. <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv82art2.pdf>

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	9
1. PROBLEMA	23
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
1.2 FORMULACION DEL PROBLEMA	26
1.3 OBJETIVOS	26
1.3.1 Objetivo general.	26
1.3.2 Objetivos específicos.	26
1.4 JUSTIFICACION	27
2. MARCO REFERENCIAL	30
2.1 ANTECEDENTES	30
2.2 MARCO TEORICO	33
2.2.1 Agente Etiológico.	33
2.2.2 Taxonomía.	33
2.2.3 Factores de Virulencia	34
2.2.3.1 Cápsula.	34
2.2.3.2 Melanina y Lacasa.	35
2.2.3.3 Manitol.	35
2.2.3.4 Ureasa.	35
2.2.3.5 Fosfolipasa.	35
2.2.3.6 Vesículas Extracelulares.	36

2.2.4 Criptococosis.	36
2.2.5 Presentación Clínica de la Enfermedad.	36
2.2.5.1 Cryptococcosis Pulmonar.	37
2.2.5.2 Criptococcosis del Sistema Nervioso Central.	38
2.2.5.3	38
2.2.5.4	39
2.2.5.5 Criptococosis ósea y visceral	39
2.2.6 Diagnóstico	39
2.2.6.1 Muestras Ambientales.	39
2.2.6.2 Identificación.	39
2.2.7 Epidemiología:	40
2.2.8 Criptococosis en Colombia:	42
2.3 MARCO CONCEPTUAL	43
2.4 MARCO LEGAL	45
2.5 MARCO CONTEXTUAL	46
2.6 SISTEMA DE HIPÓTESIS	48
2.7 MATRIZ OPERATIVA DE LAS VARIABLES	49
3. MARCO METODOLOGICO	50
3.1 TIPO DE INVESTIGACION	50
3.1.1 Nivel de investigación	50
3.1.2 Diseño de estudio.	50
3.2 METODOS O PROCEDIMIENTOS	50
3.3 POBLACION Y MUESTRA	53
3.3.1 Población.	53

3.3.2 Muestra.	53
3.3.3 Técnicas de muestreo	54
3.3.3.1 Muestreo no probabilístico.	54
3.4.1 INVESTIGACIÓN DOCUMENTAL:	54
3.4.2 INVESTIGACIÓN DE CAMPO:	54
3.5 TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	54
4. ANALISIS E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS	56
4.1. RESULTADOS	56
4.1.1 Identificación de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i> mediante pruebas directas	56
4.1.1.2 Caracterización de la población estudio	56
4.1.1.3 Tinción de Tinta China.	59
4.1.1.4 Prueba de Urea.	59
4.1.1.4. Prueba de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB).	61
4.1.1.5 Caracterización genética de las cepas de <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i> , mediante PCR huella digital.	62
5. ARTICULO CIENTIFICO	69
6. CONCLUSIONES	83
7. RECOMENDACIONES	84
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	93

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Firacative C. Advances in the understanding of the Cryptococcus neoformans and C. gattii species complexes and cryptococcosis. 2017.	34
Figura 2. Agar Guizotia abyssnica. Colonias de Cryptococcus sp pigmentadas con color marrón.	39
Figura 3. Paloma común (Columba livia). Tomado del Parque Santander Cúcuta-Norte de Santander, Colombia, año 2017.	41
Figura 4. Parque Santander, a la izquierda vemos su ubicación y a la derecha una Figura del parque.	47
Figura 5 Parque Mercedes Abrego, a la izquierda vemos su ubicación y a la derecha una Figura del parque.	47
Figura 6 Parque Fuente de Leones, a la izquierda vemos su ubicación y a la derecha una Figura del parque.	47
Figura 7 Parque Juana Rangel de Cuellar, a la izquierda vemos su ubicación y a la derecha una Figura del parque.	48
Figura 8. Confirmación de la Capsula mediante Tinta China. Fuente: Guerrero Erika, Moreno Eliana, Carrascal Kelly; Febrero 2018.	59
Figura 9. Prueba de Urea Positiva para Cryptococcus sp. Fuente: Guerrero Erika, Moreno Eliana, Carrascal Kelly; Mayo 2017.	59
Figura 10. Confirmación de la especie Cryptococcus neoformans, de las muestras ambientales mediante el medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Fuente: Carrascal Kelly, Moreno Eliana, Guerrero Erika, 2018.	61
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa.	62

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Matriz operativa	49
Tabla 2. Caracterización de tipo de muestras	58
Tabla 3. Distribución geográfica de muestras ureasa positiva	60
Tabla 4. Caracterización de los patrones moleculares	63
Tabla 5. Genotipos de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> por PCR-Huella digital	64

## LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Caracterización de Individuos estudiados	56
Gráfica 2. Caracterización de especies arbóreas	57

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Recolección de muestras ambientales	94
Anexo 2. Solución Buffer de Fosfato	98
Anexo 3. Preparación y siembra de muestras ambientales	102
Anexo 4. Preparación de AGAR GIRASOL	106
Anexo 5. Prueba de UREA	111
Anexo 6. Preparación de medio CANAVANINA-GLICINA-AZUL DE BROMOTIMOL (MEDIO CGB)	115
Anexo 7. Conservación de CEPAS	120
Anexo 8. Extracción de ADN	124
Anexo 9. PCR huella digital	129
Anexo 10. Formato de registro de muestras ambientales	134
Anexo 11. Evidencias fotográficas	135
Anexo 12. Actas	139

## LISTA DE FOTOS

	Pág.
Foto 1. Recolección y Toma de Muestras.	135
Foto 2. Preparación de Medios de Cultivo.	135
Foto 3. Procesamiento de muestras en el Laboratorio.	136
Foto 4. Procesamiento de PCR Huella Digital.	137
Foto 5. Observación Macroscópica de colonias <i>Cryptococcus</i> spp en Agar Girasol.	137
Foto 6. Observación Macroscópica de colonias <i>Cryptococcus</i> spp en Agar Saboraud.	138
Foto 7. Capacitación de la Doctora Patricia Escandón del Instituto Nacional de Salud para Notificación de Criptococosis	138

## INTRODUCCIÓN

El género *Cryptococcus spp* perteneciente al filum Basidiomycota. Comprende alrededor de 100 especies, dentro de las cuales *C. neoformans* y *C. gattii* se han descrito como patógenos en humanos; dichas especies se han clasificado en varios serotipos, los cuales fueron determinados por variables antigénicas en su cápsula polisacárida: *C. neoformans* variedad *grubii* (serotipo A y subgrupos genéticos VNI y VNII), *C. neoformans* variedad *neoformans* (serotipo D con un subgrupo genético VNIV), *C. gattii* comprende los serotipos B (subgrupos genéticos VGI y VGII) y serotipo C (subgrupos genéticos VGIII y VGIV) y los híbridos AD con un subgrupo genético VNIII.<sup>10</sup> *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) es el principal agente etiológico de la infección denominada criptococosis (95%) y abarca un 99% de las infecciones en pacientes con SIDA. Contrario a esto, *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D) está asociado a un 5% de las infecciones en todo el mundo.<sup>11</sup>

Las especies del género *Cryptococcus* crecen en medios de cultivos tradicionales como el agar Sabouraud, con un tiempo óptimo de crecimiento de 72 a 96 horas, a temperaturas entre 28°C y 37°C. Las colonias son lisas, blanquecinas y de aspecto mucoso. En cultivos que tienen más tiempo pueden observarse colonias café claro debido a la producción de melanina. *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* producen hidrólisis de la urea; no asimilan nitrato de potasio o lactosa; no fermentan carbohidratos y producen melanina en presencia de L-Dopa u otros substratos. Característicamente *C. gattii* genera un color azul en presencia de azul de bromotimol.<sup>12</sup>

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*. En cuanto a *C. gattii*, se ha logrado recuperar esta especie del ambiente en Australia a partir de detritos de *Eucalyptus camaldulensis*. 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.*

---

<sup>10</sup> KWON-CHUNG KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang ZA, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014.[consulta 24/03/2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24985132>.

<sup>11</sup> YEF, Xie J-x, Zeng Q-s, Chen G-q, Zhong N-s. Retrospective analysis of 76 immunocompetent patients with primary pulmonary cryptococcosis. *Lung.* 2012.[consulta 24/03/2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22246551>.

<sup>12</sup> TAPIA C; CORREA N. Género *Cryptococcus*, Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 2015 [Citado el 25 de marzo del 2018]. Disponible [en línea] [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S071610182014000600012](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071610182014000600012)

*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 spp.*<sup>13</sup>

Por otra parte, las aves por lo general han sido tomadas en cuenta en diferentes contextos como animales benéficos. A las palomas en general, se les reconoce su papel de mensajeras, pero también son apreciadas para la recreación, turismo, terapia y ornato. Cuando las poblaciones de palomas se encuentran controladas (baja cantidad de individuos, ubicación idónea y estado de salud óptimo) constituyen un valor añadido a la belleza de cualquier ciudad. Por el contrario, cuando se asocian en gran número dentro de los asentamientos urbanos se transforman en plagas capaces de transmitir bacteriosis, parasitosis y micosis.<sup>14</sup>

Éste es el caso de la paloma común (*Columba livia*), la cual es considerada como una plaga urbana. Estas aves se alimentan en el piso, temprano en la mañana o a media tarde. Su dieta incluye por lo general semillas, frutas y en ocasiones invertebrados. Las palomas urbanas subsisten de los desperdicios, granos diversos y otros materiales alimenticios que les proporciona la gente intencional o involuntariamente.<sup>15</sup>

Según Vallejo y Colaboradores “La Criptococosis es una micosis oportunista, la cual tiene predilección por el sistema nervioso central. Afecta a pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes, y se adquiere por la inhalación de las esporas del hongo, pequeñas levaduras encapsuladas y probablemente también basidiosporas, presentes en el medio ambiente”.<sup>16</sup>

La meningitis criptococócica afecta a pacientes inmunocomprometidos y entre los factores de riesgo se encuentran: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), neoplasias como linfomas y diabetes. Esta afección se presenta en cinco por cada millón de personas. De los pacientes con SIDA, alrededor de entre 5 al 10% se infectan con *Cryptococcus*, de éstos el 90% desarrollan meningitis por

---

<sup>13</sup> TORO V; BREVIS P. Aislamiento presuntivo y caracterización de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* desde árboles en la región de O'Higgins y Maule, Chile, 2015. Disponible [en línea] <http://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/400> [Citado el 27 de marzo 2018].

<sup>14</sup> TAFUR, Johana y MONTES, Jesús. PLAN ESTRATÉGICO PARA EL CONTROL DE ROEDORES Y PALOMAS EN LA CORPORACIÓN DE ABASTOS DE BOGOTÁ S.A. Universidad de la Salle. 2014. Pag 3. Disponible [en línea] <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/17553/T14.14%20T125p.pdf?sequence=3> [Citado el 09 de junio del 2018].

<sup>15</sup> Ibid., p.3.

<sup>16</sup> VALLEJO D; BENAVIDES C; CEBALLO A; CAICEDO M. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en el casco urbano del municipio de Pasto, Colombia. 2016. Disponible [En línea] <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v15n1/v15n1a07.pdf> [Citado el 28 de marzo del 2018].

*Cryptococcus* particularmente cuando el recuento de CD4 es menor a 100 células/mm<sup>3</sup>. Es más frecuente en varones que en mujeres con una relación de 4:1, tal vez debido a la mayor exposición de los hombres a este microorganismo. Este hongo genera la infección oportunista de inicio en más de 50% de todos los enfermos con SIDA. Causa la preocupación que los pacientes con HIV-SIDA y criptococosis meníngea presenten una tasa de mortalidad del 6 al 25% durante las dos primeras semanas de tratamiento y del 40 al 70% a los 12 meses.<sup>17</sup>

En pacientes HIV negativos sin enfermedades subyacentes, el tratamiento adecuado cura casi la totalidad de los casos; sin tratamiento la mortalidad es de un 100%. La presentación clínica se caracteriza por cefalea, fiebre y malestar general, posteriormente puede observarse síndrome de hipertensión endocraneana, edema de papila, diplopía, náuseas, vómitos; al evolucionar, la enfermedad presenta rigidez de nuca, hipersensibilidad del cuello. En individuos inmunocompetentes la infección es autolimitada y poco sintomática.<sup>18</sup>

El hallazgo de *Cryptococcus neoformans* a partir de muestras ambientales en la ciudad de Cúcuta corresponde en su gran mayoría a excretas de paloma y suelos contaminados, como también se pueden encontrar en corteza, frutos y hojas.

La presente investigación tuvo como fin realizar un amplio tamizaje ambiental en diferentes parques principales de la ciudad de Cúcuta, en un intento de aislar *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* de diferentes especies de árboles, para determinar su presencia y para ampliar nuestros conocimientos sobre la ecología y la epidemiología de esta levadura patógena en nuestra ciudad.

Lo anterior permitirá en un futuro a las autoridades sanitarias y demás entidades competentes, tomar medidas preventivas en cuanto a las normas de bioseguridad adoptadas por comunidad susceptible en zonas de riesgo y de alta concurrencia, las cuales sean consideradas focos ambientales del hongo. Así, se espera que los resultados de este trabajo contribuyan a un mejor conocimiento del comportamiento ecoepidemiológico del mismo en el municipio de San José de Cúcuta.

---

<sup>17</sup> CASTRO M, CORDOVA H. Características clínicas y laboratoriales de la coinfección VIH/SIDA y criptococosis meníngea en el Hospital Clínico Viedma de Cochabamba, Bolivia. 2014. Disponible [en línea] <http://www.scielo.org.bo/pdf/gmb/v37n2/v37n2a4.pdf> [Citado el 09 de junio del 2018].

<sup>18</sup> Ibid., p.2.

# 1. PROBLEMA

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La criptococosis es una micosis sistémica causada por el complejo de especies patógenas del género *Cryptococcus*: *C. neoformans* y *C. gattii*. Este hongo es una levadura encapsulada que se puede aislar del ambiente, y de excretas de palomas considerado este como su nicho ecológico. Se adquiere mediante la inhalación de esporas presentes en el medio ambiente, cuya manifestación clínica más grave es la afectación del sistema nervioso central (SNC) por lo que es considerada como un hongo oportunista, debido a su asociación con pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana, (VIH) aunque puede afectar incluso a individuos (VIH) negativos e inmunocompetentes.

En los últimos 25 años los casos de criptococosis humana han aumentado considerablemente, en gran medida debido a la supervivencia de enfermos con alteraciones en el sistema inmunológico. A partir de 1981, como consecuencia de la epidemia del Sida y otro tipo de condiciones de inmunosupresión, las infecciones por este hongo se han convertido en una causa importante de morbilidad y mortalidad. En la actualidad esta micosis se clasifica entre las tres infecciones oportunistas más importantes que conducen a la muerte en pacientes con Sida.<sup>19</sup>

La criptococosis se manifiesta más frecuentemente como meningoencefalitis subaguda o crónica. Los pacientes usualmente refieren cefalea intensa, con o sin fiebre, malestar general, visión borrosa o diplopía por varias semanas; los signos clínicos pueden estar ausentes o manifestarse como compromiso del estado de conciencia, papiledema, parálisis de nervios craneanos, o signos meníngeos.

El complejo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* puede afectar cualquier región anatómica, pero tienen predilección por el Sistema Nervioso Central (SNC). La infección cutánea puede ser primaria por inoculación directa del hongo en la piel o secundaria por diseminación hematógena desde otras regiones anatómicas. Las manifestaciones cutáneas son muy variadas y existen algunas características para diferenciar la forma primaria de la secundaria, las cuales se exponen posteriormente.<sup>20</sup>

---

<sup>19</sup> VALLEJO, D Op.Cit. Pp.63.

<sup>20</sup> TELLO M, GUTIERREZ E y Cols. Criptococosis.2013. En Revista Scielo. Disponible [en línea] <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v19n2/v19n2a08.pdf> [citado el 10 de junio del 2018].

En cuanto a la respuesta inmunológica del microorganismo según Waleed<sup>21</sup>, se considera que los macrófagos alveolares reconocen a *Cryptococcus spp* e inician la respuesta inmune a través de múltiples receptores como Dectin-1, Mincle receptor de manosa, receptores de tipo peaje (TLR). Todos ellos conocidos como receptores de reconocimiento de patrones moleculares de patógenos, PRRs y CD4. Se cree que el papel de los macrófagos y la fagocitosis es crítico durante la infección temprana que demuestra una mayor susceptibilidad.

Según los datos de la encuesta nacional de notificación pasiva de la criptococosis en Colombia, entre los años 2006 a 2010, un total de 526 casos fueron informados, la mayoría de los pacientes (76,6%) eran hombres, de los cuales el 74,9% entre 21-50 años de edad; el factor de riesgo más frecuente fue la infección por HIV (83,5%); en la población general la incidencia para el año 2010 fue de  $2,4 \times 10^6$  habitantes, mientras que en los pacientes con sida ésta aumentó a  $3,3 \times 10^3$ ; de 413 aislamientos de *Cryptococcus*, el 95,6% se identificaron como *C. neoformans var. grubii*, el 1% de *C. neoformans var. neoformans*. Es importante señalar que el 64% de los casos de criptococosis diagnosticados corresponden a Norte de Santander.<sup>22</sup>

No obstante, en esta micosis “La paloma juega un papel importante como portadora de hongos patógenos. Entre las enfermedades transmitidas por palomas al ser humano se encuentran la histoplasmosis, clamidiosis, y criptococosis. De ellas, la paloma urbana (*Columba livia*) es la más importante como reservorio del hongo.”<sup>23</sup>

El hábitat de las palomas en parques a nivel mundial se ha convertido en un factor de riesgo permitiendo la presencia de brotes de *C. gattii* la cual se ha encontrado en climas tropicales y subtropicales, sin embargo un brote de *C. gattii* en América del Norte en pacientes inmunocompetentes demostró que este patógeno presenta capacidad de resistencia a cambios drásticos en la adaptación a otros ambientes y temperaturas.

Por otra parte, los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* a partir de muestras ambientales han tomado importancia a nivel mundial debido a

---

<sup>21</sup> WALEED E, KIEREN A y Cols. Immunology of Cryptococcal Infections: Developing a Rational Approach to Patient Therapy. 2018. Revista Microbial Immunology [en línea] <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00651/full> [Citado el 10 de junio del 2018].

<sup>22</sup> ESCANDON P, LIZARAZO J; Criptococosis en Colombia: resultados de la encuesta nacional, 2006 – 2010. [Artículo disponible] [En: Chttps://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/707](https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/707) [consultado el 20 Noviembre del 2017]

<sup>23</sup> VALLEJO; D. BENAVIDES; C. CASTILLO; A. Op. Cit. Pp 64

la identificación de nuevos nichos ecológicos, y así mismo el reconocimiento a diversos focos de infección siendo estos de gran impacto para la población.

Sin embargo, Herket<sup>24</sup> afirmó que el complejo de especies de *C. gattii* se encontró inicialmente en áreas tropicales y subtropicales, pero durante las últimas dos décadas, la expansión a las regiones de clima templado se informó cada vez más. De mismo modo, los nichos ecológicos del complejo de *C. gattii* se han incrementado permitiendo estudios globales donde revelaron que una plétora de especies de árboles puede ser colonizada por estos patógenos, además se determinó que no está asociado a un género de árbol específico, pero que tiene una predilección por los desechos de plantas / madera en general.

“En contraste con lo anterior, *C. neoformans*, es el más común en EE.UU, mientras que se ha hallado *C.gattii* alrededor de eucaliptos en regiones tropicales y subtropicales de Australia, California, América Central, América del Sur y en la isla de Vancouver, Columbia Británica, durante un brote de criptococosis”.<sup>25</sup>

Así mismo, se han informado casos por *C. gattii* clasificado como un microorganismo restringido a zonas tropicales y subtropicales, sin embargo en el año 2000 se reportó la primera epidemia de Criptococosis en el mundo por *C. gattii*, en la isla de Vancouver, Canadá, la cual afectó a humanos y animales inmunocompetentes generando un incremento inusual en la incidencia de casos, indicando que esta especie puede también tener un rango ecológico más amplio del que se había reconocido. De 10.548 aislamientos de *Cryptococcus spp* 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 de los cuales 1.958 (19%) de las fuentes ambientales y veterinarias.<sup>26</sup>

---

<sup>24</sup> HERKET, P. Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in Developing Countries. En Revista Journal of Fungi. 2017. [Artículo en línea] Disponible en: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/4/62/htm> [Consultado el 10 de junio del 2018]

<sup>25</sup> PERFECT JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease update by the Infectious Diseases Society of America. Clinical infectious diseases. 2010;50(3):291-322

<sup>26</sup> ACEVEDO, Lilia. Genotipos de aislamientos de *Cryptococcus* de pacientes y muestras ambientales del Instituto Nacional Cardiopulmonar, utilizando PCR-RFLP URA5- Tegucigalpa, Honduras, 2015. [consultado 19 noviembre 2017] [Artículo disponible] En: <http://repositorio.unne.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/467/RIUNNE%20%20Tesis%20de%20Maestria%20%20Acevedo%20Almendarez%20Lilia%20Mercedes.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

En el ámbito regional, según Escandon<sup>27</sup> en el estudio realizado en nuestro país en busca del hábitat de *C. gattii* en Cúcuta, se logró recuperar el primer aislamiento del serotipo C reportado en la literatura el cual estuvo asociado con almendros (*Terminalia catappa*). En el seguimiento de los almendros reportados como positivos, se logró recuperar el hongo en 19,3% de las muestras, especialmente en aquellas asociadas con uno de los árboles estudiados. Referenciaa lo anterior, se destaca que en los sitios de estudio las especies arbóreas de más prevalencia correspondieron a *Oiti* (*Licania tomentosa*) y *Ficus* (*Ficus benjamina*) de los cuales no hay estudios con reportes de aislados de *Cryptococcus* en la ciudad.

Tomando en cuenta todo lo anterior, se requiere en la actualidad de la caracterización del nicho ecológico de especies patógenas de *Cryptococcus* spp, y de las diversas especies arbóreas que se han relacionado con el hongo. Por lo cual, el presente trabajo tuvo como propósito determinar nuevos nichos ambientales, que permitan el reconocimiento de los focos de proliferación del hongo; resaltando que su población fueron parques principales o de alta concurrencia, lo cual permitirá orientar nuevas investigaciones prospectivas que conlleven a la caracterización de los hábitat del hongo en la ciudad de Cúcuta.

## 1.1 1.2 FORMULACION DEL PROBLEMA

¿Existe *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* en aislados ambientales provenientes de parques del Municipio San José de Cúcuta?

## 1.2 1.3 OBJETIVOS

**1.2.1 1.3.1 Objetivo general.** Determinar la presencia de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* a partir de los aislados ambientales provenientes de parques del Municipio San José de Cúcuta?

**1.2.2 1.3.2 Objetivos específicos.** Identificar *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* a partir de los aislados ambientales, mediante el empleo de pruebas directas.

Caracterizar genéticamente las cepas de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, mediante el empleo de técnicas moleculares.

---

<sup>27</sup>ESCANDON, Patricia. Recuperación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C a partir de detritos de almendro,2010.[consultado 19 noviembre 2017].[Artículo disponible] En: file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/1089-4710-1-PB%20(2).pdf

## 1.4 JUSTIFICACION

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*, presentes naturalmente en el ambiente, específicamente en suelo, polvo y excretas de paloma, entre otros, por lo que raramente causan afectación de la salud humana, salvo en grupos poblacionales altamente susceptibles como individuos infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana, VIH, o bien que padecen otras inmunodeficiencias secundarias a causa de: desordenes linfoproliferativos, tratamiento inmunosupresor prolongado, enfermedades como diabetes, sarcoidosis, Lupus Eritematoso Sistémico, trasplante de órgano y trasplante de médula ósea, pudiendo afectar hasta el 6% de los individuos con afectación de la inmunidad celular, por lo que éste género es considerado patógeno accidental para humanos.

La enfermedad se ha relacionado con la exposición de los pacientes a excreciones de aves. De ellas, la paloma urbana (*Columba livia*) es la más importante como reservorio del hongo. Estudios anteriores donde se aislaron *C. neoformans* de excretas de palomas urbanas (*Columba livia*), siendo el primero en establecer la relación existente, y actualmente consolidada, entre el microorganismo y las heces de estas aves, debido a que raramente desarrollan signos clínicos asociados a la enfermedad y sirven como un reservorio potencial de infección en humanos, la cual no sucede por la transmisión directa con aves sino más bien de la exposición a los organismos en el medio ambiente.<sup>28</sup>

Según Quintero<sup>29</sup> en sustratos de tipo vegetal *C. neoformans* puede subsistir y desarrollarse gracias a que la materia orgánica en descomposición le provee de los requisitos nutricionales básicos, así como de un hábitat. Además, la enzima lacasa asegura la supervivencia de la levadura en estos lugares. Se han descrito recuentos similares y aún mayores en otros estudios en los que la densidad poblacional es una variable relacionada con el tipo de reservorio. Los resultados de esta investigación sugieren que al analizar las fuentes de tipo vegetal es más probable encontrar altas densidades del hongo en árboles con materia en

---

<sup>28</sup> MEDINA R, ACOSTA M; 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. 2004. file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/0294260\_00000\_0000%20(1).pdf [ Consultado el 18 de septiembre del 2017]

<sup>29</sup> ELIZABETH QUINTERO; E. QUINTERO; A. RUIZ. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca Colombia [Artículo científico en línea ] En: Revista Iberoam Micol 2005; Vol. 5, pp 93-98 [5 septiembre del 2017] Disponible: <http://reviberoammicol.com/2005-22/093098.pdf>

descomposición (como fue el caso de los eucaliptos) que en lugares con escasa cantidad de detritos (como ocurre con los árboles de almendro).

En un estudio se determinó que el eucalipto no es el hábitat primario para *C. gattii* pero la presencia de materia orgánica en descomposición (especialmente madera) en el suelo o en las oquedades de estos árboles proporciona el substrato favorable para la propagación extensa y clonal de las levaduras.

En Colombia para el año 2012 se reportaron 8.196 casos de infección por VIH y 2.216 muertes asociadas, lo que refleja una mortalidad asociada del 27 % y en Norte de Santander, en particular, la incidencia de infección por VIH es de 22,7 casos por cada 100.000 habitantes/año (Ministerio de Salud, Boletín Epidemiológico, 2013). Así, una de las más lamentables micosis oportunistas en pacientes VIH positivos corresponde a la meningitis criptocócica, con una incidencia cercana al 8% y mortalidad de hasta el 12% en países desarrollados.

En la ciudad de San José de Cúcuta se ha evidenciado una muy alta letalidad en pacientes VIH positivos con criptococosis meníngea, resaltando la necesidad de tomar medidas preventivas que posibiliten un control de éste evento en población susceptible en nuestra región. A partir de 1209 encuestas analizadas por Lizarazo en el periodo de 1997 a 2011, se encontraron 45 casos causados por *C. gattii* y se vislumbró que Norte de Santander tenía la incidencia más alta (0,81 casos / millón / año), lo que representó el 33,3% de todos los casos.

De manera relevante, existe registro de la detección de especies de *Cryptococcus gatii* a partir de muestras clínicas de pacientes VIH positivos y ambientales: *Terminalia catappa* (Almendros) en San José de Cúcuta, aunque sólo en áreas circunscritas al sitio de residencia de los casos, por lo que se requiere llevar a cabo una revisión exhaustiva y más amplia, abarcando zonas públicas de gran concurrencia, como los parques céntricos de la ciudad, haciendo además uso de herramientas de biología molecular que permitan establecer claramente si está presente *C. gattii* o *C. neoformans*.

El presente estudio buscó aportar nueva información en cuanto a la identificación de los nichos ecológicos, teniendo en cuenta el tipo de muestra ambiental, especie arbórea y el parque con mayor prevalencia. Lo cual contribuirá al conocimiento del comportamiento eco-epidemiológico teniendo en cuenta la gravedad del riesgo que representa su infección para población inmunocomprometida, como es el caso de pacientes infectados por VIH, evento significativo en nuestra región y que incluso ésta micosis puede llegar a afectar a individuos inmunocompetentes, como ha sido referido especialmente para *C. gattii*.

Así mismo, disponer de este tipo de información permitirá a futuro que las autoridades sanitarias y demás entidades competentes tomen medidas

preventivas respecto a la concurrencia de estas zonas de riesgo o control a modo de prevención sobre los focos ambientales.

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 ANTECEDENTES

En el 2017, Herkert describió que la criptococosis es una infección sistémica causada por especies de la levadura encapsulada *Cryptococcus*. La enfermedad puede aparecer en huéspedes inmunocomprometidos e inmunocompetentes y se adquiere por la inhalación de propágulos infecciosos presentes en el medio ambiente. *Cryptococcus spp* se distribuye en una gran cantidad de nichos ecológicos, como el suelo, los excrementos de las palomas y los huecos de los árboles, y cada año se descubren nuevos embalses, lo que ayuda a los investigadores a comprender mejor la epidemiología de la enfermedad. Así como la ecoepidemiología de *C. gattii* complejo de especies enfocado en casos clínicos y reservorios ecológicos en países en desarrollo de diferentes continentes. También se discuten algunos aspectos importantes relacionados con la susceptibilidad antifúngica de diferentes especies dentro del complejo de especies de *C. gattii* y aportamos nuevos conocimientos sobre la taxonomía revisada de *Cryptococcus*.

En América latina *C. gattii* en sentido estricto (genotipo VGI) es un importante agente etiológico de la criptococosis entre pacientes inmunocompetentes de Brasil, Colombia, México, Honduras, y Perú. Recientemente, en Argentina se reportó un caso de neumonía en un paciente de trasplante renal. Este patógeno también ha estado involucrado con una infección mortal en Cuba en un Leopardo importado de Sudáfrica. En la naturaleza, esta especie se encontró en excretas de Psittaciformes en Brasil y algunas especies de árboles, como *Tipuana tipu*, *Grevillea robusta* y *Eucalyptus spp*. En Argentina y Colombia en *Ficus spp*.<sup>30</sup>

En el 2013, Mortenson realizó un estudio para determinar la presencia de *C. gattii* en parques urbanos seleccionados de las ciudades de Oregón dentro del Valle de Willamette, donde se han diagnosticado casos humanos y animales de *C. gattii*. Los parques urbanos se muestrearon debido a la superposición espacial y temporal de humanos, animales de compañía y vida silvestre. De los 64 parques muestreados, *Cryptococcus spp* se encontró en 3 parques, un aislado en un parque del condado de Marion en un abeto Douglas de la costa y era *C. gattii* de tipo molecular VGIIc, tipo de apareamiento alfa. Además, desde un parque en el condado de Lane, se encontraron dos aislamientos en dos secciones de mantillo de corteza del mismo pasillo. Estos dos aislados fueron *C. gattii* de tipo molecular

---

<sup>30</sup> Herkert,P. Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in Developing Countries [Artículo en línea].En:Rev Journal of Fungi Noviembre 2017,vol 3(4).n°62.pp.1-14[consulta 09 de junio 2018]Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5753164/>

VGIIa, tipo de apareamiento alfa. No se identificaron más muestras positivas. Los subtipos genotípicos identificados incluyeron *C. gattii* VGIIa y VGIIc, ambos considerados altamente virulentos en modelos de hospedadores murinos. Los resultados de este estudio sugieren una baja prevalencia de *C. gattii* en los parques muestreados del Valle de Willamette o una baja tasa de colonización en los mismos parques aunque estos se ubicaron en ciudades y sus alrededores donde *C. gattii* había sido previamente confirmado en humanos y animales.<sup>31</sup>

En el 2015, Godoy describió que la criptococosis es una micosis sistémica oportunista causada por dos especies levaduriformes capsuladas, *C. neoformans* causa infecciones en individuos inmunodeprimidos principalmente y *C. gattii* lo hace tanto en inmunocompetentes como en personas inmunodeprimidas. *C. neoformans* es comúnmente asociado a excretas de palomas mientras que la especie de *C. gattii* es encontrado en especie arbóreas como eucaliptos, ficus y otros. *C. neoformans* se subdivide en dos variedades distintas *neoformans* (VNIV) y *grubii* (VNI y VNII) en cambio *C. gattii* presenta como genotipos la VGI, VGII, VGIII, VGIV. En este estudio se emplearon muestras clínicas aisladas desde LCR y hemocultivos de pacientes provenientes de tres ciudades distintas (Concepción, Valdivia, y Osorno) del sur de Chile entre el 2009 y 2011. Para poder identificar las 20 cepas de levaduras se utilizaron ensayos bioquímicos y morfológicos, del total de la muestra el 60% provenían de pacientes VIH positivo y un 40% correspondían aislamientos solo de la ciudad de Valdivia. En esta primera identificación los resultados arrojaron que el 100% de las cepas analizadas correspondían a la especie de *C. neoformans*. Se emplearon dos pruebas moleculares, PCR Fingerprinting y RAPD, para determinar el polimorfismo de las cepas de *C. neoformans*. Los resultados indicaron que el número y tamaño de las bandas corresponden a este genotipo VNIV (var. *neoformans*) igual con tres subgrupos genéticos distintos mientras que el 5% no evidencio bandas. Finalmente podemos concluir que el agente etiológico para criptococosis en el sur de Chile corresponde a la misma especie *C. neoformans* var. *neoformans* genotipo VNIV que podría estar asociado al clima de la región.<sup>32</sup>

En el 2017, Sánchez describió la neurocriptococosis es una infección fúngica oportunista que representa un alto costo en vidas humanas y para la economía de los países. Sus agentes causales, las especies del complejo *Cryptococcus*

---

<sup>31</sup> Mortenson, J. Detección de *Cryptococcus gattii* en Parques urbanos seleccionados del Valle de Willamette, Oregon [Artículo en línea]. En: Rev Mycopathologia, vol 175 .n°. pp.351-355 [consulta 09 de junio 2018] Disponible: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11046-013-9614-7>.

<sup>32</sup> GODOY, P. Caracterización fenotípica y tipificación molecular de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de muestras clínicas en Hospital terciarios del Sur de Chile. Universidad Austral de Chile. 2015 [consulta 09 de junio 2018] Disponible [http://repositorio.conicyt.cl/bitstream/handle/10533/181475/BARRIA\\_YOLANDA\\_2663M\\_PARTE\\_I.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.conicyt.cl/bitstream/handle/10533/181475/BARRIA_YOLANDA_2663M_PARTE_I.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

*neoformans* / *Cryptococcus gattii*, tienen una fase sexuada y otra asexuada, cuatro serotipos principales y ocho variedades moleculares con diferencias clínico-epidemiológicas, fenotípicas y de sensibilidad a los antifúngicos. Se determinó el tipo de apareamiento, el serotipo y la variedad molecular mediante reacción en cadena de la polimerasa y análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción de 27 aislamientos levaduriformes previamente identificados como *C. neoformans* mediante métodos convencionales. Los aislamientos fueron recuperados del líquido cefalorraquídeo de pacientes con síndrome neurológico seropositivos para HIV, internados en el Hospital de Infectología “Dr. José Daniel Rodríguez Maridueña”, entre diciembre de 2013 y enero de 2015. Se demostró el amplio predominio de *C. neoformans* del serotipo A, MAT $\alpha$  y el genotipo VNI entre los aislamientos estudiados. Estos datos son similares a los obtenidos en otros países y son los primeros de su tipo en Guayaquil, Ecuador, por lo cual constituyen un aporte importante al conocimiento de la criptococosis en esta ciudad.<sup>33</sup>

En el 2018, Escandón y Lizarazo realizaron la vigilancia pasiva y voluntaria de cryptococosis en Colombia desde 1997, revelando su importancia tanto en la gente de inmunocompetente como inmunosuprimidos. El trabajo presente detalla los datos nacionales juntados en 1997-2016, por un análisis retrospectivo de la información tranquila en el estudio. De un total de 1974 casos hizo un informe, una incidencia total de 0.23 casos por 100,000 personas fue encontrada. Esta incidencia se elevó a 1.1 casos por 1000 personas con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido (el SIDA). Cryptococosis es más común en adultos masculinos jóvenes (26-40 años), con una proporción masculino: femenino de 3.9:1 en la población general y 5.4:1 en el Virus de Inmunodeficiencia Humano (el VIH) pacientes. Mediante pruebas directas era la forma más común de diagnóstico en el 96.3 % de casos, recuperando *C. neoformans* la especie en el 87.5 % y *C. gattii* en el 3.1 % de muestras. VNI era el tipo molecular más frecuente (del 96.1 %), mientras VGII predominó en *C. gattii* aísla (el 54.3 %). La temprana mortalidad fue reportada en el 47.5 % de pacientes. Cryptococosis es una enfermedad importante oportunista en Colombia siendo un patógeno primario en pacientes inmunocompetentes. Finalmente se concluye la importancia de inclusión de cryptococosis como una enfermedad de notificación obligatoria, que deberá tener diagnóstico y tratamiento oportuno, generando mejores resultados en los pacientes.<sup>34</sup>

---

<sup>33</sup> Sanchez, S. Caracterización molecular de los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* de pacientes con HIV, Guayaquil, Ecuador [Artículo en línea]. En: Rev Biomedica ,vol 37.n° 3.pp.1-7[consulta 09 de junio 2018] Disponible: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3322/3666>

<sup>34</sup> Escandon,P.Lizarazo, J. Cryptococosis in Colombia: Compilation and

## 2.2 MARCO TEORICO

**2.2.1 Agente Etiológico.** *Cryptococcus* es una levadura esférica encapsulada que pertenece al filo de los basidiomicetes, cuyo diámetro oscila entre 5 – 10 µm, y su reproducción es mediante gemación. Estas dos especies de *Cryptococcus* son comúnmente encontradas en suelo con rangos de pH de 4,0 a 7. Estas levaduras son protótrofas para la mayoría de aminoácidos, también puede metabolizar lípidos y azúcares, y pueden utilizar gran variedad de fuentes de carbono para su crecimiento.<sup>35</sup>

Las dos especies que conforman el complejo *C. neoformans* / *C. gattii* han mostrado capacidad de reproducción sexual o telomorfa y reproducción asexual o anamorfa.

**2.2.2 Taxonomía.** Hasta el año 2011 se han descrito más de 104 especies del género *Cryptococcus spp.* Dentro de las dos especies actualmente aceptadas, cuatro serotipos, distinguidos por el polisacárido capsular, y ocho principales moléculas tipos, que son posibles especies crípticas, han sido reconocidos. Estos tipos moleculares principales han sido identificados por diferentes metodologías de genotipo, incluida la toma de huellas dactilares PCR amplificado polimorfismos de longitud de fragmento (AFLP) fragmento de restricción Enfocado a polimorfismos de longitud (RFLP) y tipificación de secuencia (MLST) .

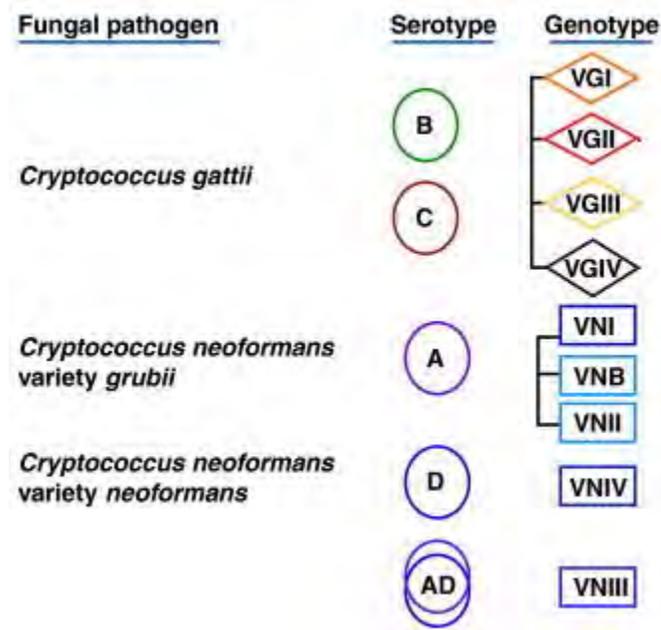
En *C. neoformans* el serotipo A, comprende la molécula tipos VNI (VNB) y VNII, el serotipo D, tipo molecular VNIV, y el híbrido AD entre los serotipos A y D, molecular tipo VNIII. En *C. gattii* los serotipos B y C comprenden tanto tipos moleculares VGI, VGII, VGIII y VGIV. De estos, siete tipos moleculares se han propuesto recientemente para elevar a nivel de especie, aunque la cuestión de la definición de la especie todavía es controversial entre la comunidad de investigación criptocócica, resultando en el reconocimiento de *C. neoformans* y *C. gattii* como complejos de especies.<sup>36</sup>

---

Analysis of Data from Laboratory-Based Surveillance .[Artículo en línea].En:Rev Journal of Fungi Enero 2018,vol.4 n°32.pp.1-14[consulta 09 de junio 2018]Disponible: <file:///C:/Users/PC/Documents/colombia%20crypto%202018.pdf>.

<sup>35</sup> SCHMIDT A, Dimorphism in human pathogenic and apathogenic yeasts, [Libro en Línea] En: <https://books.google.com.co/books?id=UGqtClqStAYC&pg=PR8&dq=Alspaugh,+J.+A.,+R.+C.+Davidson+%22Morphogenesis+of+Cryptococcus+neoformans.%22&hl=es&sa=X&ved=0ahUKewjyZKKg67WAhWB6yYKHSXYAugQ6AEIKzAB#v=onepage&q=Alspaugh%2C%20J.%20A.%2C%20R.%20C.%20Davidson%20%22Morphogenesis%20of%20Cryptococcus%20neofmans.%22&f=false> año 2000 Editorial Karger, vol 5, pp 217-38.

<sup>36</sup> Firacative C.Trilles L.Y Cols. Advances in the Understanding of the *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* species complexes and cryptococcosis, 2017. [Artículo en línea]. <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/4/7/a019760.full.pdf+html> . [Citado 10 junio 2018].



**Figura 1. Firacative C. Advances in the understanding of the *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* species complexes and cryptococcosis. 2017.**

### 2.2.3 Factores de Virulencia

#### 2.2.3.1 Cápsula.

La capsula de *Cryptococcus neoformans* es un polisacárido compuesto principalmente por xilosa, manosa y ácido glucoronido. Esta composición particular de la capsula lo distingue de otros hongos de interés clínico, ya que no contiene almidón, glicógeno ni sulfato de mucoitina. por el contrario contiene gran variación en la estructura polisacárida, produciendo diferentes reacciones antigénicas y en base a ello, las cepas de *Cryptococcus neoformans* se divide en cuatro serotipos A, D, B y C respectivamente.<sup>37</sup>

---

<sup>37</sup> RAMÍREZ, A. Estudios de los factores de Patogenicidad de *Cryptococcus gattii*, 2008[Artículo en línea] <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2008/tdx-0925109-111919/evr1de1.pdf> [citado el 10 de junio del 2018].

**2.2.3.2 Melanina y Lacasa.** Es la capacidad de producir melanina debido a la actividad enzimática de la Lacasa (Fenol oxidasa), esta enzima también se ha descrito en otros hongos patogénicos del género de *Histoplasma*, *Blastomyces* y *Sporothrix*. La melanina se produce en presencia de compuestos dihidroxifenólicos o poliaminobencénicos, de oxígeno molecular y en condiciones de bajo contenido de glucosa. La lacasa del género *Cryptococcus* se encuentra unida a la pared celular y a la melanina resultante de su actividad se le atribuye efectos de protección contra los antioxidantes, dando soporte a la integridad de la pared celular, protección frente a temperaturas extremas, interferencia con la fagocitosis mediada por anticuerpos y con la respuesta de los linfocitos T.<sup>38</sup>

**2.2.3.3 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.

**2.2.3.4 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. Induciendo la respuesta del sistema inmune hacia el predominio de citoquinas Th2, evitando la eliminación de la infección. Aunque la ureasa es un factor importante para la invasión cerebral criptocócica, el sistema de activación enzimática no ha sido estudiado.<sup>39</sup>

**2.2.3.5 Fosfolipasa.** 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. 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.<sup>40</sup>

---

<sup>38</sup> Ibid., p19

<sup>39</sup> COELHO Carolina, CASADEVALL Arturo. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Advances in applied microbiology*. [Artículo científico] 2014; vol 87, pp 1-41 [consultado el 8 de marzo 2017] Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128002612000013?via%3Dihub>

<sup>40</sup> RAMÍREZ, A. Op.Cit.Pp20

**2.2.3.6 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. Los estudios preliminares indican que la formación de biofilms podría participar en la virulencia de *Cryptococcus*.<sup>41</sup>

**2.2.4 Criptococosis.** Es considerada como una micosis sistémica de tipo oportunista, adquirida por la inhalación de esporas de la levadura del género *Cryptococcus spp.* Las micosis sistémicas son causadas por patógenos primarios, mientras que *C. neoformans* es considerado un patógeno oportunista, siendo estos hongos saprófitos con potencial patogénico y con capacidad de causar enfermedad en personas inmunosuprimidas.<sup>42</sup>

**2.2.5 Presentación Clínica de la Enfermedad.** La criptococosis se adquiere por inhalación aunque también producirse a través de una inoculación directa o herida en la piel siendo esta considerada como la micosis más importante que afecta el sistema nervioso central (SNC), y la forma clínica más común de esta enfermedad es la meningoencefalitis. El desarrollo temprano de la criptococosis se caracteriza por una infección respiratoria de tipo primario, usualmente asintomático, debido a que los propágulos del hongo una vez llegan al pulmón tienden a diseminarse por vía sanguínea al SNC, sistema óseo y otros tejidos como piel, ojos y mucosas.<sup>43</sup>

Por largos periodos de tiempo antes que se diagnostique la criptococosis. Entre el 70% y 90% de los pacientes inmunocompetentes, presentan meningitis subaguda o una meningoencefalitis con cefalea, fiebre, cambios en la personalidad, pérdida de la memoria y letargia, que inician típicamente luego de un periodo de evolución de 2-4 semanas luego de la infección. Sin embargo, hay una gran variabilidad clínica, pudiendo los pacientes tener

---

<sup>41</sup> RODRIGUES Marcio, NAKAYASU Ernesto et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence [Artículo científico en línea] En: Sociedad Americana de Microbiología 2008; vol. 7, pp 58-67. [consultado 12 de marzo del 2017] Disponible: <http://ec.asm.org/content/7/1/58.full> .

<sup>42</sup> Kwon-Chung, J. K., T. Boekhout, E. 2002. "Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. honduricus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenozygomycetes, Tremellomycetidae)." [Artículo científico en línea] *Taxon* vol 51 N°4, pp 804-6 [consultado 9 Marzo del 2017] Disponible: <http://www.westerdijknstitute.nl/images/ResearchGroups/Publications/2002KwongChung0001.pdf>

<sup>43</sup> BARÓ, Epidemiología de la Criptococosis en España. Caracterización de los Aislados de *Cryptococcus neoformans*. [Artículo en línea] <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3864/mtbt1de2.pdf?sequence=1>. [citado 10 de junio 2018].

cefalea durante pocos días, intermitentemente durante meses o simplemente no presentar cefalea, vomito ni signos de irritación meníngea.<sup>44</sup>

Por el contrario, los pacientes inmunocomprometidos desarrollan un cuadro clínico a los pocos días de la inhalación de propágulos, caracterizado típicamente por cefaleas fuertes, fiebre, náuseas, vómito, malestar general, visión borrosa, pérdida de memoria, letargia, alteraciones en la conciencia, irritabilidad, cambios en la personalidad, y en algunos casos se pueden presentar estados de coma.

Existen diferencias entre las formas clínicas de las infecciones causadas por *C. neoformans* y *C. gattii*, las cuales están determinadas según el hospedero, la respuesta inmune, los hallazgos clínicos y paraclínicos. El cuadro clínico desarrollado por *C. gattii* se diferencia del observado en *C. neoformans*, puesto que presenta una mayor incidencia de criptococomas en el pulmón y el cerebro, una mayor morbilidad a nivel neurológico y una menor respuesta al tratamiento antifúngico.<sup>45</sup>

**2.2.5.1 Cryptococcosis Pulmonar.** La principal vía de entrada de la levadura y eventualmente basidiosporas ambientales de *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii* es la vía respiratoria. La inhalación de las esporas fúngicas ocasiona una primoinfección pulmonar. La cryptococcosis pulmonar suele ser asintomática, ocasiona síntomas específicos que dificultan el diagnóstico. En la mayoría de los casos puede presentarse con tos, fiebre, disnea, pérdida de peso y dolor pleurítico.<sup>46</sup>

Las lesiones pulmonares se pueden presentar en cualquier zona, y las imágenes radiológicas suelen ser también inespecíficas. Se observan filtrados localizados, no muy extensos. Suelen ser lesiones pequeñas, la mayoría curan sin dejar granulomas.

---

<sup>44</sup> LOPEZ, P. R. (2002). "Cryptococcosis del sistema nervioso central." [Artículo científico en línea] En: Revista Mexicana de Neurociencia vol 3(1): pp 34-6. [19 de Marzo del 2017] Disponible en: <http://revmexneuroci.com/wp-content/uploads/2014/07/Nm0021-05.pdf> .

<sup>45</sup> SORRELL, T. C. (2001). "Cryptococcus neoformans variety gattii." [Artículo científico en línea] En: Revista Médica Micología vol 39, pp 155-68. [19 de Marzo del 2017] Disponible: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/mmy.39.2.155.168>.

<sup>46</sup> RAMÍREZ, A. Op.Cit.Pp 9.

**2.2.5.2 Criptococcosis del Sistema Nervioso Central.** La infección por *Cryptococcus spp.* Es la principal causa de meningitis fúngica en pacientes inmunocomprometidos, con elevados índices de morbilidad y mortalidad. También se presenta en pacientes sin compromiso inmunológico. Afectando más al sexo masculino. 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. 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. 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. Los criptococomas en pulmón y cerebro se han reportado de niños inmunocompetentes con meningoencefalitis por *Cryptococcus*. El 25% de los pacientes con meningitis pueden presentar criptococomas.<sup>47</sup>

**2.2.5.3 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 spp.*, en pacientes con linfoma de células T, pacientes con hemodiálisis, diabéticos y tratamiento con esteroides entre otros. 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. 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. También puede presentarse en personas que trabajan con *Eucalyptus*. *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.

---

<sup>47</sup> GUTIERREZ E. Criptococosis, 2013. [consultado 19 de marzo del 2017]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v19n2/v19n2a08.pdf>.

**2.2.5.4 Criptococosis ocular.** Sus manifestaciones oculares habitualmente derivan de una meningitis. Puede producir en oftalmitis y atrofia del nervio óptico. El ojo puede ser afectado, con pérdida parcial o total de la visión.

**2.2.5.5 Criptococosis ósea y visceral .** La criptococosis puede causar disfunción hepática en pacientes inmunocompetentes. Se han publicado más de 80 casos de osteomielitis por *Cryptococcus spp.*

### 1.2.3 2.2.6 Diagnóstico

**2.2.6.1 Muestras Ambientales.** *Cryptococcus spp* se puede obtener a partir de aislados ambientales como cortezas de árboles, material orgánico en estados de descomposición, frutos secos, y excrementos de palomas.

**2.2.6.2 Identificación.** Las muestras se siembran en agar semilla de girasol (o agar Guizotia), a 25-28 °C que es un medio usado para aislar *Cryptococcus spp* que al metabolizar la *Guizotia abyssinica*, produce melanina originando un color marrón oscuro. El Cloranfenicol adicionado al medio lo convierte en un medio selectivo, 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. 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 género.<sup>48</sup>



**Figura 2. Agar Guizotia abyssinica. Colonias de Cryptococcus sp pigmentadas con color marrón.**

Tomado de la Universidad de Santander por Moreno Eliana, Guerrero Erika, Carrascal Kelly, año 2017.

<sup>48</sup> Acosta B; Rodríguez J. Criptococosis Micología ULPGC Clínica San José, 2010. Disponible en: <http://www.webs.ulpgc.es/micologiveterinaria/criptococosis.pdf>.

La identificación fenotípica se realiza por las pruebas de ureasa, capacidad de desarrollo a 37 °C, y la presencia de cápsula. 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, 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.

Sin embargo, el método de referencia para el diagnóstico de criptococosis, es la presencia de la levadura observada con tinta china a partir del cultivo de la cepa aislada. 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.

**2.2.7 Epidemiología:** La criptococosis es una enfermedad con capacidad de afectar a individuos de cualquier edad, haciendo la salvedad de que es una enfermedad que había sido reportada como muy rara en niños, inclusive aquellos infectados con VIH; sin embargo, existen reportes de criptococosis en niños con edad promedio de 7,8 años de edad, haciéndose evidente zonas de alta prevalencia en Pará, Brasil. El Grupo Colombiano para el Estudio de la Criptococosis, en la última encuesta nacional, reportó 25 casos en niños (2,7%).<sup>49</sup>

Los datos disponibles demuestran que *C. neoformans* var. *grubii* es la especie más comúnmente aislada de enfermos inmunodeprimidos con criptococosis, no obstante la variedad *neoformans* (serotipo D) puede tener una prevalencia elevada con respecto al serotipo A, en algunas áreas geográficas, como por ejemplo en Estados Unidos (New York City). Así mismo, la var. *grubii*, es la que se aísla más frecuentemente de muestras ambientales, ya que tiene predilección por suelos contaminados con excrementos de aves, especialmente de palomas comunes (*Columba livia* doméstica)

---

<sup>49</sup> Lizarazo, J., M. Linares, et al. (2007). "Estudio clínico y epidemiológico de la criptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta Nacional, 1997 – 2005." [Artículo científico en línea] En: Biomédica vol 27, pp 94-109. [ consultado 2 de Abril 2017] Disponible: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/236>



**Figura 3. Paloma común (*Columba livia*). Tomado del Parque Santander Cúcuta-Norte de Santander, Colombia, año 2017.**

Se ha observado una marcada tendencia a nivel mundial de mayor infección en individuos de sexo masculino. En Colombia se mantiene esta tendencia, puesto que un 82,7% de los casos han sido reportados en hombres jóvenes. A nivel epidemiológico existen diferencias entre las dos especies que conforman el complejo *C. neoformans* / *C. gattii*. *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A) y *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D) se comportan como patógenos oportunistas, causando enfermedad principalmente en personas inmunocomprometidas mientras que *C. gattii* (serotipos B y C) es considerado un patógeno primario dada su capacidad de desarrollar enfermedad en personas inmunocompetentes. La incidencia de criptococosis a causa de *C. neoformans* var. *grubii* ha aumentado de forma significativa en los últimos años, dado el aumento a nivel mundial de pacientes con sida. Actualmente se considera que el 95% de los casos de criptococosis a nivel mundial son causados por *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A). A pesar de que *C. gattii* tiende a generar infección en personas inmunocompetentes, presenta una baja frecuencia de infección. Dentro de esta especie, se conoce que el serotipo B es el de mayor prevalencia.<sup>50</sup>

En Colombia en el año de 1995 se tenía reportada una mortalidad entre el 66 y 100%, debido a tratamientos antimicóticos inapropiados. La criptococosis es una enfermedad que también afecta una gran variedad de especies animales, tales como: perros, gatos, ovejas, caballos, comadreas, marsupiales, koalas, cabras, urones entre otros. Hay reportes de aislamientos de *C. neoformans* var. *grubii* recuperados a partir de excremento de aves; sin embargo, se considera que la enfermedad es

---

<sup>50</sup> LIZARAZO, J., Op. Cit. pp 101.

extremadamente rara en aves, posiblemente a causa de la elevada temperatura corporal que éstas presentan.<sup>51</sup>

Estudios han revelado factores de riesgo relacionados con exposición a fuentes ambientales del hongo y factores aún no identificados propios del hospedero. También se ha reportado que enfermedades crónicas a nivel pulmonar, enfermedades como cáncer y alteraciones en el sistema inmune, son factores que facilitan la colonización de *Cryptococcus spp*, sin embargo no predisponen un desarrollo de criptococosis pulmonar o diseminada.<sup>52</sup>

**2.2.8 Criptococosis en Colombia:** La criptococosis a nivel del SNC ha venido siendo descrita desde 1956, contándose con reportes en diferentes partes del país. En los últimos años, debido al incremento en el número de casos de pacientes con Sida, se ha observado un aumento significativo en la frecuencia de criptococosis. En la década comprendida entre 1980 y 1990 se presentó un incremento en la frecuencia de criptococosis de cuatro veces más, al pasar de 72 casos en 1980 a 295 casos en 1990. Este incremento se debió principalmente a pacientes con criptococosis que presentaron coinfección con VIH. En el periodo comprendido entre 1990 y 1995, se reportó un aumento en la proporción de este tipo de pacientes del 27% a 80,4%. En el año 2001 se reportó una incidencia de 2,3 casos por millón de habitantes y una incidencia de 4,7 casos por cada cien mil pacientes VIH positivo.<sup>53</sup>

En el último estudio epidemiológico realizado por el Grupo Colombiano para el Estudio de la Criptococosis, que comprende un periodo de 9 años (1997-2005), se reportó una incidencia promedio anual de 2,4 casos por millón de habitantes, pero en pacientes con Sida la incidencia fue de 3,0 casos por cada mil habitantes. El 82,7% de los casos reportados, se presentó en hombres jóvenes, y un 2,5% se presentó en niños. El 95,7% de casos reportados fueron por neurocriptococosis, el 2,9% fueron por formas pulmonares, 0,5% fueron por lesiones a nivel cutáneo, 0,2% por formas ganglionares, 0,2% por úlceras orofaríngeas, y un 0,1% a causa de las

---

<sup>51</sup> CASTELLÁ, G., M. Abarca, et al. (2008). "Cryptococcosis and pets." [Artículo científico en línea] En: Revista Iberoamericana de Micología vol 25 N°1, pp 19-24. [consultado 9 de Abril 2017] Disponible: [http://www.scielo.org.co/sciELO.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-41572011000100014](http://www.scielo.org.co/sciELO.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572011000100014)

<sup>52</sup> HULL, C. M. and J. Heitman (2002). "Genetics of *Cryptococcus neoformans*." [Artículo científico en línea] En: Revista Genetica vol 36, pp 557-615. [consultado 16 Abril 2017] Disponible: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.genet.36.052402.152652> .

<sup>53</sup> LIZARAZO, J., M. Linares, et al. (2005). "Cryptococcosis in Colombia: surveillance results 1997-2004." 6th International Conference on *Cryptococcus* and Criptococosis. Boston, USA: 115 Disponible: <http://studylib.es/doc/4951118/estudio-de-caracteristicas-genot%C3%ADpicas-y-fenot%C3%ADpicas>

siguientes formas clínicas: peritonitis, lesión a nivel hepático, celulitis en los miembros inferiores e infección en vías urinarias. A partir de 788 aislamientos remitidos, se estableció que la infección con *C. neoformans var. grubii* (serotipo A) es la más frecuente con un porcentaje del 95,9% de los casos. La enfermedad causada por *C. gattii* (serotipo B) presenta un menor porcentaje (3,3%); sin embargo, este mismo serotipo presenta una alta prevalencia (77%) en Norte de Santander. El porcentaje de casos por *C. gattii* serotipo C es de 0,5% y *C. neoformans var. neoformans* (serotipo D) es el más bajo (0,3%) (Lizarazo, Linares et al. 2007).<sup>54</sup>

## 2.3 MARCO CONCEPTUAL

**INMUNODEPRESION:** Describe un sistema inmunológico que funciona por debajo del índice de normalidad. Debido a que los mecanismos de defensa son limitados. Las personas con esta condición son susceptibles a las infecciones por microorganismos que están presentes en todas partes, pero que no causan enfermedad en personas saludables.<sup>55</sup>

**INMUNOCOMPETENTE:** Describe un sistema inmunológico que es capaz de producir una respuesta inmunitaria normal.<sup>56</sup>

**AGENTE PATÓGENO:** Es “cualquier microorganismo, como una bacteria o un virus, causante de enfermedad”.<sup>57</sup>

**CULTIVO:** Es “procedimiento de laboratorio utilizado para la multiplicación de este hongo causante de infecciones graves en la piel, pulmones, hueso y del eje cerebroespinal”.<sup>58</sup>

**CRYPTOCOCCUS:** Es “una levadura encapsulada que se puede aislar del ambiente y cuya manifestación clínica más grave es la afectación del sistema nervioso central”.<sup>59</sup>

---

<sup>54</sup> LIZARAZO, J. Op. Cit

<sup>55</sup> DICCIONARIO MEDICO.INMUDEPRESION [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/inmunosupresion>.

<sup>56</sup> INSTITUTO NACIONAL CANCER DEL CANCER.INMUCOMPETENTE [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/inmunocompetente>.

<sup>57</sup> DICCIONARIO ECOLOGICO. AGENTE PATOGENO [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: [http://ecologico.esacademic.com/131/agente\\_pat%C3%B3geno](http://ecologico.esacademic.com/131/agente_pat%C3%B3geno).

<sup>58</sup> DICCIONARIO MEDICO DE LA MEDICINA.CULTIVO [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: <http://dic.idiomamedico.net/cultivo>.

<sup>59</sup> DICCIONARIO MEDICO.CRYPTOCOCCUS. [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/cryptococcus>.

**CRYPTOCOCOSIS:** Es “una micosis sistémica causada por el complejo de especies patógenas del género *Cryptococcus*: *C. neoformans* y *C. gattii*”.<sup>60</sup>

**EFICACIA:** Es “capacidad de surtir efecto que tiene un medicamento u otra intervención médica. Se somete a prueba la eficacia de los medicamentos para asegurarse de que produzcan el efecto deseado en el tratamiento de una enfermedad o afección”.<sup>61</sup>

**ENFERMEDAD INFECCIOSA:** Es “enfermedad causada por un microorganismo, como una bacteria, un virus o un protozoo, que no se encuentra normalmente en el cuerpo y que puede causar infección. Algunas enfermedades infecciosas, no todas, son contagiosas, lo que significa que pueden propagarse de una persona a otra. Otras enfermedades infecciosas pueden propagarse de los animales o insectos al ser humano, pero no de una persona a otra”.<sup>62</sup>

**ESTADO SEROLÓGICO:** Es “estado en el cual una persona tiene o no tiene anticuerpos detectables contra un antígeno específico, medidos con un análisis de sangre (una prueba serológica)”.<sup>63</sup>

**GANGLIOS LINFÁTICOS:** Son “órganos muy pequeños del sistema linfático. Están localizados en muchas partes del cuerpo, sobre todo en el cuello, las axilas y la ingle. Desempeñan una función importante en el sistema inmunitario. Cuando la linfa se filtra a través de los ganglios linfáticos, las sustancias extrañas son atrapadas y destruidas por los linfocitos que recubren la estructura interna de los ganglios linfáticos”.<sup>64</sup>

---

<sup>60</sup> DICCIONARIO MEDICO.CRYPTOCOCOSIS. [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: <http://www.diccionariomedico.net/diccionario-terminos/9049-criptococosis>

<sup>61</sup> DICCIONARIO MEDICO.EFICACIA. [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: <https://diccionario.medciclopedia.com/1/eficacia/>.

<sup>62</sup> DICCIONARIO MEDICO.ENFERMEDAD INFECCIOSA. [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: <https://diccionario.medciclopedia.com/1/enfermedad-infecciosa/>.

<sup>63</sup> DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS EE.UU. ESTADO SEROLOGICO [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: <https://infosida.nih.gov/understanding-hiv-aids/glossary/4059/estado-serologico>.

<sup>64</sup> INSTITUTO NACIONAL DEL CANCER.GANGLIOS LINFATICOS [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/ganglio-linfatico>.

**INFECCIÓN:** Es “invasión y proliferación de un microorganismo infeccioso, como una bacteria o un virus, en el cuerpo. También se puede referir a la enfermedad causada por el microorganismo infeccioso”.<sup>65</sup>

**NICHO ECOLÓGICO:** Es un término que describe la posición relacional de una **especie** o población en un **ecosistema**.<sup>66</sup>

**COINFECCION:** Infección simultánea por dos agentes etiológicos.<sup>67</sup>

**FENOTIPO:** Cualquier característica o rasgo observable de un organismo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas, fisiología y comportamiento. **68**

**GENOTIPO:** Se refiere a la información genética que posee un organismo en particular, en forma de **ADN**. Normalmente el **genoma** de una especie incluye numerosas variaciones o **polimorfismos** en muchos de sus genes.<sup>69</sup>

### 1.3 2.4 MARCO LEGAL

❖ MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE Ley 99 1993 ( 22 de Diciembre) Por la cual se crea el MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE, se reordena el Sector Público encargado de la gestión y conservación del medio ambiente y los recursos naturales renovables, se organiza el Sistema Nacional Ambiental -SINA- y se dictan otras disposiciones.

❖ MINISTERIO DE AMBIENTE Y DESARROLLO SOSTENIBLE Ley 1259 2008 (19 de Diciembre) Por medio de la cual se instaura en el territorio Nacional la aplicación del comparendo ambiental a los infractores de las normas de aseo, limpieza y recolección de escombros; y se dictan otras disposiciones.

---

<sup>65</sup> DICCIONARIO MEDICO. INFECCION [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: <http://www.diccionariomedico.net/diccionario-terminos/3468-infecci%C3%B3n>.

<sup>66</sup> DICCIONARIO CIENCIA Y SALUD.[Citado 07 de noviembre 2017].[Disponible en línea] En: <https://www.significados.com/nicho-ecologico/>

<sup>67</sup> COMITÉ CIUDADANO ANTI SIDA.COINFECCION.NICHO ECOLOGICO. [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: <https://comiteantisida-asturias.org/zona-positiva/tratamientos/coinfeccion-por-hepatitis-c/que-es-la-coinfeccion.html>.

<sup>68</sup> DICCIONARIO MEDICO.FENOTIPO. [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/fenotipo>

<sup>69</sup> DICCIONARIO ACADEMICO DE LA MEDICINA.GENOTIPO. [citado 07 de noviembre 2017]. [disponible en línea]En: <http://dic.idiomamedico.net/genotipo>

❖ MINISTERIO DE PROTECCION SOCIAL Ley 1333 2009 (21 de Julio) Por la cual se establece el procedimiento sancionatorio ambiental y se dictan otras disposiciones.

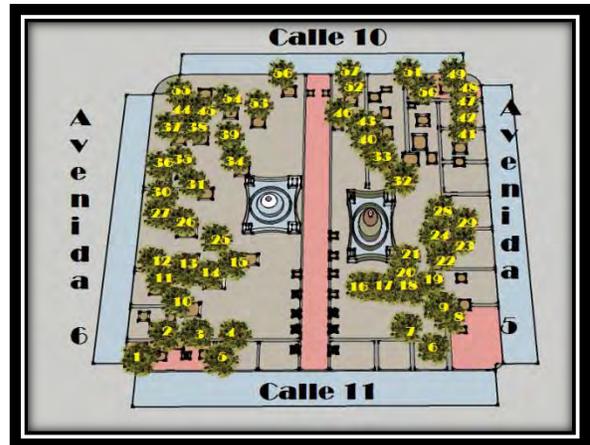
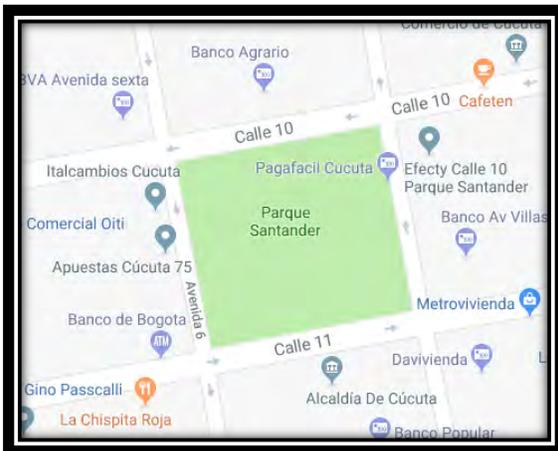
❖ MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCION SOCIAL Resolución número (0467 SDE 2015 (P1 1 NOV 2015) por la cual se adopta la Clasificación Única de procedimientos en Salud- CUPS y se dictan otras disposiciones.

❖ Manual para obtención y envío de muestras de salud pública para análisis de eventos de interés en el ISBN: 978-958-13-0145-4 República de Colombia Instituto Nacional de Salud Subdirección Red Nacional de Laboratorios 2011.

## 2.5 MARCO CONTEXTUAL

El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Cúcuta, Norte de Santander. El principal criterio de inclusión fue tomar parques principales céntricos de la ciudad y con alta afluencia de personas diariamente en ellos, además que tuviesen presencia de árboles. De lo anterior, no se encuentran antecedentes de estudios realizados en estos parques, ni referentes a las especies arbóreas. Por otra parte, como criterio de exclusión se descartó la posibilidad de muestreo a los parques sin presencia de árboles.

**Parque Santander:** Se encuentra entre los cruces de las avenidas 5 y 6, con calles 10 y 11



**Figura 4 Parque Santander, a la izquierda vemos su ubicación y a la derecha una Figura del parque.**

**Parque Mercedes Abrego:** Se encuentra en la calle 9



**Figura 5 Parque Mercedes Abrego, a la izquierda vemos su ubicación y a la derecha una Figura del parque.**

**Parque Fuente de Leones:** Se encuentra ubicado entre la Avenida 0 y la Avenida Diagonal Santander



**Figura 6 Parque Fuente de Leones, a la izquierda vemos su ubicación y a la derecha una Figura del parque.**

**Parque Juana Rangel de Cuellar:** Se encuentra ubicado entre la Diagonal Santander



**Figura 7** Parque Juana Rangel de Cuellar, a la izquierda vemos su ubicación y a la derecha una Figura del parque.

## 2.6 SISTEMA DE HIPÓTESIS

**H.T:** A mayor relación ecoepidemiológica de los parques del municipio de San José de Cúcuta, existe mayor posibilidad de determinar la presencia del complejo *C. neoformans/C. gattii* en el ambiente.

**H.O:** A mayor relación ecoepidemiológica de los parques del municipio de San José de Cúcuta, NO existe mayor posibilidad de determinar la presencia del complejo *C. neoformans/C. gattii* en el ambiente.

## 2.7 MATRIZ OPERATIVA DE LAS VARIABLES

Tabla 1. Matriz operativa

PREGUNTA	OBJETIVO	VARIABLE	DIMENSIÓN	OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES			
				INDICADOR	INSTRUMENTO	ESCALA	FUENTE
Cuáles son los aislados de <i>C. neoformans</i> , y <i>C. gattii</i> , obtenidos de muestras ambientales.	Identificar aislados de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> obtenidos de muestras ambientales mediante pruebas directas.	Cryptococcus	Especie neoformans Especie gattii	Presencia ausencia	Técnica Directas: Medios de cultivo Agar Girasol tinción de Tinta China Prueba de Urea, Prueba de CGB	Nominal	Heces de aves, Suelo, Corteza de árboles
Cuáles son las características genéticas de los aislados ambientales de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> .	Caracterizar genéticamente los aislados ambientales de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> mediante técnicas moleculares.	Cryptococcus	Especie neoformans Especie gattii	<i>C. neoformans</i> <i>C. gattii</i>	Técnicas moleculares: Aislamiento de ADN, PCR, Electroforesis en gel de agarosa, y Genotipificación.	Nominal	Aislados de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> .

### **3. MARCO METODOLOGICO**

#### **3.1 TIPO DE INVESTIGACION**

##### **3.1.1 Nivel de investigación**

El nivel de investigación es descriptivo porque propone caracterizar las variables del objeto de estudio o los componentes del fenómeno o problema observado. Se limita a realizar una descripción de los hechos, de la estructura o comportamiento de la variable medida, contada o caracterizada, se señalan los datos obtenidos y la naturaleza exacta de la población de donde fueron extraídos. Además con esta investigación se busca confirmar resultados obtenidos en otras investigaciones realizadas en la ciudad y analizar diferentes muestras a las cuales no se les ha realizado este tipo de estudio. Se considera un estudio de tipo transversal porque consiste en estudiar en un momento determinado a distintos grupos de muestras (corteza, suelo, hojas, frutos), extraídas de diferentes tipos de árboles de los diferentes parques (Santander, Mercedes Abrego, Fuente de Leones y Juana Rangel de Cuellar).

##### **3.1.2 Diseño de estudio.**

Es un estudio de campo, debido a que nos permite obtener nuevos conocimientos en la realidad social, además de estudiar una situación que nos ayude a diagnosticar necesidades y problemas en el ambiente en el que habitamos, además nosotros los investigadores nos limitamos a levantar la información de manera directa en la fuente sin alterar las condiciones existentes en la realidad donde se desarrollan los hechos, en este caso tomar las muestras en los diferentes parques antes mencionados, sin alterar la naturaleza de las muestras obtenidas.

#### **3.2 METODOS O PROCEDIMIENTOS**

##### **FASE I DESCRIPTIVA:**

❖ A partir de la selección de 4 parques emblemáticos de la ciudad de Cúcuta ubicados en zonas comerciales y altamente concurridas se procedió a diseñar un mapa por cada uno de los parques para conocer la cantidad de individuos (árboles) además de la especie de estos. De modo, que a partir de los aislados se logre identificar nichos ecológicos. Posterior a esto se planificaron jornadas de muestreo iniciando el 31 de octubre del 2016 en el Parque Mercedes Abrego, el 16

de enero del 2017 en el Parque Santander y Juana Rangel de Cuellar, por último el 01 de mayo en el Parque Fuente de Leones (cada parque en una única ocasión). Los muestreos se realizaron de manera aleatoria e independiente de condiciones climáticas y en distintas fechas debido a la cantidad de muestras y la capacidad de los laboratorios de la Universidad. Además, es este un microorganismo de alta virulencia por lo cual se empleó normas de Bioseguridad para manipulación del patógeno. (Ver anexo 1)

Así mismo, se estableció una nomenclatura para la correcta identificación de las muestras, a partir de las iniciales de los parques, de la siguiente manera: Parque Santander (PS), Parque Juana Rangel de Cuellar (JR), Parque Mercedes Abrego (MA), y Parque Fuente de Leones (FL). Seguido se indica el tipo de muestra: Corteza (C), Hojas (H), Suelo (S) y Excremento de paloma (E).y por último el número de individuo.

**Procesamiento de muestras ambientales.** Se recolectaron aproximadamente 10g de cada una de las muestras distribuidas así: tierra (147), corteza de árbol (146), y hojas (96), en cada una de las zonas emblemáticas del área metropolitana de Cúcuta, empleando bolsas sellables.

Las muestras fueron transportadas en cavas de icopor al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Santander campus Cúcuta.

Estas fueron procesadas mediante la técnica de extracción de buffer fosfato salino (PBS), suplementando con antibiótico, como se describió previamente, para lo cual se pesaron 5g de muestra, se resuspendieron en 25 ml de PBS 1X para homogenización y reposo durante 60 minutos; posteriormente, se filtró cada homogenizado con gasa estéril, adicionando finalmente antibiótico (dejando actuar por espacio de 60 minutos). (Ver anexo 2)

Un total de 100 µl de cada preparación fueron sembrados (Ver anexo 3). Se empleó el medio de Guyzotia el cual se preparó a base de semilla de girasol ofreciendo este medio los requerimientos necesarios para el crecimiento de *Cryptococcus spp* (Ver anexo 4). Posteriormente se incubaron a 27°C durante 20 días, con observación periódica semanal, como ha sido referido (Ver anexo 10)

**Prueba de Tinta China.** Las colonias cremosas, elevadas, con bordes regulares y pigmento café (producción de melanina) fueron observadas al microscopio empleando tinta China. Para apreciar la cápsula incolora característica del microorganismo.

**Prueba de Urea.** Toda colonia con presencia de cápsula fue sometida a prueba de degradación de urea, siendo esta positiva para *Cryptococcus spp*; para el

montaje se utilizó como control positivo cepa ATCC de *Cryptococcus spp* y para control negativo cepas ATCC de *Candida albicans*. (Ver anexo 5)

**Prueba de CGB.** (Agar canavanina glicina azul de bromotimol sódico). A partir de cepas ureasa positiva se realizó la prueba bioquímica de CGB para identificación de *Cryptococcus gattii*, siendo este capaz de resistir a la L-Canavanina y de asimilar la glicina logrando elevar el PH del medio y virando el medio de amarillo - verdoso a azul de cobalto. Para el montaje se utilizó cepa ATCC de *Cryptococcus gattii* como control positivo y cepa ATCC de *Cryptococcus neoformans* para el control negativo (Ver anexo 6).

Por otra parte, a partir de la identificación de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* fue necesario emplear técnicas óptimas para la conservación de características fisiológicas y morfológicas de cada aislado con la finalidad de mantener las cepas libres de contaminación y para utilización posterior de pruebas moleculares (Ver anexo 7).

**Extracción de ADN.** El ADN de alto peso molecular se extrajo, utilizando el método fenol – cloroformo alcohol isoamílico. Este procedimiento se llevó a cabo a partir de las cepas ambientales de *C. neoformans* o *C. gattii* cultivadas en agar Saboraud a 27°C por 48 horas; posteriormente se transfirieron colonias del cultivo a tubos microcentrífuga de 1.5 ml e incubaron a -20°C durante toda la noche, después se suspendieron en 500µl de buffer de extracción (Tris - HCl 50 mM, EDTA 50 mM, dodecil sulfato sódico al 3%, 2 - mercaptoetanol 1%), agitando vigorosamente con vórtex , e incubaron a 65°C durante 1 hora. El lisado se extrajo con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25 24: 1, vol.). El ADN se recuperó mediante precipitación con isopropanol a -20°C durante toda la noche y se lavó con etanol al 70 % y finalmente, se resuspendió el ADN en buffer TRIS – EDTA (TE). La concentración se midió mediante fluorescencia (Quibit 3.0 fluorómetro). (Ver anexo 8)

**PCR – Huella Digital.** La caracterización molecular de las especies de *Cryptococcus sp*, se realizó mediante PCR - huella digital, utilizando como primer único de secuencia específica microsatélite a (GTG)<sub>5</sub>.

La mezcla de PCR de 50 µL contenía; 31,5 µL de agua desionizada estéril, 25 ng de ADN, 5 µl de tampón de PCR 10X (Tris / HCl 10 mM, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,02 mM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Promega, Madison, WI), acetato de sodio 3 mM (Sigma, Atlanta, GA), 0.8 ng de cebador (para GTG<sub>5</sub> la concentración fue 10 ng), MgCl 2 mM, 1 ml de albúmina de suero bovino (BSA, 200 mg/mL \ Delta 1) y 0.05 U Amplitaq. La PCR se realizó durante 35 ciclos en un SimpliAmp™ Thermal Cycler, utilizando, las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, hibridación a 50°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 20 segundos y un ciclo de extensión final a 72°C durante 6 minutos. Los productos de la amplificación, se

separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.4% en tampón Tris-borato EDTA (TBE) 1X a 100 V durante 2 horas.

Los productos de la amplificación GTG<sub>5</sub>, se separaron durante 2 horas y se tiñeron con Gel red Nucleid Acid Gel Stain Biotium a 0,3 mg / mL, durante 30 minutos. Las bandas se visualizaron bajo luz UV, utilizando marcador de tamaño molecular de 1 kb. Se empleó como patrón los tipos moleculares VNI, VNII, VNIII y VGI cargados en el gel y seguido las cepas de interés (Ver anexo 9)

## **FASE II ANALÍTICA:**

- ❖ Se empleó Identificación de aislados por técnicas directas como la siembra en agar girasol, visualización de la cápsula en tinta china, degradación de urea, y diferenciación entre las especies de *C. neoformans* y *C. gattii*, se empleó la prueba de Canavanina-Glicina Azul de Bromotimol (CGB).
- ❖ Aislamiento del ADN a partir de muestras ambientales sospechosas en la primera etapa.
- ❖ Realización de electroforesis en geles de agarosa al 1,2% de los resultados de la PCR.
- ❖ Genotipificación de los aislados mediante PCR Huella Digital.

## **FASE III CONCLUSIVA:**

- ❖ Teniendo ya caracterizado se procede a realizar el respectivo análisis e interpretación de los resultados.

## **3.3 POBLACION Y MUESTRA**

**3.3.1 Población.** Correspondió a parques públicos ubicados en el municipio de San José de Cúcuta, los cuales son: Parque Santander, Parque Nacional, Parque Juana Rangel de Cuellar, y Parque Fuente de Leones.

**3.3.2 Muestra.** A partir de cuatro parques seleccionados por su alta afluencia de habitantes, se tomó muestra de los árboles de cada uno (individuos), de la siguiente manera: frutos secos, hojas, corteza, tierra y excremento de paloma (si lo había); pues se tomó el 100% de los individuos de cada parque lo cual arrojó un total de 147 individuos estudiados. A partir de estos individuos se recolectaron las muestras anteriormente mencionadas para un total de 389 muestras procesadas.

### 3.3.3 Técnicas de muestreo

**3.3.3.1 Muestreo no probabilístico.** Es de tipo intencional, debido a que es un muestreo en el que los elementos o personas que conformaran las muestras son seleccionados por el investigador con base a juicios o criterios preestablecidos.

## 3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS

**3.4.1 INVESTIGACIÓN DOCUMENTAL:** Se realiza por medio de observación, documental, presentación resumida, resumen analítico y análisis crítico. Esto se hace mediante fichas, computadores, unidades de almacenamiento. También se realiza análisis de contenido mediante fichas de trabajo, fichas de análisis de contenido.

**3.4.2 INVESTIGACIÓN DE CAMPO:** Se realiza por medio de la observación utilizando un diario de campo, mapa de los parques, guía de observación, cámaras fotográficas.

## 3.5 TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

En este caso para la respectiva codificación se asignó a cada parque un código y a cada árbol, es decir a cada individuo un número que va hacer consecutivo en cualquier caso, para ello tenemos:

- Parque Santander: se le asignó las letras PS para identificación del parque. Con respecto a las muestras se estableció de la siguiente manera C si es corteza de árbol, F para frutos secos, H para hojas, y una S para suelo del individuo (además de E para excremento de paloma si la hay). En el caso de este parque se tomaron muestras en 57 individuos, es decir el consecutivo va desde 1 hasta 57. Ejemplo: PS/C/Ind. 1.

- Parque Juana Rangel de Cuellar: se le asignó las letras JR para identificación del parque. Con respecto a las muestras se estableció de la siguiente manera C si es corteza de árbol, F para frutos secos, H para hojas, y una S para suelo del individuo establecido. En el caso de este parque se tomaron muestras en 13 individuos, es decir el consecutivo va desde 1 hasta 13. Ejemplo: JR/H/Ind.1

- Parque Mercedes Abrego: se le asignó las letras MA para identificación del parque. Con respecto a las muestras se estableció de la siguiente manera C si es corteza de árbol, F para frutos secos, H para hojas, y una S para suelo del individuo establecido. En el caso de este parque se tomaron muestras en 47 individuos, es decir el consecutivo va desde 1 hasta 47. Ejemplo: MA/S/Ind.1
- Parque Fuente de Leones: se le asignó las letras FL para identificación del parque. Con respecto a las muestras se estableció de la siguiente manera C si es corteza de árbol, F para frutos secos, H para hojas, y una S para suelo del individuo establecido. En el caso de este parque se tomaron muestras en 15 individuos, es decir el consecutivo va desde 1 hasta 15. Ejemplo: FL/T/Ind.1

El análisis de la información es de frecuencia, debido a que se compararon las muestras recolectadas por cada parque, es decir, en cuáles individuos y en que parte del individuo se logró aislar este hongo (*Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*) con respecto a cada parque.

## 4. ANALISIS E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

### 4.1. RESULTADOS

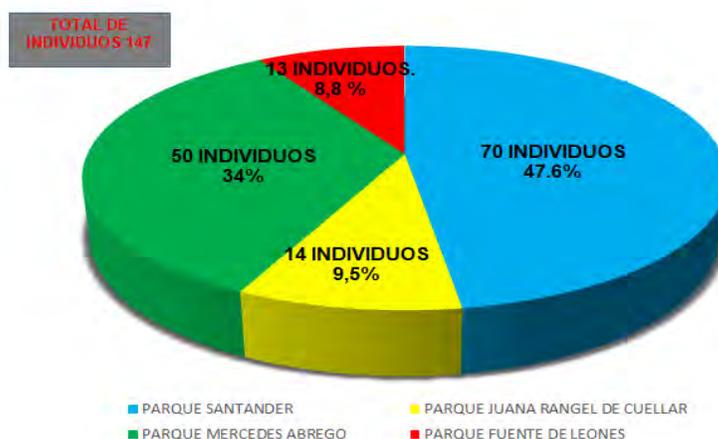
De un total de 389 muestras obtenidas a partir de 147 individuos, y provenientes de diferentes géneros y especies de árboles, de los 4 parques objeto estudio, se aislaron 12 colonias sospechosas provenientes de los parques Santander, Mercedes Abrego y Fuente de Leones las cuales se logró identificar como *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.

El agente se aisló en 3 de las 4 zonas en donde se realizó el muestreo, con una prevalencia de *C. neoformans* en los parques mencionados anteriormente de la ciudad de Cúcuta del 75% ( $p = \frac{\text{Número de zonas en donde se aisló el agente}}{\text{Total de zonas en donde se realizó el muestreo}} \times 100$ .)

#### 4.1.1 Identificación de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* mediante pruebas directas

##### 4.1.1.2 Caracterización de la población estudio

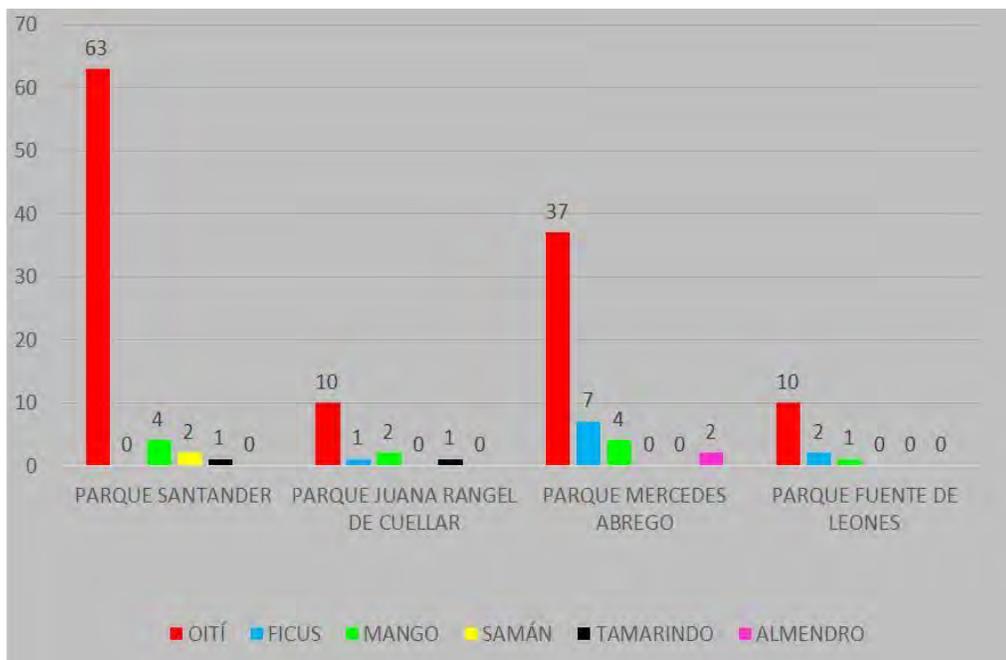
Gráfica 1. Caracterización de Individuos estudiados



En el estudio realizado se rastrearon en total 147 individuos pertenecientes a los diferentes parques, donde el Parque Santander no solo longitudinalmente es más grande sino que cuenta con más vegetación y diversidad de especies arbóreas

como *oití* (*Licania tomentosa*), *mango* (*Mangifera indica*), *samán* (*Samanea saman*) y *tamarindo* (*Tamarindus indica*). Además en éste se observó aparentemente mayor población de aves, ampliando la probabilidad de obtener el microorganismo de interés. De lo anterior, es importante resaltar la estrecha relación del hongo con las palomas considerada esta como su nicho ecológico.

**Gráfica 2. Caracterización de especies arbóreas**



A partir de la totalidad de individuos analizados se caracterizó las diversas especies arbóreas, identificándose 6 especies las cuales fueron: *samán* (*Samanea saman*), *oití* (*Licania tomentosa*) *ficus* (*Ficus benjamina*), *tamarindo* (*Tamarindus indica*), *almendro* (*Terminalia catappa*) y *mango* (*mangifera indica*) cabe resaltar el apoyo por parte de ingenieros ambientales de Corponor para la correcta identificación de las especies arbóreas halladas en el estudio.

Además se encontró que el *Oití* (*Licania catappa*) fue el más prevalente en los diversos parques. Aunque Brasil es su país de origen, éste árbol también es muy popular en la Ciudad Colombiana de Cúcuta en el Departamento de Norte de Santander, pues al ser de gran tamaño sus ramas generan sombra y sofocan un poco el calor de esta urbe que normalmente es de 28°C a 32°C en días normales y de 32°C hasta 36 o 37°C en días extremadamente tórridos.

**Tabla 2. Caracterización de tipo de muestras**

PARQUES ESTUDIADOS	TIPO DE MUESTRAS			CANTIDAD
	TIERRA	CORTEZA	HOJA	
PARQUE SANTANDER	70	70	70	210
PARQUE MERCEDES ABREGO	50	50	0	100
PARQUE JUANA RANGEL DE CUELLAR	14	13	13	40
PARQUE FUENTE DE LEONES	13	13	13	39
<b>TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS = 389</b>				

A partir de la identificación de los individuos a rastrear se recolectaron diversos tipos de muestras como: tierra, corteza, y hojas; todas estas muestras presentes alrededor del individuo con el objetivo de ampliar probabilidad del microorganismo. Adicionalmente, si estas tenían o no excretas de palomas.

De lo anterior se evidencia que en el Parque Santander se analizaron en total 210 muestras siendo este parque (el de mayor número de muestras).

**4.1.1.3 Tinción de Tinta China.** En primera estancia, ante sospecha de *Cryptococcus spp* de acuerdo al cultivo en Agar de *Guizotia Abyssinica* donde se evidenciaron 12 colonias con pigmento melánico se procedió a realizar una serie de pruebas directas como la tinción con la Tinta China, debido a que microscópicamente permite una fácil visualización de la cápsula polisacárida incolora y muy característica del hongo.



**Figura 8. Confirmación de la Capsula mediante Tinta China. Fuente: Guerrero Erika, Moreno Eliana, Carrascal Kelly; Febrero 2018.**

**4.1.1.4 Prueba de Urea.** De acuerdo a lo anterior, a las cepas sospechosas se le realizó identificación mediante técnicas bioquímicas, en este caso mediante la síntesis de la ureasa la cual es una metaloenzima que cataliza la conversión de urea a amonio y carbamato. La detección de esta enzima se utiliza corrientemente como una prueba para la identificación de diversos microorganismos, entre ellos *Cryptococcus sp.* Debido a que es uno de los factores que hace que este microorganismo sea más patógeno.



**Figura 9. Prueba de Urea Positiva para Cryptococcus sp. Fuente: Guerrero Erika, Moreno Eliana, Carrascal Kelly; Mayo 2017.**

Se realizó la prueba Bioquímica de ureasa a las muestras sospechosas de *Cryptococcus spp*, a partir de cultivo del medio saboraud y además el montaje con los respectivos controles; control positivo con cepa ATCC (American Type Culture

Collection) de *Cryptococcus neoformans*, y control negativo con *Cándida albicans* (procedente del cepario de la Universidad e Santander)

A continuación resultados de cepas ureasa positiva:

**Tabla 3. Distribución geográfica de muestras ureasa positiva**

IDENTIFICACIÓN DEL INDIVIDUO	TIPO DE MUESTRA	LUGAR DE PROCEDENCIA
Ind. 26	Corteza	Parque Santander
Ind. 35	Corteza	Parque Santander
Ind. 37	Tierra	Parque Santander
Ind. 39 <sup>a</sup>	Tierra	Parque Santander
Ind. 39b	Hoja	Parque Santander
Ind. 47	Corteza	Parque Santander
Ind. 58	Tierra	Parque Santander
Ind. 63	Corteza	Parque Santander
Ind. 68	Corteza	Parque Santander
Ind. 69	Tierra	Parque Santander
Ind. 5	Corteza	Parque Fuente de Leones
Ind. 2	Tierra	Parque Mercedes Abrego
<b>Total de Muestras = 12</b>		

#### 4.1.1.4. Prueba de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB).

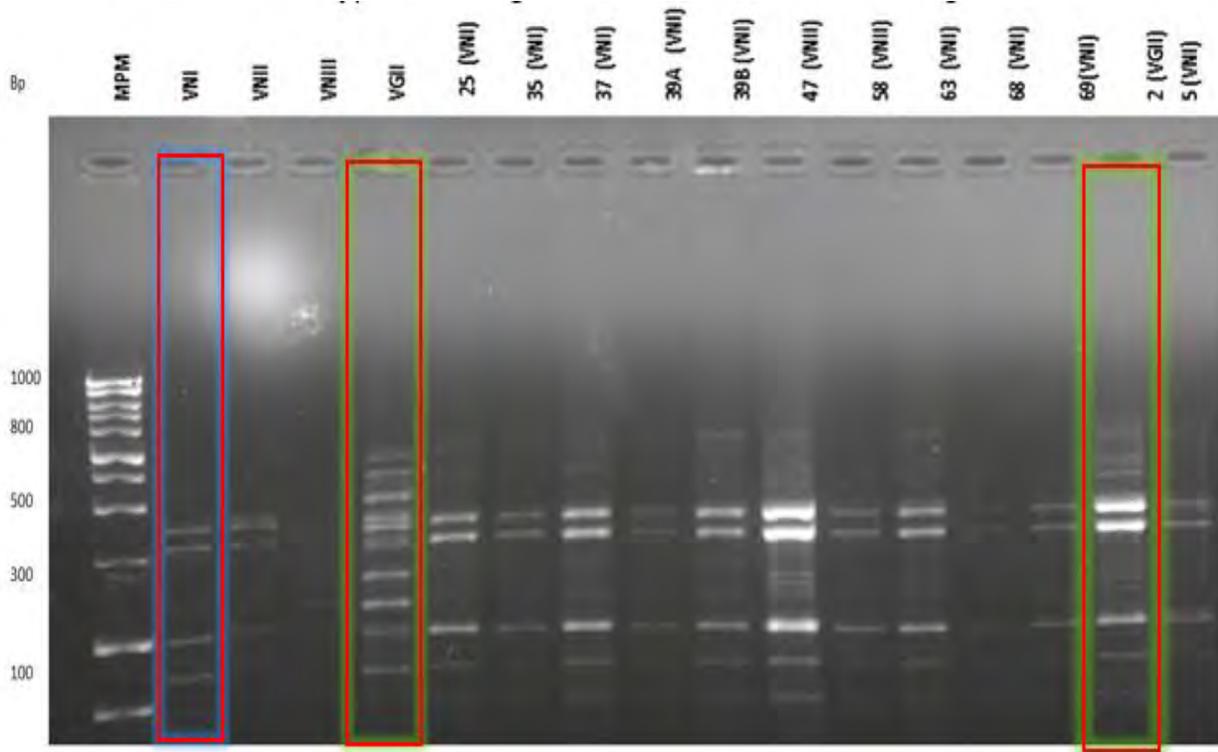
Seguidamente, se realizó otra prueba bioquímica denominada canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) la cual permite diferenciar *Cryptococcus gattii* de *Cryptococcus neoformans*, debido a que *Cryptococcus gattii* resistente a la L-canavanina (aminoácido natural estructuralmente similar a la L-arginina), el cual es degradado por las cepas de esta variedad, liberando amonio como compuesto final, virando el medio de amarillo verdoso a un azul de cobalto, por la presencia de azul de bromotimol.



Figura 10. Confirmación de la especie *Cryptococcus neoformans*, de las muestras ambientales mediante el medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Fuente: Carrascal Kelly, Moreno Eliana, Guerrero Erika, 2018.

Se logró apreciar que a partir de las 12 cepas presuntivas de *Cryptococcus spp* solo una de identificó como *Cryptococcus gattii* de acuerdo al fundamento de la técnica donde esta presentó un viraje del medio pasando de verde a azul de cobalto. Cabe resaltar, que para el montaje de la técnica anteriormente mencionada se realizó respectivos controles a partir de cepas ATCC de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.

#### 4.1.1.5 Caracterización genética de las cepas de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, mediante PCR huella digital.



**Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa.**

Electroforesis en gel de agarosa. PCR-huella digital generada con el indicador (GTG)<sub>5</sub>. (Pozo1) Marcador de Peso Molecular 1kb; (Pozos 2-5) Patrones de *Cryptococcus spp*; (Pozos 6-17) Muestras de los aislados ambientales positivos para *Cryptococcus neoformans*, serotipo A: VNI; *Cryptococcus gattii*, serotipo B: VGII. Análisis en módulo BioGalaxy del programa Biolumics, versión 3.0.

**Tabla 4. Caracterización de los patrones moleculares**

Identificación de la muestra	Tipo de muestra	Zona de procedencia	Especie del individuo	Especie de <i>Cryptococcus</i>	Genotipo <i>Cryptococcus</i>
26	Corteza	Parque Santander	Mango ( <i>Mangifera indica</i> )	<i>C. neoformans</i>	VN I
35	Corteza	Parque Santander	Oití ( <i>Licania tomentosa</i> )	<i>C. neoformans</i>	VN I
37	Tierra	Parque Santander	Oití ( <i>Licania tomentosa</i> )	<i>C. neoformans</i>	VN I
39a*	Hojas	Parque Santander	Oití ( <i>Licania tomentosa</i> )	<i>C. neoformans</i>	VN I
39b*	Tierra	Parque Santander	Oití ( <i>Licania tomentosa</i> )	<i>C. neoformans</i>	VN I
47	Corteza	Parque Santander	Mango ( <i>Mangifera indica</i> )	<i>C. neoformans</i>	VN I
58	Tierra	Parque Santander	Mango ( <i>Mangifera indica</i> )	<i>C. neoformans</i>	VN I
63	Corteza	Parque Santander	Samán ( <i>Samanea saman</i> )	<i>C. neoformans</i>	VN I
68	Corteza	Parque Santander	Oití ( <i>Licania tomentosa</i> )	<i>C. neoformans</i>	VN I
69	Tierra	Parque Santander	Tamarindo ( <i>Tamarindus indica</i> )	<i>C. neoformans</i>	VN I
2	Tierra	Parque Mercedes Ábrego	Ficus ( <i>Ficus benjamina</i> )	<i>C. gattii</i>	VG II
5	Corteza	Fuente de Leones	Oití ( <i>Licania tomentosa</i> )	<i>C. neoformans</i>	VN I

**Tabla 5. Genotipos de *C. neoformans* y *C. gattii* por PCR-Huella digital**

<b>GENOTIPOS</b>	<b>AISLADOS AMBIENTALES</b>	<b>%</b>
<b>VNI</b>	<b>11</b>	<b>91.7%</b>
<b>VGII</b>	<b>1</b>	<b>8.3%</b>
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>	<b>100%</b>

#### **4.2 DISCUSIÓN**

Este estudio reveló la presencia de *Cryptococcus neoformans* a partir de muestras ambientales en zonas altamente concurridas de la ciudad de San José de Cúcuta y consideradas emblemáticas, como los parques Santander y Fuente de Leones, además de aislamiento de *C. gattii* de suelo (tierra) en el parque Mercedes Ábrego.

Los parques seleccionados para el estudio representan sitios de gran circulación peatonal y flujo vehicular (circundante) dentro del perímetro urbano de la ciudad, donde los árboles de oití, ficus, mango, samán, almendro y tamarindo están ampliamente distribuidos, siendo utilizados alrededor de los parques para ornamento y sombrío.<sup>70</sup>

Del total de individuos analizados, el 8% (11/147) resultaron positivos para *C. neoformans/ C. gattii*, así como el 3% de las muestras evaluadas a partir de éstos (12/389), porcentaje que resulta inferior a lo reportado por otros autores, como Vallejo<sup>71</sup> en Pasto, Colombia, en donde se aisló el agente en el 26%

<sup>70</sup> CONTRERAS O, et al. Identificación presuntiva de *Cryptococcus gattii* aislado de *Terminalia catappa* en Montería, Córdoba, Revista Cubana de Medicina Tropical. Vol. 3 N°2,2011 [Artículo científico disponible] **En: Colombia**[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602011000200002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000200002). [Consultado el 16 Abril del 2018]

<sup>71</sup> VALLEJO, D. Op. Cit. Pp 65

(34/128) de las muestras ambientales analizadas, así como lo encontrado por Álvarez<sup>72</sup> con positividad de 55% (55/100) en muestras de excretas de paloma.

En tal sentido, en el presente trabajo no se evaluó al excremento de paloma como muestra independiente, lo que permite inferir que los muestreos realizados exclusivamente a partir de tal muestra aumentan la probabilidad de aislar *Cryptococcus spp*, respecto al análisis de muestras ambientales tipo tierra, hojas y corteza de árboles, con o sin presencia de excretas de palomas, como en el presente trabajo. Sin embargo, se carece de estudios que establezcan una estandarización de las condiciones de muestreo adecuadas para determinar la presencia del patógeno, teniendo en cuenta que la variabilidad de las condiciones o factores de cada zona geográfica afectan el crecimiento del hongo.<sup>73</sup>

Algunos trabajos han mostrado que este hongo no suele aislarse en deyecciones recientes y otros no muestran diferencias significativas en la frecuencia de aislamiento entre los excrementos secos y los frescos.<sup>74</sup> Sin embargo, la capacidad de crecimiento se estima entre 25°C – 37°C.

No obstante, la ciudad cuenta con un clima cálido que en ocasiones alcanza temperaturas altas con radiaciones solares intensas, en cuanto a la exactitud de temperatura y humedad no se consideraron como variables para realizar el muestreo, pues estos se ejecutaron de manera aleatoria y sin periodicidad en el tiempo de los muestreos. Este último aspecto se asemeja a lo reportado por Zúñiga<sup>75</sup> quien no establece rango de temperatura y/o humedad para los muestreos, ni épocas de año específicas para mayor probabilidad de *Cryptococcus spp*, pero refiere que las zonas objeto de estudio presentan un clima templado cálido con lluvias invernales y estación seca prolongada, lo cual favoreció la posibilidad de encontrar a *C. neoformans* y *C. gattii*.

En el presente trabajo se observó que en zonas de alta densidad de palomas se aisló el agente con mayor probabilidad, lo cual es consistente con lo reportado por

---

<sup>72</sup> ALVAREZ, C. PRESENCIA DE *Cryptococcus neoformans* EN EXCRETAS DE PALOMAS URBANAS EN SAN MIGUEL DE TUCUMÁN – ARGENTINA. Boletín Micológico. Vol. 25. pp 29 - 35.2010 [Artículo en línea] Disponible en: <http://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/viewFile/71/55> [consultado 10 de Junio del 2018]

<sup>73</sup> VALLEJO D. Op. Cit. Pp 69

<sup>74</sup> ROSARIO, I. ACOSTA B. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus spp*. [Artículo científico] Revista Iberoamericana Micología 2008; vol. 25: pp13-18. [consultado 20 abril 2018] Disponible: <http://reviberoammicol.com/2008-25/S13S18.pdf>

<sup>75</sup> ZUÑIGA, V. Aislamiento presuntivo y caracterización de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* desde árboles en la región de O'Higgins y Maule, Chile. 2015. En Revista Micología Médica. Vol 30. Pp 6 -15 [Artículo en línea] Disponible en <http://portals3.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/400/363> [consultado el 10 de Junio del 2018]

Vallejo,<sup>76</sup> quien afirma que una alta concentración de palomas propicia la acumulación de excremento y a su vez la colonización de *Cryptococcus spp*, debido a la capacidad para utilizar creatinina como fuente de nitrógeno. Sin embargo, las aves raramente se infectan debido a que su temperatura corporal oscila entre 41,5 – 43 °C, demasiado elevada para el crecimiento del *Cryptococcus spp*.<sup>77</sup>

Con relación a, los nichos ecológicos del patógeno se ha determinado que *Cryptococcus neoformans* cuenta con amplia distribución, pues ha sido este el de mayor prevalencia a nivel mundial. Sin embargo, *Cryptococcus gattii* anteriormente se consideraba limitado a ciertas condiciones climáticas y por ende a su distribución. En el presente estudio se aisló éste último microorganismo a partir de una especie arbórea como Ficus, hecho sin antecedente y en condiciones climáticas tropicales. Lo anterior, se asemeja a los descrito por Herket<sup>78</sup> quien afirma que aunque el complejo de *C. gattii* se encontró inicialmente en áreas tropicales y subtropicales, durante las últimas dos décadas se ha expandido cada vez más a las regiones de clima templado. Así, los nichos ecológicos del complejo de *C. gattii* se han investigado a fondo, y muchos estudios a nivel mundial han revelado que una plétora de especies arbóreas puede ser colonizada por estos hongos patógenos, quedando claro que éste complejo no está asociado a un género de árbol en particular, sino que tiene una predilección por los desechos de plantas / madera en general.

El hallazgo de *Cryptococcus gattii* exclusivamente en el único árbol de especie ficus, como se mencionó en el parque Mercedes Ábrego, reviste especial relevancia en torno a su capacidad de generar enfermedad en individuos inmunocompetentes, lo cual no solo no tiene antecedente sino que además contrasta con lo reportado por Castañeda (2001)<sup>79</sup> quien logró recuperar uno de los aislamientos de *C. gattii* reportado en la literatura el cual se aisló a partir de detritos de almendros (*Terminalia catappa*).

En el presente trabajo, cabe destacar que la probabilidad de encontrar *Cryptococcus spp* fue mayor en las cortezas de los árboles, siendo estas poco húmedas; además se resalta la doble positividad del individuo 39 del Parque Santander, en el cual se aisló concomitantemente el microorganismo a partir de

---

<sup>76</sup> VALLEJO Darío. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en el casco urbano del municipio de Pasto, Colombia. [Artículo científico] Revista Biosalud 2016; vol. 15, pp 62-71. DOI: 10.17151/biosa.2016.15.1.7 [consultado 20 de abril 2018] Disponible: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v15n1/v15n1a07.pdf>

<sup>77</sup> BARÓ M. Caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans*. [Tesis Doctoral]. Barcelona: Departamento de Genética I Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona.)2002

<sup>78</sup> HERKET, P. Op. Cit. pp 2.

<sup>79</sup> LAZERA M, NISHIKAWA M, SALMITO A, WANKE B.(2008) *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Med Mycol*;36: 119-22.

muestras de hoja y tierra; evidenciándose un predominio de *Cryptococcus neoformans* en dicha zona. Sin embargo, se logró determinar que el microorganismo aparentemente no se restringe a algún tipo de muestra en particular, ampliando el riesgo ambiental de contaminación.

Respecto al proceso de tipificación molecular de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* mediante PCR huella digital con primers específicos, se visualizaron amplificaciones entre 600 – 1000 pb, resultados muy similares a los descritos por Meyer w et al. 2003<sup>80</sup> aunque éste empleó el oligonucleótido M13 específico de ADN minisatélite como único cebador, así como en el análisis de RFLP del gen *URA5* a partir de aislados de muestras clínicas y ambientales.

En relación con éste tema, en el estudio realizado por Mark<sup>81</sup> se halló una alta prevalencia del patrón molecular VNI (serotipo A) correspondiente a *Cryptococcus neoformans* en el 84.7% de los aislamientos, en consistencia con los resultados de la presente investigación, en la cual reportamos este mismo patrón molecular en el 91,7% de las muestras ambientales, corroborando así el predominio del serotipo A referido en la literatura a partir de aislamientos clínicos y ambientales.

De igual manera, se reconoce en general una menor prevalencia para *Cryptococcus gattii*, aunque el valor referido para el patrón molecular VGII (serotipo B) en el mencionado estudio de Ferrer es mayor (15,3% del total de las muestras aisladas) respecto a lo determinado en el presente estudio (8.3% de las muestras); sin embargo, este hallazgo reviste gran importancia clínica, dada la relación de dicho genotipo con patología severa para el ser humano inmunológicamente competente, a diferencia de *Cryptococcus neoformans* el cual afecta principalmente a personas inmunosuprimidas.<sup>82</sup>

El hallazgo de una menor prevalencia ambiental de la reportada para *C.gattii* puede deberse a factores como el muestreo transversal, característico del presente trabajo, puesto que como se mencionó, éste se ha encontrado en diversidad de climas desde templados hasta tropicales<sup>83</sup> requiriéndose de un

---

<sup>80</sup> MEYER W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, Group ICS. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(2):189.

<sup>81</sup> MAK, S., Vélez, N., Castañeda, E., & Escandón, P. (2015). The Fungus among Us: *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Ecological Modeling for Colombia. *Journal of Fungi*, 332-344. Disponible: <http://www.mdpi.com/2309-608X/1/3/332/htm>).

<sup>82</sup> VALLEJO D; BENAVIDES C; CEBALLO A; CAICEDO M. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en el casco urbano del municipio de Pasto, Colombia. Disponible [En línea] <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v15n1/v15n1a07.pdf> [Citado el 28 de marzo del 2018].

<sup>83</sup> HERKET, P. Op. Cit. pp 3

análisis longitudinal que contemple diversidad de condiciones climáticas, en favor de una ampliación del conocimiento de la eco-epidemiología del hongo, más aún cuando otros autores como Zúñiga<sup>84</sup> refieren la no influencia de factores como humedad, temperatura ni época del año, para el hallazgo de *Cryptococcus spp.*

Finalmente, la realidad del departamento Norte de Santander es alarmante debido a la crisis de frontera por la que está atravesando la Ciudad, reflejada por ejemplo, en el incremento de diferentes enfermedades infecciosas, especialmente casos nuevos de individuos VIH positivos, según el boletín de SIVIGILA en la semana 52 del año 2017, en el cual se reportaron 388 casos confirmados por laboratorios en Cúcuta, respecto al reporte correspondiente a la misma semana del año inmediatamente anterior (2016), con 302 casos. De la misma manera, sólo en lo corrido del año 2018 (primer trimestre), ya se han reportado 104 casos confirmados por laboratorio en la ciudad.<sup>85</sup> Siendo que esta patología es de gran relevancia, debido a que el estado inmunosupresor que presentan estos pacientes, se convierte en un factor pre-disponible para otras infecciones, entre ellas criptococosis, resulta inminente la necesidad de fomentar la investigación permanente en éste campo.

---

<sup>84</sup> ZUÑIGA, V. Aislamiento presuntivo y caracterización de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* desde árboles en la región de O'Higgins y Maule, Chile. 2015. En Revista Micología Médica. Vol 30. Pp 6 -15 [Artículo en línea] Disponible en <http://portals3.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/400/363> [consultado el 10 de Junio del 2018]

<sup>85</sup> INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Boletín epidemiológico semana 18; Boletín epidemiológico semana 12. [consultado 10 abril 2018] Disponible: <https://www.ins.gov.co/Paginas/busqueda.aspx?k=VIH%202018>

## 5. ARTICULO CIENTIFICO

DETERMINACION DE *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* A PARTIR DE AISLADOS AMBIENTALES PROVENIENTES DE LOS PARQUES SANTANDER, MERCEDES ABREGO, JUANA RANGEL DE CUELLAR Y FUENTES DE LEONES EN EL MUNICIPIO DE SAN JOSE DE CUCUTA, NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA.

Erika Guerrero Martínez, Eliana Moreno Mora, Kelly Carrascal Quintero.  
E-mail: erikamartinez16@hotmail.com  
Universidad de Santander

### RESUMEN

Introducción: La Criptococosis es una micosis oportunista, con predilección por el sistema nervioso central. Afecta individuos inmunodeprimidos e inmunocompetentes y se ha relacionado con la exposición de las personas a excretas de aves, de las cuales la paloma urbana (*Columba livia*) es la más importante como reservorio del hongo. *C. neoformans* (serotipo A) es el principal agente etiológico (95% casos), causando 99% de las infecciones en pacientes con SIDA. En contraste, *C. neoformans* var. *Neoformans* (serotipo D) causa un 5% de las infecciones a nivel mundial. Objetivo: Determinar la presencia de *C. neoformans* y *C. gattii* a partir de aislados ambientales de parques del municipio de San José de Cúcuta. Materiales y métodos: Se realizó muestreo en los parques Juana Rangel de Cuellar, Santander, Mercedes Abrego y Fuente de Leones. Las muestras de corteza, tierra, hojas y frutos secos de distintas especies de árboles se homogenizaron en laboratorio y

sembraron en el agar *Guizotia abyssinica*; a las colonias melanogénicas se les realizó prueba de ureasa y de crecimiento en CGB, con observación microscópica empleando tinta china. Finalmente se empleó identificación molecular de especie mediante PCR huella digital. Resultados: De un total de 389 muestras obtenidas a partir de 147 individuos de diversa especie arbórea, en los 4 parques objeto estudio, se aislaron 12 colonias sospechosas en árboles Oití, Mango, Ficus, Samán y Tamarindo, de las cuales 11 se identificaron como *Cryptococcus neoformans* genotipo VNI y 1 como *Cryptococcus gattii* genotipo VGII, con prevalencias de 7,5% y 0,7%, respectivamente. Conclusión: nuestra investigación evidenció la presencia de especies patógenas de *Cryptococcus sp* en el 75% de las zonas públicas estudiadas, resaltando el hallazgo sin antecedente de *Cryptococcus gattii* en el parque Mercedes Abrego, y sentando bases para investigación continua que permita caracterizar el nicho ecológico de éste hongo en la ciudad de Cúcuta.

Palabras claves: Criptococosis, Inmunocompetente, inmudeprimidos, Hongo, PCR Huella Digital.

DETERMINATION OF *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* FROM ENVIRONMENTAL ISOLATIONS FROM THE SANTANDER PARKS, MERCEDES ABREGO, JUANA RANGEL DE CUELLAR AND SOURCES OF LIONS IN THE MUNICIPALITY OF SAN JOSE DE CUCUTA, NORTH OF SANTANDER, COLOMBIA.

### AUTHORS

Eliana Moreno Mora, Erika Guerrero Martínez, Kelly Carrascal Quintero.  
E-mail: erikamartinez16@hotmail.com

## SUMMARY

Introduction: The Criptococosis is a mycosis opportunist, with predilection for the nervous central system. It concerns individuals inmunodeprimidos and inmunocompetentes and has related to the exhibition of the persons to you excrete of birds, of which the urban dove (*Columba livia*) is the most important as reservoir of the mushroom. *C. neoformans* (serotipo A) he is the principal agent etiológico (95 % cases), causing 99 % of the infections in patients with BEEN. In contrast, *C. neoformans* var. *Neoformans* (serotipo D) causes 5 % of the infections worldwide. I target: To determine the presence of *C. neoformans* and *C. gattii* from isolated environmental of parks of the municipality of Cúcuta's San Jose. Materials and methods: sampling was realized in the parks Juana Rangel de Cuellar, Santander, Mercedes Abrego and Source of Lions. The samples of bark, land, leaves and dried fruits of different species of trees were homogenized in laboratory and sowed in the agar *Guizotia abyssinica*; to the

## INTRODUCCIÓN

El género *Cryptococcus spp* perteneciente al filum Basidiomycota, comprende alrededor de 100 especies, dentro de las cuales *C. neoformans* y *C. gattii* se han descrito como patógenos en humanos; dichas especies se han clasificado en varios serotipos, los cuales fueron determinados por variables antigénicas en su cápsula polisacárida: *C. neoformans* variedad *grubii* (serotipo A y subgrupos genéticos VNI y VNII), *C. neoformans* variedad *neoformans* (serotipo D con un subgrupo genético VNIV), *C. gattii* comprende los serotipos B(subgrupos genéticos VGI y VGII) y serotipo C (subgrupos genéticos VGIII y

colonies melanogénicas they test was realized of ureasa and of growth in CGB, with microscopic observation using Indian ink. Finally molecular identification of species used by means of PCR fingerprint. Results: Of a total of 389 samples obtained from 147 individuals of diverse arboreal species, in 4 parks I object study, 12 suspicious colonies were isolated in trees Oití, Handle, Ficus, Samán and Tamarind, of which 11 identified as *Cryptococcus neoformans* genotype VNI and 1 as *Cryptococcus gattii* genotype VGII, with prevalencias of 7,5 % and 0,7 %, Respectively. Conclusion: our investigation demonstrated the presence of pathogenic species of *Cryptococcus sp* in 75 % of the public studied zones, highlighting the finding without precedent of *Cryptococcus gattii* in the park Mercedes Abrego, and sitting bases for constant investigation that allows to characterize the ecological niche of this one mushroom in Cúcuta's city.

Key words: Criptococosis, Inmunocompetente, inmudeprimidos, Mushroom, PCR Fingerprint.

VGIV) y los híbridos AD Con un subgrupo genético VNIII.<sup>86</sup>

*C. neoformans* (serotipo A) es el principal agente etiológico de la infección denominada criptococosis (95%) y abarca un 99% de las infecciones en pacientes con SIDA. Contrario a esto, *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D) está asociado a un 5% de las infecciones en todo el mundo.<sup>87</sup>

En cuanto a su hábitat se han presentado evidencias a favor de la existencia de diversas plantas y material vegetal en descomposición en las

---

variedades *grubii* y *neoformans*. En cuanto a *C. gattii*, se ha logrado recuperar esta especie del ambiente en Australia a partir de detritos de *Eucalyptus camaldulensis*.

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 spp.*<sup>88</sup>

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. 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 este hongo a partir de una variedad de especies de árboles en diferentes partes del mundo, incluyendo Argentina, Colombia, Brasil, India, Sudáfrica y Tailandia. Además, el aislamiento de esta especie se ha reportado a partir de otras fuentes como cuevas de murciélagos, frutas e insectos.<sup>89</sup>

En los últimos 25 años los casos de Criptococosis humana han aumentado considerablemente, en gran medida debido a la supervivencia de enfermos con alteraciones en el sistema inmunológico como consecuencia de la epidemia del Sida y otro tipo de

condiciones de inmunosupresión, las infecciones por este hongo se han convertido en una causa importante de morbilidad y mortalidad. En la actualidad esta micosis se clasifica entre las tres infecciones oportunistas más importantes que conducen a la muerte en pacientes con Sida.<sup>90</sup>

“Por otra parte, 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 y los pacientes con trasplante de órganos son propensos a esta enfermedad”.<sup>91</sup>

La enfermedad es considerada como la micosis más importante que afecta el sistema nervioso central (SNC), y la forma clínica más común de esta enfermedad es la meningoencefalitis. El desarrollo temprano de la criptococosis se caracteriza por una infección respiratoria de tipo primario, usualmente asintomático, debido a la inhalación de propágulos del hongo que una vez llegan al pulmón tienden a diseminarse por vía sanguínea al SNC, sistema óseo y otros tejidos como piel, ojos y mucosas.<sup>92</sup>

Entre el 70% y 90% de los pacientes inmunocompetentes, presentan meningitis subaguda o una meningoencefalitis con cefalea, fiebre, cambios en la personalidad, pérdida de la memoria y letargia, que inician típicamente luego de un periodo de evolución de 2-4 semanas luego de la infección. Sin embargo, hay una gran variabilidad clínica, pudiendo los pacientes tener cefalea durante pocos días, intermitentemente durante meses o

simplemente no presentar cefalea, vomito ni signos de irritación meníngea.<sup>93</sup>

Por el contrario, los pacientes inmunocomprometidos desarrollan un cuadro clínico a los pocos días de la inhalación de propágulos, caracterizado típicamente por cefaleas fuertes, fiebre, náuseas, vómito, malestar general, visión borrosa, pérdida, de memoria, letargia, alteraciones en la conciencia, irritabilidad, cambios en la personalidad, y en algunos casos se pueden presentar estados de coma.<sup>94</sup>

Existen diferencias entre las formas clínicas de las infecciones causadas por *C. neoformans* y *C. gattii*, las cuales están determinadas según el hospedero, la respuesta inmune, los hallazgos clínicos y paraclínicos. El cuadro clínico desarrollado por *C. gattii* se diferencia del observado en *C. neoformans*, puesto que presenta una mayor incidencia de criptococomas en el pulmón y el cerebro, una mayor morbilidad a nivel neurológico y una menor respuesta al tratamiento antifúngico<sup>95</sup>.

Por otra parte, los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* a partir de muestras ambientales han tomado importancia a nivel mundial debido a la identificación de nuevos nichos ecológicos, y así mismo el reconocimiento a diversos focos de infección siendo estos de gran impacto para la población<sup>96</sup>

Según Escandon<sup>97</sup> en el estudio realizado en nuestro país en busca del hábitat de *C. gattii* en Cúcuta, se logró recuperar el primer aislamiento del serotipo C reportado en la literatura el cual estuvo asociado con almendros

(*Terminalia catappa*). En el seguimiento de los almendros reportados como positivos, se logró recuperar el hongo en 19,3% de las muestras, especialmente en aquellas asociadas con uno de los árboles estudiados. Con referente a lo anterior, se destaca que en los sitios de estudio las especies arbóreas de más prevalencia corresponden a Oití y Ficus de los cuales no hay estudios con reportes de aislados de *C.gattii* a partir de estas especies en la ciudad.

La presente investigación tuvo como fin realizar un amplio tamizaje ambiental en diferentes parques principales de la ciudad de Cúcuta, en un intento de aislar *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* de diferentes especies de árboles, para determinar su presencia y para ampliar nuestros conocimientos sobre la ecología y la epidemiología de esta levadura patógena en nuestra ciudad.

Lo anterior, permitirá en un futuro a las autoridades sanitarias y demás entidades competentes, tomar medidas preventivas en cuanto a las normas de bioseguridad adoptadas por comunidad susceptible en zonas de riesgo y de alta concurrencia, las cuales sean consideradas focos ambientales del hongo.<sup>98</sup>

El nivel de investigación es descriptivo porque propone caracterizar las variables del objeto de estudio o los componentes del fenómeno o problema observado. Se limita a realizar una descripción de los hechos, de la estructura o comportamiento de la variable medida, contada o caracterizada, se señalan los datos obtenidos y la naturaleza exacta de la población de donde fueron extraídos. Además con esta investigación se busca confirmar resultados obtenidos en otras investigaciones realizadas en la ciudad y

analizar diferentes muestras a las cuales no se les ha realizado este tipo de estudio.

## MÉTODO

El nivel de investigación es descriptivo debido a que se busca caracterizar las variables del objeto de estudio. Se limita a realizar una descripción de los hechos, de la estructura y/o comportamiento de la variable caracterizada. Así mismo, se señalan los datos obtenidos y la naturaleza exacta de la población de donde fueron extraídos.

Además con esta investigación se busca confirmar resultados obtenidos en otras investigaciones realizadas en la ciudad y analizar diferentes muestras a las cuales no se les ha realizado este tipo de estudio. Se considera un estudio de tipo transversal porque consiste en estudiar en un momento determinado a distintos grupos de muestras.

**Población.** Corresponde a parques públicos ubicados en el municipio de San José de Cúcuta, los cuales son: Parque Santander, Parque Nacional, Parque Juana Rangel de Cuellar, y Parque Fuente de Leones.

**Muestra:** A partir de cuatro parques seleccionados por su alta afluencia de habitantes, se tomó muestra de los árboles de cada uno (individuos), de la siguiente manera: frutos secos, hojas, corteza, tierra y excremento de paloma (si lo había); pues se tomó el 100% de los individuos de cada parque. lo cual arrojó un total de 147 individuos estudiados. A partir de estos individuos se recolectaron las muestras anteriormente mencionadas para un total de 389 muestras procesadas.

## FASES

I. Fase Descriptiva: A partir de la selección de 4 parques emblemáticos de

la ciudad de Cúcuta, como el Parque Santander, Parque Mercedes Abrego, Parque Juana Rangel de Cuellar y Parque Fuente de Leones; ubicados en zonas comerciales y altamente concurridas se procedió a diseñar un mapa por cada uno de los parques para conocer la cantidad de individuos (árboles) además de la especie de estos.

Posterior a esto, se planificaron tres jornadas de muestreo desde el año 2016 – 2017.

II. Fase Analítica: Se empleó Identificación de aislados por técnicas directas como la siembra en agar girasol, visualización de la cápsula en tinta china, degradación de urea, y la prueba de Canavanina-Glicina Azul de Bromotimol (CGB) para la diferenciación entre las especies de *C. neoformans* y *C. gattii*,

Además, aislamiento del ADN a partir de muestras ambientales sospechosas en la primera etapa. Realización de electroforesis en geles de agarosa al 1,2% de los resultados de la PCR. Y por último, Genotipificación de los aislados mediante PCR Huella Digital.

III. Fase Conclusiva: Teniendo caracterizado las cepas se procede a realizar el respectivo análisis e interpretación de los resultados mediante la tabulación en tablas de frecuencia.

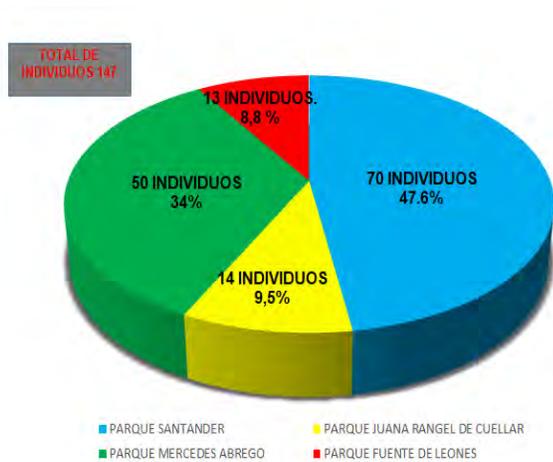
## RESULTADOS

De un total de 389 muestras obtenidas a partir de 147 individuos, y provenientes de diferentes géneros y especies de árboles, de los 4 parques objeto estudio, se aislaron 12 colonias sospechosas las cuales se logró identificar como *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.

El agente se aisló en 3 de las 4 zonas en donde se realizó el muestreo, con una prevalencia de *C. neoformans* en los

parques mencionados anteriormente de la ciudad de Cúcuta del 75% (p = Número de zonas en donde se aisló el agente/Total de zonas en donde se realizó el muestreo x 100.)

En el estudio realizado se rastrearon en total 147 individuos pertenecientes a los diferentes parques, donde el Parque Santander no solo longitudinalmente es más grande sino que cuenta con más vegetación y diversidad de especies arbóreas como oiti, mango, samán, y tamarindo. Además en éste se observó aparentemente mayor población de aves, ampliando la probabilidad de obtener el microorganismo de interés. De lo siguiente, es importante resaltar la estrecha relación del hongo con las palomas considerada esta como su nicho ecológico. (Véase Gráfica 1)

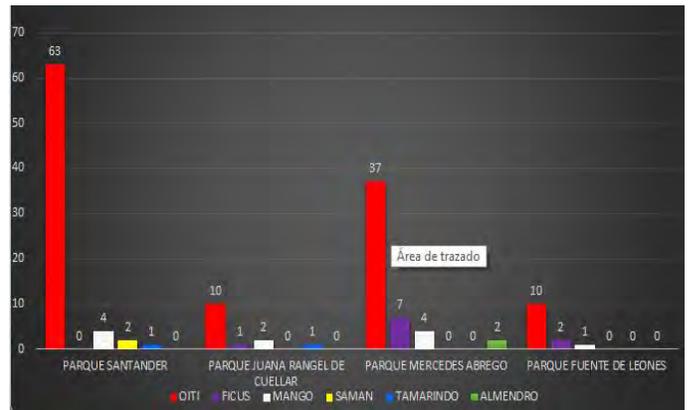


Gráfica 1. Caracterización de Individuos estudiados

A partir de la totalidad de individuos analizados se caracterizó las diversas especies arbóreas, identificándose 6 especies las cuales fueron: mango, oiti, ficus, tamarindo, almendro y mango. Además se encontró que el Oiti fue el

más prevalente en los diversos parques. Aunque Brasil es su país de origen, éste árbol también es muy popular en la Ciudad Colombiana de Cúcuta en el Departamento de Norte de Santander, pues al ser de gran tamaño sus ramas generan sombra y sofocan un poco el calor de esta urbe que normalmente es de 28°C a 32°C en días normales y de 32°C hasta 36 o 37°C en días extremadamente tórridos. (Véase Gráfica 2)

Gráfica 2. Caracterización de especies arbóreas



A partir de la identificación de los individuos a rastrear se recolectaron diversos tipos de muestras como: tierra, corteza, y hojas secas; todas estas muestras presentes alrededor del individuo con el objetivo de ampliar probabilidad del microorganismo. Adicionalmente, si estas tenían o no excretas de palomas.

A continuación, se evidencia que en el Parque Santander se analizaron en total 210 muestras siendo este parque (el de mayor número de muestras). (Véase Tabla 1.)

Tabla 1. Caracterización de tipo de muestras

PARQUES ESTUDIADOS	TIPO DE MUESTRAS			CANTIDAD
	TIERRA	CORTEZA	HOJA	
PARQUE SANTANDER	70	70	70	210
PARQUE MERCEDES ABREGO	50	50	0	100
PARQUE JUANA RANGEL DE CUELLAR	14	13	13	40
PARQUE FUENTE DE LEONES	13	13	13	39
<b>TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS = 389</b>				

Tinción de Tinta China. En primera estancia, ante sospecha de *Cryptococcus spp* de acuerdo al cultivo en Agar de *Guizotia Abyssinica* donde se evidenciaron colonias con pigmento melánico se procedió a realizar una serie de pruebas directas como la tinción con la Tinta China, debido a que microscópicamente permite una fácil visualización de la cápsula polisacárida incolora y muy característica del hongo. (Véase Figura 1)

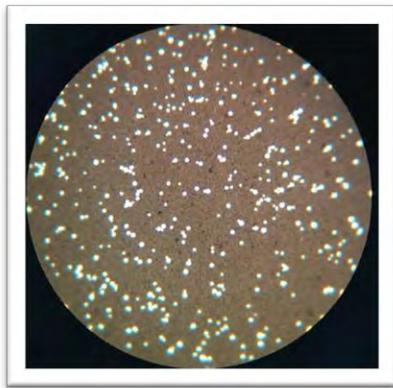


Figura 1. Confirmación de la Capsula mediante Tinta China. Fuente: Guerrero Erika, Moreno Eliana, Carrascal Kelly; Febrero 2018.

Prueba de Urea. De acuerdo a lo anterior, a las cepas sospechosas se le realizó identificación mediante técnicas bioquímicas, en este caso mediante la síntesis de la ureasa la cual es una metaloenzima que cataliza la conversión de urea a amonio y carbamato. La detección de esta enzima se utiliza corrientemente como una prueba para la identificación de diversos microorganismos, entre ellos *Cryptococcus sp.* Debido a que es uno de los factores que hace que este microorganismo sea más patógeno. (Véase Figura 2)



Figura 2. Prueba de Urea Positiva para *Cryptococcus sp.* Fuente: Guerrero Erika, Moreno Eliana, Carrascal Kelly; Mayo 2017.

Se realizó la prueba Bioquímica de ureasa a las muestras sospechosas de *Cryptococcus spp*, a partir de cultivo del medio saboraud y además el montaje con los respetivos controles; control positivo con cepa ATCC (American Type Culture Collection) de *Cryptococcus neoformans*, y control negativo con *Cándida albicans* (procedente del cepario de la Universidad de Santander)

A continuación resultados de cepas ureasa positiva. (Véase Tabla 2)

Tabla 2. Distribución geográfica de muestras ureasa positiva

IDENTIFICACIÓN DEL INDIVIDUO	TIPO DE MUESTRA	LUGAR DE PROCEDENCIA
Ind. 26	Corteza	Parque Santander
Ind. 35	Corteza	Parque Santander
Ind. 37	Tierra	Parque Santander
Ind. 39 <sup>a</sup>	Tierra	Parque Santander
Ind. 39b	Hoja	Parque Santander
Ind. 47	Corteza	Parque Santander
Ind. 58	Tierra	Parque Santander
Ind. 63	Corteza	Parque Santander
Ind. 68	Corteza	Parque Santander
Ind. 69	Tierra	Parque Santander
Ind. 5	Corteza	Parque Fuente de Leones
Ind. 2	Tierra	Parque Mercedes Abrego
<b>Total de Muestras = 12</b>		

Prueba de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Seguidamente, se realizó otra prueba bioquímica denominada canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) la cual permite diferenciar *Cryptococcus gattii* de *Cryptococcus neoformans*, debido a que *Cryptococcus gattii* resistente a la L-

canavanina (aminoácido natural estructuralmente similar a la L-arginina), el cual es degradado por las cepas de esta variedad, liberando amonio como compuesto final, virando el medio de amarillo verdoso a un azul de cobalto, por la presencia de azul de bromotimol. (Véase Figura 3)



Figura 3. Confirmación de la especie *Cryptococcus neoformans*, de las muestras ambientales mediante el medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Fuente: Carrascal Kelly, Moreno Eliana, Guerrero Erika, 2018.

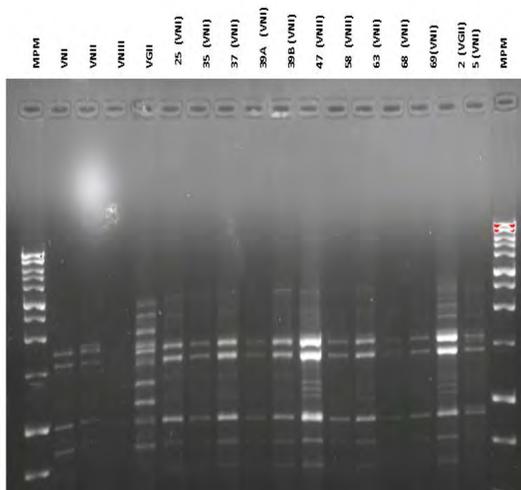
Se logró apreciar que a partir de las 12 cepas presuntivas de *Cryptococcus spp* solo una de identificó como *Cryptococcus gattii* de acuerdo al

fundamento de la técnica donde esta presentó un viraje del medio pasando de verde a azul de cobalto. Cabe resaltar, que para el montaje de la técnica anteriormente mencionada se realizó respectivos controles a partir de cepas ATCC de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.

Caracterización genética de las cepas de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, mediante PCR huella digital

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa. PCR-huella digital generada con el indicador (GTG) 5. (1) Marcador de Peso Molecular 1kb;(2-5) Patrones de *Cryptococcus sp*; (6-17) Muestras de los aislados ambientales positivos para *Cryptococcus neoformans*, serotipo A: VNI; *Cryptococcus gattii*, serotipo B: VGII.

Tabla 3. Caracterización de los patrones moleculares.



Identificación de la muestra	Tipo de muestra	Zona de procedencia	de	Especie individuo	del	Especie de <i>Cryptococcus</i>	de	Genotipo <i>Cryptococcus</i>
26	Corteza	Parque Santander		Mango ( <i>Mangifera indica</i> )		<i>C. neoformans</i>		VN I
35	Corteza	Parque Santander		Oití ( <i>Licania tomentosa</i> )		<i>C. neoformans</i>		VN I
37	Tierra	Parque Santander		Oití ( <i>Licania tomentosa</i> )		<i>C. neoformans</i>		VN I
39a*	Hojas	Parque Santander		Oití ( <i>Licania tomentosa</i> )		<i>C. neoformans</i>		VN I
39b*	Tierra	Parque Santander		Oití ( <i>Licania tomentosa</i> )		<i>C. neoformans</i>		VN I
47	Corteza	Parque Santander		Mango ( <i>Mangifera indica</i> )		<i>C. neoformans</i>		VN I
58	Tierra	Parque Santander		Mango ( <i>Mangifera indica</i> )		<i>C. neoformans</i>		VN I
63	Corteza	Parque Santander		Samán ( <i>Samanea saman</i> )		<i>C. neoformans</i>		VN I
68	Corteza	Parque Santander		Oití ( <i>Licania tomentosa</i> )		<i>C. neoformans</i>		VN I
69	Tierra	Parque Santander		Tamarindo ( <i>Tamarindus indica</i> )		<i>C. neoformans</i>		VN I
2	Tierra	Parque Mercedes Ábrego		Ficus ( <i>Ficus benjamina</i> )		<i>C. gattii</i>		VG II
5	Corteza	Fuente Leones	de	Oití ( <i>Licania tomentosa</i> )		<i>C. neoformans</i>		VN I

## DISCUSIÓN

Este estudio reveló la presencia de *Cryptococcus neoformans* a partir de

muestras ambientales en zonas altamente concurridas de la ciudad de San José de Cúcuta y consideradas emblemáticas, como los parques

Santander y Fuente de Leones, además de aislamiento de *C. gattii* de suelo (tierra) en el parque Mercedes Ábrego.

Del total de individuos analizados, el 8% (11/147) resultaron positivos para *C. neoformans*/*C. gattii*, así como el 3% de las muestras evaluadas a partir de éstos (12/389), porcentaje que resulta inferior a lo reportado por otros autores, como Ayala y Colaboradores (2011) en Cundinamarca, Colombia, en donde se aisló el agente en el 21% de las muestras ambientales analizadas<sup>99</sup>, a Arredondo y Colaboradores (2006), quienes determinaron una prevalencia del 26% de *C. neoformans* en muestras ambientales procedentes de lugares públicos de Santiago de Chile<sup>100</sup> y posteriormente a lo encontrado en el año 2001 en El Salvador, donde se aisló el agente en el 36,5% de las muestras evaluadas.<sup>101</sup>

De igual forma, la prevalencia hallada en el presente estudio resulta inferior a la registrada en 1996 en el perímetro urbano del municipio de Cali, Colombia, en donde se determinó presencia del agente en un 46,3% de muestras de heces de palomas<sup>102</sup>, con la aclaración de que en el presente trabajo no evaluamos al excremento de paloma como muestra independiente, lo que permite inferir que los muestreos realizados exclusivamente a partir de excretas de paloma posiblemente aumentan la probabilidad de aislar *Cryptococcus spp*, respecto a muestras ambientales tipo tierra, hojas y corteza de árboles, con o sin presencia de excretas de palomas, como las consideradas en el presente estudio, hecho que ha sido incluso referido anteriormente al igual

que cuando se llevan a cabo investigaciones longitudinales que permiten distinguir más características y comportamiento del hongo a lo largo del tiempo, de manera regular.

Sin embargo, se carece de estudios que establezcan una estandarización de las condiciones de muestreo adecuadas para determinar la presencia del patógeno, teniendo en cuenta que la variabilidad de las condiciones o factores de cada zona geográfica afectan el crecimiento del hongo.<sup>103</sup>

No obstante, la ciudad cuenta con un clima cálido que en ocasiones alcanza temperaturas altas con radiaciones solares intensas, lo cual se diferencia de los aislamientos realizados en Cundinamarca (Colombia) en donde el 88% de los aislamientos fueron recuperados en el piso térmico frío, indicando que las condiciones ambientales relacionadas con precipitaciones y humedad relativa alta, pocas horas de brillo solar, y temperaturas poco extremas, favorecen la ocurrencia y propagación del hongo en el ambiente.<sup>104</sup>

La baja humedad de las zonas o lugares de muestreo en el presente estudio fue una característica respecto al aislamiento del hongo. Este hallazgo no concuerda con lo reportado por Baró en 2002<sup>105</sup>, quien establece que *Cryptococcus spp* se multiplica extremadamente bien en las heces de palomas que no se colocan directamente en la luz del sol, especialmente en un ambiente húmedo, ni con lo reportado por Casadevall et al.<sup>106</sup>, en el 2003, quienes aseveran que el agente se

encuentra frecuentemente en zonas poco iluminadas y húmedas previamente contaminadas con excreta de palomas.

En el presente trabajo, la probabilidad de encontrar *Cryptococcus spp* fue mayor en las cortezas de los árboles, siendo estas poco húmedas; además se resalta la doble positividad del individuo 39 del Parque Santander, en donde se aisló concomitantemente el microorganismo a partir de muestras de hoja y tierra, por lo que pudimos determinar que el microorganismo aparentemente no se restringe a algún tipo de muestra en particular, ampliando el riesgo ambiental de contaminación.

Es importante resaltar la presencia de *Cryptococcus gattii* exclusivamente en el único árbol de especie ficus presente en el parque Mercedes Ábrego, hecho sin antecedentes en dicho parque y en contraste con lo reportado por Castañeda (2001)<sup>107</sup> quien logró recuperar uno de los aislamientos de *C. gattii* reportado en la literatura el cual se aisló a partir de detritos de almendros (*Terminalia catappa*).

Respecto al proceso de tipificación molecular de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* mediante PCR huella digital con primers específicos, se visualizaron amplificaciones entre 300 y 195 pb, resultados muy similares a los descritos por Meyer w et al. 2003<sup>108</sup> utilizando el oligonucleótido M13 específico de ADN minisatélite como único cebador, así como en el análisis de RFLP del gen *URA5* a partir de aislados de muestras ambientales.

En relación con éste tema, en el estudio realizado por Ferrer<sup>109</sup> se halló una alta

---

prevalencia del patrón molecular VNI (serotipo A) correspondiente a *Cryptococcus neoformans* en el 84.7% de los aislamientos, en consistencia con los resultados de la presente investigación, en la cual reportamos este mismo patrón molecular en el 91,7% de las muestras ambientales, corroborando así el predominio del serotipo A referido en la literatura a partir de aislamientos clínicos y ambientales.

De igual manera, se reconoce en general una menor prevalencia para *Cryptococcus gattii*, aunque el valor referido para el patrón molecular VGII (serotipo B) en el mencionado estudio de Ferrer es mayor (15,3% del total de las muestras aisladas) respecto a lo determinado en el presente estudio (8.3% de las muestras); sin embargo, este hallazgo reviste gran importancia clínica, dada la relación de dicho genotipo con patología severa para el ser humano.<sup>110</sup>

Finalmente, es necesario realizar más estudios, preferiblemente de tipo longitudinal, con muestreos en diferentes épocas del año, considerando los cambios climáticos de la ciudad y la capacidad termotolerante del microorganismo, junto con la identificación de nuevos nichos ecológicos para contribuir al esfuerzo mundial de la caracterización ecoepidemiológica de *Cryptococcus spp*, ya que se considera que éste tipo de estudios son esenciales en áreas donde la enfermedad afecta continuamente a gran proporción de la población, como parte de las actividades de control de las autoridades de salud pública.

## CONCLUSIONES

El presente estudio confirma la presencia de las especies *Cryptococcus*

---

*neoformans* y *Cryptococcus gattii* en los parques Santander, Fuentes de Leones y Mercedes Ábrego de la ciudad de Cúcuta Norte de Santander, a partir de aislados ambientales y sin antecedente para el tercero, dejando entrever una amplia distribución geográfica del hongo en la ciudad, especialmente en zonas públicas relevantes.

El aislamiento de *Cryptococcus neoformans* se obtuvo principalmente a partir de muestras de corteza de diversas especies arbóreas incluyendo: Oití, Samán, Ficus, Tamarindo y Mango en los tres parques en mención, además de la probabilidad de detección del hongo en más de un tipo de muestra en un mismo individuo (árbol), extendiéndose a tierra y Hojas, como se determinó en el parque Santander.

Con este estudio se aportó al conocimiento ecoepidemiológico del hongo, dado el hallazgo de *Cryptococcus gattii* VGII por primera vez, exclusivamente en el único árbol de especie ficus en el parque Mercedes Ábrego, sin antecedente alguno para este parque en la ciudad hecho que justifica la necesidad de nuevas investigaciones en torno a la completa caracterización de nichos ecológicos de especies patógenas de *Cryptococcus* en Cúcuta, Norte de Santander, como ciudad capital y en zona de frontera, susceptible a su vez a cambios constantes en el panorama epidemiológico de enfermedades infecciosas como VIH, relacionadas a predisposición para la ocurrencia de criptococosis grave.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

<sup>1</sup> KWON-CHUNG KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang ZA, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents

of cryptococcosis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014.

<sup>2</sup> YEF, Xie J-x, Zeng Q-s, Chen G-q, Zhong S-q, Zhong N-s. Retrospective analysis of 76 immunocompetent patients with primary pulmonary cryptococcosis. Lung. 2012; vol.190(3), pp 339-346.

<sup>3</sup> TORO V; BREVIS P. Aislamiento presuntivo y caracterización de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* desde árboles en la región de O'Higgins y Maule, Chile. Disponible [en línea] file:///C:/Users/Compaq/Downloads/400-807-1-SM.pdf.

<sup>4</sup> ALVARADO E. Estudio de los Factores de Patogenicidad de *Cryptococcus gattii*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de genética y Microbiología 2008.

<sup>5</sup> VALLEJO D; BENAVIDES C; CEBALLO A; CAICEDO M. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en el casco urbano del municipio de Pasto, Colombia.

<sup>7</sup> JONGWUTIWES U, Sungkanuparph S. Comparison of clinical features and survival between *Cryptococcus*'s in human immunodeficiency virus HIV-positive and HIV-negative patients. Infect 2008.

<sup>8</sup> MITCHELL, T. G. and J. R. Perfect. "Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*." [Artículo científico en línea] En: Revista Microbiología Clínica, 2015. vol 8 N° 4, pp 515-48.

<sup>9</sup> LOPEZ, Pablo "Criptococosis del sistema nervioso central." [Artículo científico en línea] En: Revista Mexicana de Neurociencia 2012 vol 3(1): pp 34-6.

<sup>10</sup> MITCHELL, T. G. and J. R. Perfect. "Cryptococcosis in the era of AIDS--100

years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*." [Artículo científico en línea] En: Revista Microbiología Clínica 2015. vol 8 N° 4, pp 515-48.

<sup>11</sup> SORRELL, T. "Cryptococcus neoformans variety gattii." [Artículo científico en línea] En: Revista Médica Micología 2014. vol. 39, pp 155-68. [19 de Marzo del 2017].

<sup>12</sup> ESCANDON, Patricia. Recuperación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C a partir de detritus de almendros. [citado 19 Nov 2017].

<sup>13</sup> JONGWUTIWES U, Sungkanuparph S. Comparison of clinical features and survival between *Cryptococcus*'s in human immunodeficiency virus HIV-positive and HIV-negative patients. *Infect* 2008.

<sup>14</sup> ARREDONDO Carlos. *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas recolectadas en lugares públicos de la ciudad de Santiago, Chile. [Tesis de Grado]. Santiago de Chile: Facultad de Medicina Veterinaria, Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología. 2006.

<sup>15</sup> ARREDONDO C. *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas recolectadas en lugares públicos de la ciudad de Santiago, Chile. [Tesis de Grado]. Santiago de Chile: Facultad de Medicina Veterinaria, Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología; 2006.

<sup>16</sup> AYALA D, López F, Valencia R. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras del ambiente contaminadas con excrementos de palomas en diferentes zonas en el salvador. [Artículo científico] en *Minerva Revista en Línea*, 2011. vol. 2, pp21-27.

<sup>17</sup> CAIDEDO Luz Dary. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas del perímetro urbano de Cali. [Artículo científico] *Revista Colombia Médica* 1996; vol. 27, pp 106-109.

<sup>18</sup> VALLEJO Darío. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces de

palomas (*Columba livia*) en el casco urbano del municipio de Pasto, Colombia. [Artículo científico] *Revista Biosalud* 2016; vol. 15, pp 62-71. DOI: 10.17151/biosa.2016.15.1.7.

<sup>19</sup> QUINTERO E, Castañeda E, Ruiz A. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca - Colombia. [Artículo científico] en *Revista Iberoamericana Micología* 2005, vol. 22, pp 93-98.

<sup>20</sup> CASTAÑEDA Elizabeth. En búsqueda del hábitat del *Cryptococcus* var. *gattii* en Colombia. [Artículo científico] *Revista Académica Col Ciencias Microbiología* 2011; vol. 25(94): pp 105-114.

<sup>21</sup> BARÓ M. Caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans*. 2012 [Tesis Doctoral]. Barcelona: Departamento de Genética I Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona.

<sup>22</sup> LAZERA M, Nishikawa M, Salmito A, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. [Artículo científico] *Medicine Mycology* 2008; vol. 36, pp 119-22.

<sup>23</sup> MEYER W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, Group ICS. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2013; vol. 9 (2):189.

<sup>24</sup> MAK, S., Vélez, N., Castañeda, E., & Escandón, P. The Fungus among Us: *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Ecological Modeling for Colombia. *Journal of Fungi*, 2015. Pp 332-344.

<sup>25</sup> INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Boletín epidemiológico semana 18; Boletín epidemiológico semana 12. [Consultado 10 abril 2018].

## 6. CONCLUSIONES

El presente estudio confirma la presencia de las especies *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* en los parques Santander, Fuentes de Leones y Mercedes Ábrego de la ciudad de Cúcuta Norte de Santander, a partir de aislados ambientales y sin antecedente para el tercero, dejando entrever una diversa distribución geográfica del hongo en la ciudad, especialmente en zonas públicas relevantes.

El aislamiento de *Cryptococcus neoformans* se obtuvo principalmente a partir de muestras de corteza de diversas especies arbóreas incluyendo: Oití, Samán, Ficus, Tamarindo y Mango en los tres parques en mención, además de la probabilidad de detección del hongo en más de un tipo de muestra en un mismo individuo (árbol), extendiéndose a tierra y Hojas, como se determinó en el parque Santander.

Con este estudio se aportó al conocimiento ecoepidemiológico del hongo, dado el hallazgo de *Cryptococcus gattii* VGII por primera vez, exclusivamente en el único árbol de especie ficus en el parque Mercedes Ábrego, sin antecedente alguno para este parque en la ciudad hecho que justifica la necesidad de nuevas investigaciones en torno a la completa caracterización de nichos ecológicos de especies patógenas de *Cryptococcus* en Cúcuta, Norte de Santander, como ciudad capital y en zona de frontera, susceptible a su vez a cambios constantes en el panorama epidemiológico de enfermedades infecciosas como VIH, relacionadas a predisposición para la ocurrencia de criptococosis grave.

## 7. RECOMENDACIONES

De acuerdo con el trabajo de hongos ambientales como *Cryptococcus sp*, precisamente por su naturaleza ambiental, se requiere para su proceso de identificación y preservación, de espacios exclusivos que faciliten un diagnóstico acertado sin contaminación con otras levaduras.

Brindar la información necesaria a las entidades departamentales de Salud respecto al estudio realizado para que tengan en cuenta los resultados obtenidos y así puedan tomar medidas preventivas e informar en cuanto a la enfermedad de Criptococosis que complica más a los pacientes inmunosuprimidos.

La presencia de las palomas en los parques de la ciudad de Cúcuta constituye una amenaza para la salud de los pacientes, la acumulación de las excretas, por lo que se tiene que hacer limpieza constante y de forma periódica.

Nuestros hallazgos nos llevan a inferir que es necesario realizar más estudios, preferiblemente de tipo longitudinal, con muestreos en diferentes épocas del año, considerando los cambios climáticos de la ciudad, junto con la identificación de nuevos nichos ecológicos para contribuir al esfuerzo mundial de la caracterización ecoepidemiológica de *Cryptococcus spp*, ya que se considera que éste tipo de estudios son esenciales en áreas donde la enfermedad afecta continuamente a gran proporción de la población, como parte de las actividades de control de las autoridades de salud pública.

## BIBLIOGRAFIA

ACEVEDO, Lilia. Genotipos de aislamientos de *Cryptococcus* de pacientes y muestras ambientales del Instituto Nacional Cardiopulmonar, utilizando PCR-RFLP URA5- Tegucigalpa, Honduras, 2015. [Consultado 19 noviembre 2017] [Artículo disponible]

En:  
<http://repositorio.unne.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/467/RIUNNE%20%20Tesis%20de%20Maestria%20%20Acevedo%20Almendarez%20Lilia%20Mercedes.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

ACOSTA B; Rodríguez J. *Criptococosis* Micología ULPGC Clínica San José, 2010. Disponible

en:  
<http://www.webs.ulpgc.es/micologiaveterinaria/criptococosis.pdf>.

ALVAREZ, C. PRESENCIA DE *Cryptococcus neoformans* EN EXCRETAS DE PALOMAS URBANAS EN SAN MIGUEL DE TUCUMÁN – ARGENTINA. 2010. Boletín Micológico. Vol. 25. Pp 29 -35. [Artículo en línea] Disponible en:  
<http://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/viewFile/71/55> [consultado 10 de Junio del 2018]

Analysis of Data from Laboratory-Based Surveillance .[Artículo en línea].En:Rev Journal of Fungi Enero 2018,vol.4 n°32.pp.1-14[consulta 09 de junio 2018]Disponible:

<file:///C:/Users/PC/Documents/colombia%20crypto%202018.pdf>.

BARÓ M. (2002) Caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans*. [Tesis Doctoral]. Barcelona: Departamento de Genética I Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona.

BARÓ, Epidemiología de la *Criptococosis* en España. Caracterización de los Aislados de *Cryptococcus neoformans*. [Artículo en línea]<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3864/mtbt1de2.pdf?sequence=1>. [citado 10 de junio 2018].

CASTELLÁ, G., M. Abarca, et al. (2008). "Cryptococcosis and pets." [Artículo científico en línea] En: Revista Iberoamericana de Micología vol 25 N°1, pp 19-24. [consultado 9 de Abril 2017] Disponible:  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-41572011000100014](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572011000100014)

CASTRO M, CORDOVA H. Características clínicas y laboratoriales de la coinfección VIH/SIDA y *criptococosis* meníngea en el Hospital Clínico Viedma de

Cochabamba, Bolivia. 2014. Disponible [en línea] <http://www.scielo.org.bo/pdf/gmb/v37n2/v37n2a4.pdf> [Citado el 09 de junio del 2018].

COELHO Carolina, CASADEVALL Arturo. The tools for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Advances in applied microbiology*. [Artículo científico] 2014; vol 87, pp 1-41 [consultado el 8 de marzo 2017] Disponible: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128002612000013?via%3Dihub>

COMITÉ CIUDADANO ANTI SIDA.COINFECCION.NICHO ECOLOGICO. [Citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: <https://comiteantisida-asturias.org/zona-positiva/tratamientos/coinfeccion-por-hepatitis-c/que-es-la-coinfeccion.html>.

CONTRERAS O, et al. (2011) Identificación presuntiva de *Cryptococcus gattii* aislado de *Terminalia catappa* en Montería, Córdoba, *Revista Cubana de Medicina Tropical*. Vol. 3 N°2. [Artículo científico disponible]En: **Colombia**[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602011000200002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000200002). [Consultado el 16 Abril del 2018]

DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS EE.UU. ESTADO SEROLOGICO [citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: <https://infosida.nih.gov/understanding-hiv-aids/glossary/4059/estado-serologico>.

DICCIONARIO ACADEMICO DE LA MEDICINA.GENOTIPO. [Citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: <http://dic.idiomamedico.net/genotipo>

DICCIONARIO CIENCIA Y SALUD.[Citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea] En: <https://www.significados.com/nicho-ecologico/>

DICCIONARIO DE CANCER. Líquido Cefalorraquídeo. [citado 15 de marzo 2018]. [Disponible en internet] En: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/liquido-cefalorraquideo>

DICCIONARIO ECOLOGICO. AGENTE PATOGENO [citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: [http://ecologico.esacademic.com/131/agente\\_pat%C3%B3geno](http://ecologico.esacademic.com/131/agente_pat%C3%B3geno).

DICCIONARIO MEDICO DE LA MEDICINA. Hongo. [Citado 15 de marzo 2018]. [Disponible en internet] En: <http://dic.idiomamedico.net/hongo>

DICCIONARIO MEDICO DE LA MEDICINA.CULTIVO [citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: <http://dic.idiomamedico.net/cultivo>.

DICCIONARIO MEDICO. Criptococcosis. [Citado 15 de marzo 2018]. [Disponible en internet] En: <http://www.doctissimo.com/es/salud/diccionario-medico/criptococosis>

DICCIONARIO MEDICO. INFECCION [citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: <http://www.diccionariomedico.net/diccionario-terminos/3468-infecci%C3%B3n>.

DICCIONARIO MEDICO. Inmunocompetente. [Citado 15 de marzo 2018]. [Disponible en internet] En: <http://elsalvador.medicosdoctores.com/diccionario-medico/inmunocompetente/i>

DICCIONARIO MEDICO.CRYPTOCOCCUS. [Citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/cryptococcus>.

DICCIONARIO MEDICO.CRYPTOCOCOSIS. [Citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: <http://www.diccionariomedico.net/diccionario-terminos/9049-criptococosis>

DICCIONARIO MEDICO.EFICACIA. [Citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: <https://diccionario.medciclopedia.com/1/eficacia/>.

DICCIONARIO MEDICO.ENFERMEDAD INFECCIOSA. [Citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: <https://diccionario.medciclopedia.com/1/enfermedad-infecciosa/>.

DICCIONARIO MEDICO.FENOTIPO. [Citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/fenotipo>

DICCIONARIO MEDICO.INMUDEPRESION [citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/inmunosupresion>.

ENCICLOPEDIA SALUD. Inmunosupresión. [Citado 15 de marzo 2018] [Disponible en internet] En: <https://educalingo.com/es/dic-es/inmunosupresion>

ELIZABETH QUINTERO; E. QUINTERO; A. RUIZ. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca Colombia [Artículo científico en línea] En: Revista Iberoam Micol 2005; Vol. 5, pp 93-98 [5 septiembre del 2017] Disponible: <http://reviberoammicol.com/2005-22/093098.pdf>

ESCANDON P, LIZARAZO J; Criptococcosis en Colombia: resultados de la encuesta nacional, 2006 – 2010. [Artículo Disponible] En: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/707> [consultado el 20 Noviembre del 2017]

ESCANDON, P. Lizarazo, J. Cryptococcosis in Colombia: Compilation and GARCÍA S y col. Procesos infecciosos del sistema nervioso central en el preludeo del siglo XXI; una revisión analítica [Artículo científico en línea][consulta 12/03/2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2013/mim133h.pdf>.

ESCANDON, Patricia. Recuperación de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotipo C a partir de detritos de almendro.[consultado 19 noviembre 2017]. [Artículo disponible] En: [file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/1089-4710-1-PB%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/1089-4710-1-PB%20(2).pdf)

FIRACATIVE C. TRILLES L.Y Cols. Advances in the Understanding of the *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* species complexes and cryptococcosis, 2017. [Artículo en línea]. <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/4/7/a019760.full.pdf+html> . [Citado 10 junio 2018].

GIUSIANO. F. MICOSIS OPORTUNISTAS [Artículo científico en línea] En: Cátedra de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Vol. 2 pp 1-9 [consulta 12/03/2018]. Disponible en: <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE%20Micosis%20oportunistas.pdf>.

GODOY, P. Caracterización fenotípica y tipificación molecular de cepas de *cryptococcus neoformans* aisladas de muestras clínicas en Hospital terciarios del Sur de Chile. Universidad Austral de Chile. 2015 [consulta 09 de junio 2018] Disponible [http://repositorio.conicyt.cl/bitstream/handle/10533/181475/BARRIA\\_YOLANDA\\_2663M\\_PARTE\\_I.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.conicyt.cl/bitstream/handle/10533/181475/BARRIA_YOLANDA_2663M_PARTE_I.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

GUTIERREZ E. Criptococcosis, 2013. [Consultado 19 de marzo del 2017]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v19n2/v19n2a08.pdf>.

HERKET, P. Ecoepidemiology of *Cryptococcus gattii* in Developing Countries. En Revista Journal of Fungi. 2017. [Artículo en línea] Disponible en: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/4/62/htm> [Consultado el 10 de junio del 2018]

HERKET, P. Op. Cit. pp 2.

HULL, C. M. and J. Heitman (2002). "Genetics of *Cryptococcus neoformans*." [Artículo científico en línea] En: Revista Genetica vol 36, pp 557-615. [consultado 16 Abril 2017] Disponible: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.genet.36.052402.152652> .

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Boletín epidemiológico semana 18; Boletín epidemiológico semana 12. [Consultado 10 abril 2018] Disponible: <https://www.ins.gov.co/Paginas/busqueda.aspx?k=VIH%202018>

INSTITUTO NACIONAL DEL CANCER.GANGLIOS LINFATICOS [citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/ganglio-linfatico>.

INSTITUTO NACIONAL CANCER DEL CANCER.INMUCOMPETENTE [citado 07 de noviembre 2017]. [Disponible en línea]En: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/inmunocompetente>.

KWON-CHUNG, J. K., T. Boekhout, E. 2002. "Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae)." [Artículo científico en línea] Taxon vol 51 N°4, pp 804-6 [consultado 9 Marzo del 2017] Disponible: <http://www.westerdijknstitute.nl/images/ResearchGroups/Publications/2002KwongChung0001.pdf>

KWON-CHUNG KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang ZA, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014.[consulta 24/03/2018].Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24985132>.

LAZERA M, NISHIKAWA M, SALMITO A, WANKE B.(2008) *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. Med Mycol; 36 : 119-122.

LIZARAZO, J. Op. Cit

LIZARAZO, J., M. Linares, et al. (2007). "Estudio clínico y epidemiológico de la criptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta Nacional, 1997 – 2005." [Artículo científico en línea] En: Biomédica vol 27, pp 94-109.

[Consultado 2 de Abril 2017] Disponible:  
<http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/236>

Lizarazo, J., Op. Cit. pp 101.

LOPEZ, P. R. (2002). "Criptococosis del sistema nervioso central." [Artículo científico en línea] En: Revista Mexicana de Neurociencia vol 3(1): pp 34-6.[19 de Marzo del 2017] Disponible en: <http://revmexneuroci.com/wp-content/uploads/2014/07/Nm0021-05.pdf> .

MAK, S., Vélez, N., Castañeda, E., & Escandón, P. (2015). The Fungus among Us: Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii Ecological Modeling for Colombia. Journal of Fungi, 332-344. Disponible: <http://www.mdpi.com/2309-608X/1/3/332/htm>).

MARTÍNEZ Ainsworth, El nicho ecológico / CIENCIORAMA. Vol, 2 pp 1-11 [consulta 12/03/2018]. Disponible en: [http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/273\\_cienciorama.pdf](http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/273_cienciorama.pdf)

MEDINA R, ACOSTA M; 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. 2004. file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/0294260\_00000\_0000%20(1).pdf [Consultado el 18 de septiembre del 2017]

MEYER W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, Group ICS. Molecular typing of IberoAmerican Cryptococcus neoformans isolates. Emerg Infect Dis. 2003;9(2):189.

MORTENSON, J .Detección de Cryptococcus gattii en Parques urbanos seleccionados del Valle de Willamette, Oregon [Artículo en línea].En:Rev Mycopathologia ,vol 175 .n°.pp.351-355 [consulta 09 de junio 2018]Disponible: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11046-013-9614-7>.

OLALLA, Ruiz y Cols. "PALOMAS, ESPECIES INVASORAS" [Artículo científico en línea] En: CONABIO. Biodiversitas vol, 82, pp 1-4 [consulta 12/03/2018].Disponible.  
<http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv82art2.pdf>

PERFECT JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease update by the Infectious Diseases Society of America. Clinical infectious diseases. 2010;50 (3):291-322

RAMÍREZ, A. Estudios de los factores de Patogenicidad de Cryptococcus gattii, 2008[Artículo en línea] <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2008/tdx-0925109-111919/evr1de1.pdf> [citado el 10 de junio del 2018].

RAMÍREZ, A. Op.Cit.Pp 9.

RAMÍREZ, A. Op.Cit.Pp20

RODRIGUES Marcio, NAKAYASU Ernesto et al. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence [Artículo científico en línea] En: Sociedad Americana de Microbiología 2008; vol. 7, pp 58-67. [Consultado 12 de marzo del 2017] Disponible: <http://ec.asm.org/content/7/1/58.full> .

ROSARIO Inmaculada, ACOSTA Begoña. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. [Artículo científico] Revista Iberoamericana Micología 2008; vol. 25: pp13-18. [Consultado 20 abril 2018] Disponible: <http://reviberoammicol.com/2008-25/S13S18.pdf>

SANCHEZ, S. Caracterización molecular de los aislamientos de *Cryptococcus neoformans* de pacientes con HIV, Guayaquil, Ecuador [Artículo en línea].En: Rev Biomedica, vol 37.n° 3.pp.1-7[consulta 09 de junio 2018]Disponible: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3322/3666>

SCHMIDT A, Dimorphismin human pathogenic and apathogenic yeasts, [Libro en Línea] En: <https://books.google.com.co/books?id=UGqtClqStAYC&pg=PR8&dq=Alspaugh,+J.+A.,+R.+C.+Davidson+%22Morphogenesis+of+Cryptococcus+neoformans.%22&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjyZKKg67WAhWB6yYKHSXYAugQ6AEIKzAB#v=onepage&q=Alspaugh%2C%20J.%20A.%2C%20R.%20C.%20Davidson%20%22Morphogenesis%20of%20Cryptococcus%20neoformans.%22&f=false> año 2000 Editorial Karger, vol 5, pp 217-38.

SORRELL, T. C. (2001). "*Cryptococcus neoformans* variety *gattii*." [Artículo científico en línea] En: Revista Médica Micología vol 39, pp 155-68. [19 de Marzo del 2017] Disponible: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/mmy.39.2.155.168>.

TAFUR, J. MONTES, J. PLAN ESTRATÉGICO PARA EL CONTROL DE ROEDORES Y PALOMAS EN LA CORPORACIÓN DE ABASTOS DE BOGOTÁ S.A. Universidad de la Salle. 2014. Pag 3. Disponible [en línea] <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/17553/T14.14%20T125p.pdf?sequence=3> [Citado el 09 de junio del 2018].

TAPIA C; CORREA N. Género *Cryptococcus*, Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 2015 [Citado el 25 de marzo del 2018]. Disponible [en línea]

[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S071610182014000600012](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071610182014000600012)

TELLO M, GUTIERREZ E y Cols. Criptococosis.2013. En Revista Scielo. Disponible [en línea] <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v19n2/v19n2a08.pdf> [citado el 10 de junio del 2018].

TORO V; BREVIS P. Aislamiento presuntivo y caracterización de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* desde árboles en la región de O'Higgins y Maule, Chile, 2015. Disponible [en línea] <http://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/400> [Citado el 27 de marzo 2018].

VALLEJO D; BENAVIDES C; CEBALLO A; CAICEDO M. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en el casco urbano del municipio de Pasto, Colombia.2016. Disponible [En línea] <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v15n1/v15n1a07.pdf> [Citado el 28 de marzo del 2018].

VALLEJO D. Op. Cit. Pp 69

VALLEJO D. Op. Cit. pp 69

VALLEJO D. Op. Cit. pp 67

VALLEJO, D Op.Cit. Pp.63.

VALLEJO, D. Op. Cit. Pp 65

VALLEJO; D. BENAVIDES; C. CASTILLO; A.Op. Cit. Pp 64

WALEED E, KIEREN A y Cols. Immunology of Cryptococcal Infections: Developing a Rational Approach to Patient Therapy.2018 Revista Microbial Immunology [en línea] <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00651/full> [Citado el 10 de junio del 2018].

YEF, Xie J-x, Zeng Q-s, Chen G-q, Zhong S-q, Zhong N-s. Retrospective analysis of 76 immunocompetent patients with primary pulmonary cryptococcosis. Lung. 2012.[consulta 24/03/2018].Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22246551>.

ZUÑIGA, V. Aislamiento presuntivo y caracterización de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* desde árboles en la región de O'Higgins y Maule, Chile. 2015. En Revista Micología Medica. Vol 30. Pp 6 -15 [Artículo en línea] Disponible en <http://portals3.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/400/363> [consultado el 10 de Junio del 2018]

## **ANEXOS**

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  RECOLECCION DE MUESTRAS AMBIENTALES	<b>Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.</b>
		Semillero de Investigación Dolly <b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POERMA-01	Versión: 02	

## Anexo 1. Recolección de muestras ambientales

### RECOLECCION DE MUESTRAS AMBIENTALES

#### OBJETIVO

Implementar las medidas pertinentes para la recolección de muestra de suelos, cortezas de árboles y heces de palomas que serán sometidas a distintos análisis con el fin de identificar presencia de *Cryptococcus spp.*

#### INTRODUCCION

El diseño del muestreo consiste en proponer y aplicar en cada sitio el procedimiento más adecuado para obtener información apropiada sobre la presencia de microorganismos ambientales concurridos. La importancia del muestreo radica en que la información de los resultados obtenidos ha de ser significativa y fiable, de manera que la toma de decisiones sobre el sitio potencialmente contaminado sea adecuada a su particular problemática. En concreto, la problemática de cada sitio queda referida a los riesgos que existan para la salud humana y la protección de los ecosistemas.

#### SEGURIDAD

Precauciones generales: Para la toma de muestra se usará en todo momento las medidas de bioseguridad necesarias, tales como uso de bata, guantes, tapabocas, lentes de protección y gorro. Se deberá evitar el contacto directo con la piel y prestar atención adecuada a la higiene. Al terminar el procedimiento, quítese los guantes y lávese bien las manos.

#### DEFINICIONES

Excretas: Todo material de desecho que se elimina del organismo, como heces.

Cortezas de árboles: Es la capa más externa de tallos y de raíces de plantas leñosas, como los árboles.

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  <b>RECOLECCION DE MUESTRAS AMBIENTALES</b>	<b>Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.</b>
		Semillero de Investigación Dolly <b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POERMA-01	Versión: 02	

**Suelo:** Es la parte superficial de la corteza terrestre, biológicamente activa, que proviene de la desintegración o alteración física y química de las rocas y de los residuos de las actividades de seres vivos que se asientan sobre ella

**Parque:** Es un terreno de larga extensión natural y protegido por el estado el cual es situado en el interior de una población, que se destina a prados, jardines y arbolado sirviendo como lugar de esparcimiento y recreación de los ciudadanos.

**Palomas:** Ave domestica que provino de la paloma silvestre, de la que hay muchas variedades que se diferencian principalmente por el tamaño y color.

## MATERIALES Y EQUIPOS

- ❖ Bolsas plásticas de cierre hermético (capacidad de 6x6)
- ❖ Pinzas
- ❖ Balanza
- ❖ Espátula
- ❖ Papel kraff
- ❖ Cava (para transporte de muestras)

## REACTIVOS

Alcohol antiséptico al 70%.

## RESPONSABLES

Aymet Patricia Rubio Cano  
 Damarys Lorena Gelves  
 Trujillo  
 Giovany Alexander Rincón  
 Castrillon Dra. Denny Cárdenas  
 Dra. Karina Angarita

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  RECOLECCION DE MUESTRAS AMBIENTALES	<b>Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.</b>
		Semillero de Investigación Dolly <b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POERMA-01	Versión: 02	

### DURACION

4 horas

### PROCEDIMIENTO

Inicialmente se debe usar las Normas de Bioseguridad necesarias para la toma de muestra con la finalidad de evitar cualquier tipo de accidente, o alguna contaminación que pueda afectar los resultados de este estudio. Se llevara a cabo los siguientes pasos:

- Área de muestreo
- Toma de muestra
- Envasado e identificación de la muestra
- Transporte

**AREA DE MUESTREO:** Se realizara un croquis del área de muestreo asignando una respetiva identificación para cada árbol, siendo estos considerados como individuos. Por lo tanto, se debe muestrear la totalidad de individuos.

- 9.1 TOMA DE MUESTRA:** Con el croquis elaborado, se procede hacer la toma de muestra a cada individuo, tomando hojas de los árboles, frutos secos y de suelo, las cuales se tomara con pala recolectora depositándose cada muestra en su respectiva bolsa plástica. Seguido se recolectara la toma de muestra de corteza de árbol con pinza metálica y se depositara en bolsa plástica. Por último se procede a la toma de muestra de heces de palomas con la pala recolectora depositándose en una bolsa plástica. Es importante tener en cuenta que la cantidad establecida para cada muestra es de 5gr.

**ROTULACION E IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:** las muestras se envasan en una bolsa de plástico resistente con cierre hermético, se rotulan con lápiz de tinta no

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  <b>RECOLECCION DE MUESTRAS AMBIENTALES</b>	<b>Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.</b>
		Semillero de Investigación Dolly <b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POERMA-01	Versión: 02	

borrable; se debe rotular teniendo en cuenta las iniciales del parque, el numero de individuo del parque, y el tipo de muestra. Por lo tanto quedaría así, ejemplo: SB/individuo 1 / corteza.

Se recomienda no introducir en la bolsa materiales externos a la muestra.

**TRANSPORTE:** Se debe evitar que las muestras recolectadas sean expuestas directamente al sol o a otra fuente de calor durante su transporte, el que debe ser en el menor tiempo posible. Además, se debe reducir el riesgo de eventuales contaminaciones externas durante el recorrido al laboratorio.

#### REFERENCIAS:

<http://www.sag.cl/sites/default/files/Protocolo%20toma%20muestras%20suelo.pdf>

[http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques\\_Tematicos/Establecimiento\\_Y\\_Calidad\\_De\\_Los\\_Recursos\\_Naturales/Suelo/Contaminacion\\_pdf/Toma.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Establecimiento_Y_Calidad_De_Los_Recursos_Naturales/Suelo/Contaminacion_pdf/Toma.pdf)

	<p align="center"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b></p> <p align="center">PREPARACION DE PBS</p>	<p align="center"><b>Programa de Bacteriología y</b> Semillero de Investigación Dolly</p>
		<p align="center"><b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017</p>
<p>Código: POEPBS-02</p>	<p>Versión: 02</p>	

## Anexo 2. Solución Buffer de Fosfato

**OBJETIVO:** Establecer los lineamientos para la realización, la constitución, y el funcionamiento de soluciones amortiguadoras de pH, para las prácticas de laboratorio.

**FUNDAMENTO:** La Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. Su osmolaridad y concentración de iones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ). Esta solución se prepara a partir de Cloruro de Sodio, Fosfato de Sodio.

### SEGURIDAD:

Se usará en todo momento las medidas de bioseguridad necesarias, tales como uso de bata, guantes, tapabocas, lentes de protección y gorro.

Se deberá evitar el contacto directo con la piel y prestar atención adecuada a la higiene. Los buffers son sustancias irritantes que contienen clorhidrato de guanidina. Este reactivo es nocivo al entrar en contacto con la piel, ser inhalado o ingerido. Al terminar el procedimiento, quítese los guantes y lávese bien las manos.

### DEFINICIONES

**PH:** Es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución. El pH indica la concentración de iones hidrógeno  $[\text{H}^+]$  presentes en determinadas disoluciones.

**SOLUCION SALINA:** Es una disolución acuosa de sustancias compatibles con los organismos vivos debido a sus características definidas de osmoticidad, pH y fuerza iónica. Está compuesto de agua y electrolitos.

**CLORURO DE SODIO:** Comúnmente conocido como sal de mesa, o en su forma mineral halita, es un compuesto químico con la fórmula  $\text{NaCl}$ . El cloruro de sodio es una de las sales responsable de la salinidad del océano y del fluido extracelular de muchos organismos.

	<p align="center"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b></p> <p align="center">PREPARACION DE PBS</p>	<p align="center"><b>Programa de Bacteriología y</b> Semillero de Investigación Dolly</p>
		<p align="center"><b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017</p>
<p>Código: POEPBS-02</p>	<p>Versión: 02</p>	

FOSFATO DE SODIO: Es una forma genérica de definir las tres diferentes sales del sodio y del ácido fosfórico.

### MATERIALES Y EQUIPOS

- Probetas de 50mL, 100mL y 1000mL
- Vaso precipitado 1000mL
- Agitador
- Balanza
- Papel Kraff
- Espátula
- Papel aluminio

### REACTIVOS

NaCl.....8.5 gr

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 1.4 gr

Agua Destilada.....1000 ml

### RESPONSABLES

Aymet Patricia Rubio  
Cano| Damarys Lorena  
Gelves Trujillo Gyovany  
Alexander Rincón  
Castrillon Dra. Denny  
Cárdenas  
Dra. Karina Angarita

### DURACION

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  PREPARACION DE PBS	<b>Programa de Bacteriología y</b> Semillero de Investigación Dolly
		<b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POEPBS-02	Versión: 02	

1 Hora

## PROCEDIMIENTO

Nota:

- Para poder obtener PBS AL 1X SE DEBE HACER PRIMERO A 10X
- Para la preparación de 1000 mL de PBS a una concentración de 10X se llevaran a cabo los siguientes pasos:
- Por cada litro de pbs al 10X que preparemos nos va a alcanzar para 10 litros de pbs al 1X.

1 litro de PBS a 10X se prepara de la siguiente manera:

1. En un vaso precipitado adicionar 500ml de agua destilada.
2. Agregar las sales: Para 1 litro se agrega:  
 NaCl-----  
 ---□8.5 g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-----  
 ---□1.4g
3. Se completa hasta 1 litro con agua destilada y se revuelve con un agitador.
4. Se rotula como PBS 10X, con la fecha de preparación y responsable.
5. Se lleva a auto clavar por 2 horas.
6. Almacene a temperatura ambiente (uso rutinario) o bajo refrigeración entre 4 y 8 °C.

### DILUCION DE PBS AL 1X



	<p align="center"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b></p> <p align="center">PREPARACION DE PBS</p>	<p align="center"><b>Programa de Bacteriología y</b> Semillero de Investigación Dolly</p>
		<p align="center"><b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017</p>
<p>Código: POEPBS-02</p>	<p>Versión: 02</p>	

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Tomado de Protocolo del Instituto Nacional de Salud, Micología estudio de *Cryptococcus spp.*

	<p align="center"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b></p> <p align="center">PREPARACION Y SIEMBRA DE MUESTRAS AMBIENTALES</p>	<p align="center"><b>Programa de Bacteriología y</b> Semillero de Investigación Dolly</p>
		<p align="center"><b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017</p>

### **Anexo 3. Preparación y siembra de muestras ambientales**

**OBJETIVOS:** preparación de las muestras y siembra de muestras ambientales con el fin de aislar *Cryptococcus spp.*

#### **INTRODUCCION:**

Las muestras ambientales a causa de su alta carga de microorganismos deberán ser sometidas a un proceso previo que permita su purificación y así mejorar las condiciones de crecimientos de *Cryptococcus spp.*

#### **SEGURIDAD**

Precauciones generales: Para la toma de muestra se usará en todo momento las medidas de bioseguridad necesarias, tales como uso de bata, guantes, tapabocas, lentes de protección y gorro. Se deberá evitar el contacto directo con la piel y prestar atención adecuada a la higiene. Al terminar el procedimiento, quítese los guantes y lávese bien las manos.

#### **DEFINICIONES**

**CLORANFENICOL:** Es un antibiótico bacteriostático de amplio espectro contra bacterias grampositivas y gramnegativas, así como contra otros microorganismos

**TUBOS FALCON:** Tubos de fondo cónico, en polipropileno transparente, indicados para pruebas con centrifugación en laboratorios de inmunología, microbiología, etc.

**PBS:** es una solución tampón o buffer empleada en la investigación biológica, bioquímica y de inmunología diagnóstica. Es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio puede emplearse como diluyente para métodos de desecación de biomoléculas.

	<p align="center"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b></p> <p align="center">PREPARACION Y SIEMBRA DE MUESTRAS AMBIENTALES</p>	<p align="center"><b>Programa de Bacteriología y</b> Semillero de Investigación Dolly</p>
		<p align="center"><b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017</p>

### MATERIALES

- ❖ 1 Tubos falcon 50ml
- ❖ 1 Tubos falcon 15ml

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  <b>PREPARACION Y SIEMBRA DE MUESTRAS AMBIENTALES</b>	<b>Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.</b>  Semillero de Investigación Dolly  <b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POEPSMA-03	Versión: 02	

- ❖ 1 Embudo pequeño
- ❖ Micropipeta de 1000ul
- ❖ Puntas de 200ul
- ❖ Asas desechable
- ❖ Gasa
- ❖ Gradillas

### REACTIVOS

- ❖ Cloranfenicol 40gr x litro
- ❖ PBS al 1X

### RESPONSABLES

Aymet Patricia Rubio  
 Cano Damarys  
 Lorena Gelves Trujillo  
 Gyovany Alexander  
 Rincón Castrillon Dra.  
 Denny Cárdenas  
 Dra. Karina Angarita

### DURACION

1 hora y 20 minutos

### PROCEDIMIENTO

- Pesar tubo falcón de 50 ml.
- Agregar 5 gr de la muestra
- Agregar 25ml de PBS al 1X y tapar
- Agitar por inversión
- Filtrar con un embudo y gasa en tubo de 15ml
- Agregar 200ul de Cloranfenicol

	<p style="text-align: center;"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b></p> <p style="text-align: center;">PREPARACION Y SIEMBRA DE MUESTRAS AMBIENTALES</p>	<p><b>Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico.</b></p> <p>Semillero de Investigación Dolly</p> <p><b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017</p>
<p>Código: POEPSMA- 03</p>	<p>Versión: 02</p>	

- Se deja una hora a temperatura ambiente y finalmente se procede a la siembra en el agar girasol y se incuba durante 20 días a una temperatura no mayor de 28°C se debe seguir una supervisión diaria del crecimiento el cual será registrado en el Formato RCAG-05.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

<http://www.uca.edu.ar/uca/common/grupo11/files/micologia->

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  PREPARACION CALDO UREA	<b>Programa de Bacteriología y</b>  Semillero de Investigación Dolly
		<b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POEU-05	Versión: 02	

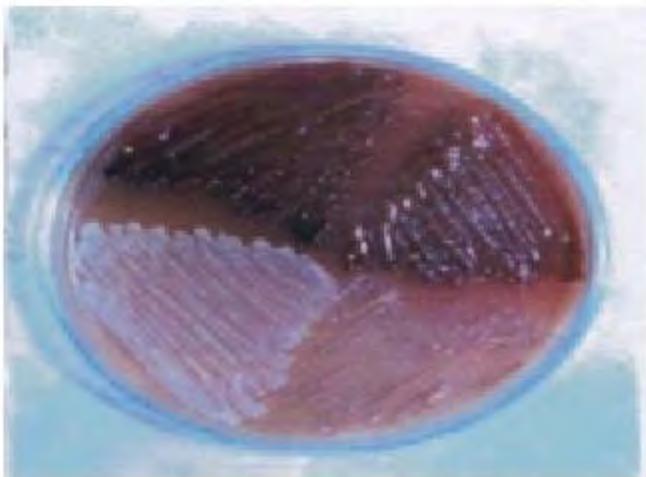
## Anexo 4. Preparación de AGAR GIRASOL

### 1. OBJETIVO.

Establecer los lineamientos para la preparación de agar girasol utilizado para el aislamiento de *Cryptococcus* sp a partir de muestras ambientales como corteza de árboles, suelo, y excretas de palomas.

### 2. FUNDAMENTO.

El medio de cultivo ácido cafeico contenido en extracto de la semilla de (*Guizzotia abisyntica*) que detecta la enzima fenol desarrollada por *Cryptococcus neoformans*. reacción enzimática melanina, la cual es absorbida por la pared del hongo produciendo un marrón.



contiene el girasol permite oxidasa  
  
La produce celular color

El medio *Guizzotia abisyntica* es usado para el aislamiento de *Cryptococcus neoformans* de substratos naturales, tales como las excretas de paloma, debido a que las colonias toman un pigmento marrón característico; sin embargo, el crecimiento excesivo de otras especies de levaduras puede impedir el crecimiento de *Cryptococcus neoformans*.

### 3. SEGURIDAD.

Se usará en todo momento las medidas de bioseguridad necesarias, tales como uso de bata, guantes, tapabocas, lentes de protección y gorro. Cambie los guantes cada vez que sea necesario.

Al terminar el procedimiento, quítese los guantes y lávese bien las manos.

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  PREPARACION CALDO UREA	<b>Programa de Bacteriología y</b>  Semillero de Investigación Dolly
		<b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POEU-05	Versión: 02	

#### 4. DEFINICIONES.

Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): Agente amortiguador.

Guizotia abisynica: Es el nombre botánico de esta especie perteneciente a la familia Asteraceae y es conocida de forma común como: semilla de niger, ramtil, ramtilla, semilla inga, semilla negra, niger, noog y nug

#### 5. MATERIALES Y EQUIPOS.

- Magneto
- Baño serológico
- Termómetro
- Probeta de 1000 ml
- Erlenmeyer 1000 ml
- Estufa
- Licuadora
- Gasas
- Balanza
- Espátulas
- Guantes de látex
- Mechero
- Cabina de seguridad
- Cajas de Petri 20 ml
- Papel craf
- Cinta tirro
- Cepas ATCC *Cryptococcus*
- Asas desechables
- Fosforos
- Papel absorbente
- Toalla de tela
- Ampollas de control autoclave.

#### 6. REACTIVOS.

- Agar- Agar
- Semillas de Girasol
- Creatinina
- Glucosa
- Fosfato de Potasio Monobásico (  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  PREPARACION CALDO UREA	<b>Programa de Bacteriología y</b>  Semillero de Investigación Dolly
		<b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POEU-05	Versión: 02	

- Agua Destilada
- Bifenil
- Amicacina
- Cloranfenicol
- Etanol
- Alcohol 70% en recipiente spray

## 7. RESPONSABLES

Aymet Patricia Rubio Cano  
 Damarys Lorena Gelves  
 Giovany Alexander Rincón  
 Dra. Denny Cárdenas  
 Dra. Karina Angarita

## 8. DURACIÓN.

1 hora.

## 9. PROCEDIMIENTO.

Preparación de agar girasol para 1 litro

- Licuar 50g de semillas de girasol en 500 ml de agua destilada, después de licuado colarlo en una probeta de 1000 ml con la ayuda de una gaza y completar a 1000 ml de agua destilada, hervir y filtrar con gasa. Esto se deposita en un matraz de 1000ml. Se le agrega los siguientes compuestos:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -----1 g  
 Creatina -----1 g  
 Agar ----- 15 g

2

- Se revuelve con un agitador y se pone a calentar hasta que hierva; mientras hierve se debe estar revolviendo constantemente para que no se pegue.
- Luego de haber hervido se lleva a autoclavar por 2 horas.
- Cuando salen del autoclave se deja enfriar hasta que esté al calor de leche.
- Antes de servir las en las cajas de Petri se debe prepararlas siguiente:

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  PREPARACION CALDO UREA	<b>Programa de Bacteriología y</b>  Semillero de Investigación Dolly
		<b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POEU-05	Versión: 02	

2.1 Preparación del Bifenil: por cada 1 litro de agar se agrega 25 ml de bifenil que se prepara de la siguiente manera:

Bifenil -----1 g  
 Etanol -----25ml

2.2 Preparación del Cloranfenicol: por cada 1 litro de agar se agrega 2 ml de cloranfenicol que se prepara de la siguiente manera:

[ ] De cloranfenicol= 40 g/litro  
 En este caso se hace una regla de tres: 40 g-----  
 1000 ml  
 x----- 2 ml ---- aquí va lo que necesitamos preparar de cloranfenicol para la cantidad de litros de agar que se tiene.(EN ESTE CASO 1) SE NECESITA 0.8.

SE PUEDE PARTIR DE LA CONCNETRACION DE LA CAPSULA COMERCIAL LA CUAL ES DE 0.25 GRAMOS.

40 g-----1000 ml  
 0,25----- X

El resultado que nos da es lo que necesitamos de cloranfenicol en capsula, teniendo en cuenta que cada capsula trae 0.25 gramos.

Preparación del Amikacina: por cada 1 litro de agar se agrega 1 ml, en este caso la amikacina viene en ampolla.

- Luego de preparar todo estos compuestos se le agregan al agar y se revuelve y ahí si se procede a servir en las cajas de Petri plásticas, las cajas deben quedar rebosadas de agar, es decir casi llenas.

### 2.3 CONTROL DE CALIDAD

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  PREPARACION CALDO UREA	<b>Programa de Bacteriología y</b>  Semillero de Investigación Dolly
		<b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POEU-05	Versión: 02	

Esterilidad: 37°C por  
24 H Aspecto: café  
claro

Para Aspecto y Crecimiento: Emplear un control positivo de *Cryptococcus sp*, el cual desarrollará una pigmentación marrón y un control negativo de *Candida sp*. que desarrollará de color blanco. Registrar los datos en EL RCMC-04

10. REGISTROS RELACIONADOS. Registro control de medios de Cultivos RCMC 04.

11. REVISIÓN PERIÓDICA.

El presente documento se revisará durante la etapa de planificación de los proyectos de investigación del semillero DOLLY y del grupo de investigación BIOGEN que involucren la determinación de aislados ambientales del complejo *Cryptococcus neoformans/gattii* en los parques Simón Bolívar, Antonia Santos, Colon y Nacional, y se harán las correspondientes modificaciones de acuerdo a los objetivos del estudio y al kit comercial a emplear.

## 12. DOCUMENTOS Y REFERENCIAS.

Barcelona, u. a. (2002). Epidemiología de la Criptococosis en España.

Ministerio de Salud del Perú, I. N. (2010).

Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Medicina & Laboratorio, Volumen 16, Números 9-10.

MALDONADO L, B; SOSA B, A y MIZRACHI, R. Aislamiento de levaduras del género *Cryptococcus* de excretas de palomas. Rev. Soc. Ven. Microbiol. [Online]. 2001, vol.21, n.2 [citado 2016-07-06], pp. 29-30. Disponible en: <[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562001000200008&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200008&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1315.

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  PREPARACION CALDO UREA	<b>Programa de Bacteriología y</b>  Semillero de Investigación Dolly
		<b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POEU-05	Versión: 02	

## Anexo 5. Prueba de UREA

### 1. OBJETIVO

Determinar el género *Cryptococcus sp.* y sus especies que son capaces de hidrolizar la urea, mediante la aplicación de la técnica directa utilizando como medio de cultivo el caldo urea de los aislados obtenidos tanto de muestras ambientales como clínicas.

### 2. INTRODUCCION

Al momento de hacer la identificación de diferentes géneros levaduras entre ellas *Cryptococcus sp.*, es de gran utilidad la prueba de ureasa a partir del aprovechamiento del caldo urea, en la cual vamos a ver reflejada la capacidad del microorganismo de producir la enzima ureasa, partiendo de la teoría de que esta levadura es productora por excelencia de la ureasa.

### 3 FUNDAMENTO

La urea constituye una fuente de nutrición nitrogenada utilizada por diversos microorganismos, los cuales producen una enzima (ureasa) que degrada a la misma contenida en el medio. Esta enzima ureasa cataliza la hidrólisis de la urea hasta obtener amonio y carbamato. El carbamato es hidrolizado de manera espontánea para originar ácido carbónico y una segunda molécula de amonio. Se basa en la capacidad de producir la enzima ureasa, la cual desdobra la urea en dióxido de carbono y amonio, incrementando el pH del medio y produciendo un cambio de color rojo – púrpura en el indicador rojo de fenol. La prueba se considera positiva

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  PREPARACION CALDO UREA	<b>Programa de Bacteriología y</b>  Semillero de Investigación Dolly
		<b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POEU-05	Versión: 02	

cuando se alcaliniza el medio lo que produce un cambio de color original (amarillo) a rosa o rojo.

### 3. SEGURIDAD

Se usará en todo momento las medidas de bioseguridad necesarias, tales como uso de bata desechable, guantes, tapabocas N95, lentes de protección y gorro.

Todas las muestras se considerarán un peligro biológico. Se deberá evitar el contacto directo con la piel y prestar atención adecuada a la higiene. Si hay contacto con la piel, limpie con Hipoclorito de sodio al 10%. Al terminar el procedimiento, quítese los guantes y lávese bien las manos. Nocivo por ingestión. Posibilidad de sensibilización por inhalación.

### 4. DEFINICIONES

**Amonio:** Es el producto primario del metabolismo de los aminoácidos y es sintetizado en todos los órganos. El amoníaco se presenta principalmente en su forma ionizada,  $\text{NH}_4^+$ . El nitrógeno generado en forma de amonio a partir de los aminoácidos se excreta como urea.

**Caldo urea:** Medio utilizado para la identificación de microorganismos, en base a la actividad ureásica.

**Carbamato:** Son compuestos orgánicos derivados del ácido carbámico ( $\text{NH}_2\text{COOH}$ ). Los esteres de carbamato son también llamados uretanos.

**Rojo fenol:** El rojo de fenol es un compuesto organico usado en laboratorio como indicador de pH, también se le conoce como Fenolsulfonftaleina, Sulfental, Sulfonftal o PSP.

### 5. MATERIALES Y EQUIPOS

- Incubadora
- Tubos de 10 ml tapa rosca
- Cabina de seguridad
- Mechero

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  PREPARACION CALDO UREA	<b>Programa de Bacteriología y</b>  Semillero de Investigación Dolly
		<b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POEU-05	Versión: 02	

- Bata, gorro, tapabocas
- Botella de vidrio
- Guantes de látex
- Balanza
- Papel Kraft
- Espátulas
- Agua destilada
- Autoclave

## 6. REACTIVOS

Fórmula típica en gramos por litro caldo urea deshidratado

Peptona 1.0

Glucosa 1.0

Cloruro de sodio

5.0 Fosfato

disódico 1.2

Dihidrógeno fosfato de

potasio 0,8 Rojo fenol 0,004

## 7. RESPONSABLES

Damarys Lorena Gelves

Trujillo Aymet Patricia Rubio

Cano

Gyovany Alexander Rincon Castrillon

Asbleide Karina Angarita

## 8. DURACIÓN

40 minutos

## 9. PROCEDIMIENTO

- ✓ Añadir 0,9 g de caldo urea deshidratado a 95 ml de agua destilada.
- ✓ Esterilizar en autoclave a 115 ° C durante 20 minutos.
- ✓ Enfriar a 55 ° C
- ✓ Mezclar bien y distribuir cantidades de 3 ml en recipientes estériles.
- ✓ Seguido de esto con ayuda de un asa de platino se toma una asada de

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  PREPARACION CALDO UREA	<b>Programa de Bacteriología y</b>  Semillero de Investigación Dolly
		<b>Fecha de revisión:</b> junio del 2017
Código: POEU-05	Versión: 02	

colonias sospechosas de ser *Cryptococcus sp.*, y se inoculan en el medio, con el fin de determinar si es o no esta levadura.

## CONTROL DE CALIDAD

Esterilidad: 37°C por 24 H

Aspecto: Naranja

Crecimiento: Emplear un control positivo de *Cryptococcus sp.*, el cual virara de color naranja a color fucsia y un control negativo de candida el cual no cambiara de color temperatura de 37°C. Registrar los datos en EL RCMC-04.

- REGISTROS RELACIONADOS:** Registro control de medios de Cultivos RCMC 04.

## 11. REVISIÓN PERIÓDICA

El presente documento se revisará durante la etapa de planificación de los proyectos de investigación del grupo BIOGEN que involucren el estudio de aislados ambientales y clínicos relacionados con *Cryptococcus sp.* en parques y humanos respectivamente, y se harán las correspondientes modificaciones de acuerdo a los objetivos del estudio y al kit comercial a emplear.

## 12. DOCUMENTOS Y REFERENCIAS

Oxoid Microbiology Products. Caldo Urea de Base. Sitio web:[http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0071&org=109](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0071&org=109)

Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. Utilización del caldo de urea de Stuart para el test de la ureasa, como prueba en el diagnóstico de las levaduras. Sitio web:  
[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562002000200008](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200008)

	<p align="center"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b></p> <p align="center">CONSERVACION DE CEPAS</p>	<p align="center"><b>Programa de Bacteriología y</b></p> <p align="center">Semillero de Investigación Dolly</p>
		<p align="center"><b>Fecha de revisión:</b> julio del 2016</p>
<p>Código: POECC-</p>	<p>Versión: 01</p>	

## Anexo 6. Preparación de medio CANAVANINA-GLICINA-AZUL DE BROMOTIMOL (MEDIO CGB)

### 1. OBJETIVO.

Establecer los lineamientos para la preparación de Medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (medio CGB) utilizado para el aislamiento de *Cryptococcus* sp a partir de muestras ambientales como corteza de árboles, suelo, y excretas de palomas.

### 2. FUNDAMENTO.

Esta fórmula contiene agar para la solidificación, la glicina como fuente de carbono, y fosfato de potasio, sulfato de magnesio y clorhidrato de tiamina como vitaminas y nutrientes. Sulfato de L- canavanina permite el aislamiento de *Cryptococcus*, ya que son las únicas levaduras que saben que tienen una resistencia natural. (7) se añade de bromotimol azul para indicar el cambio de pH a 7,0 cuando los medios de comunicación aparecen azul cobalto.



### 3. SEGURIDAD.

Se usará en todo momento las medidas de bioseguridad necesarias, tales como uso de bata, guantes, tapabocas, lentes de protección y gorro. Cambie los guantes cada vez que sea necesario; Al terminar el procedimiento, quítese los guantes y lávese bien las manos.

Este producto es para uso de laboratorio. Es para ser utilizado sólo por personal de laboratorio debidamente formado y cualificado. Observar las indicaciones de seguridad y utilizar técnicas asépticas. Todas las muestras de laboratorio deben

	<p align="center"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b></p> <p align="center">CONSERVACION DE CEPAS</p>	<p align="center"><b>Programa de Bacteriología y</b></p> <p align="center">Semillero de Investigación Dolly</p>
		<p align="center"><b>Fecha de revisión:</b> julio del 2016</p>
<p>Código: POECC- Versión: 01</p> <p>sér considerados infecciosos y manejados de acuerdo a "precauciones estándar".</p>		

#### 4. DEFINICIONES.

Sulfato de L-canavanina: la droga que ayuda a la tipificación de ambas variedades de cryptococcus

Azul de Bromotimol Sódico: Indicador

Fosfato de potasio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): Agente amortiguador.

Glicina como única fuente de carbono y nitrógeno

#### 5. MATERIALES Y EQUIPOS.

- Baño serológico
- Termómetro
- Probeta de 1000 ml
- Erlenmeyer 1000 ml
- Estufa
- Gasas
- Balanza
- Espátulas
- Guantes de látex
- Mechero
- Cabina de seguridad
- Cajas de Petri 20 ml
- Papel craf
- Cinta tirro
- Cepas ATCC *Cryptococcus*
- Asas desechables
- Fosforos
- Papel absorbente
- Toalla de tela
- Termometro
- Ampollas de control autoclave.

#### 6. REACTIVOS.

- Alcohol 70% en recipiente spray

	<p align="center"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b></p> <p align="center">CONSERVACION DE CEPAS</p>	<p align="center"><b>Programa de Bacteriología y</b></p> <p align="center">Semillero de Investigación Dolly</p>
		<p align="center"><b>Fecha de revisión:</b> julio del 2016</p>
<p>Código: POECC-</p>	<p>Versión: 01</p>	

- Fosfato de potasio monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

- Glicina
- sulfato de magnesio  $\text{MgSO}_4$
- tiamina-HCl
- sulfato de L-canavanina
- agua destilada
- Azul de bromotimol

## 7. RESPONSABLES

Aymet Patricia Rubio Cano  
 Damaris Lorena Gelves  
 Trujillo  
 Giovany Alexander Rincón  
 Castrillón Asbleide Karina Angarita

## 8. DURACIÓN.

1 hora.

## 9. PROCEDIMIENTO.

Medio canavanina-glicina-azul de bromotimol (medio CGB)

### 9.1 Solución A:

Glicina -----10 g

Fosfato de potasio monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  -----

----1 g Sulfato de magnesio  $\text{MgSO}_4$  -----

-----1 g Tiamina-HCl -----

-----1 mg

Sulfato de L-canavanina -----

30 mg

Agua destilada-----

100 ml

pH -----

5,6

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  CONSERVACION DE CEPAS	<b>Programa de Bacteriología y</b>  Semillero de Investigación Dolly
		<b>Fecha de revisión:</b> julio del 2016
Código: POECC-	Versión: 01	

Se esteriliza por filtración.

### 9.3 Solución B:

Azul de bromotimol -----0,4gr

Agua destilada----- 100 ml.

Para 1.000 ml del medio: solución B  
 20 ml; agua destilada -----  
 -----880 ml

agar bacteriologico----- 20 g

solución A -----100 ml.

- Se mezcla 20 ml de la solución B en un matraz de 2 litros agregar 880 de agua destilada y 20 gr el agar bacteriológico.
- Disolver al calor y esterilizar en autoclave a 121°C /5 minutos.
- Dejar enfriar a baño maria a 50°C y agregar 100ml de solución A.
- Se distribuye rápidamente 4 ml por tubo, dejando solidificar con taco y bisel.
- Almacenar en refrigeración.

### CONTROL DE CALIDAD

Esterilidad: incubar 37 °C/24 horas

Aspecto: color amarillo, aspecto opalescente

Crecimiento: *C. neoformans* var. *Neoformans* 25-27°C no crece y cuando crece no vira de color y *C. neoformans* var. *gattii* 25-27°C al cabo de cuatro días hay crecimiento y viraje del indicador de amarillo a azul cobalto.

**10. REGISTROS RELACIONADOS:** Registro control de medios de Cultivos RCMC 04.

**11. REVISIÓN PERIÓDICA.**

	<p align="center"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b></p> <p align="center">CONSERVACION DE CEPAS</p>	<p align="center"><b>Programa de Bacteriología y</b></p> <p align="center">Semillero de Investigación Dolly</p>
		<p align="center"><b>Fecha de revisión:</b> julio del 2016</p>
<p>Código: POECC- Versión: 01</p>		

El presente documento se revisará durante la etapa de planificación de los proyectos de investigación del semillero DOLLY y del grupo de investigación BIOGEN que involucren la determinación de aislados ambientales del complejo *Cryptococcus neoformans/gattii* en los parques Simón Bolívar, Antonia Santos, Colon y Nacional, y se harán las correspondientes modificaciones de acuerdo a los objetivos del estudio y al kit comercial a emplear.

## 12. DOCUMENTOS Y REFERENCIAS.

Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* (serotypes A y D) *Cryptococcus neoformans* var *gattii* (serotypes B y C). J. Clin. Microbiol. 1982; 15(3): 535-537.

Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Theodore TS. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. Sabouraudia. 1978; 16: 167-174.

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  CONSERVACION DE CEPAS	<b>Programa de Bacteriología y</b>  Semillero de Investigación Dolly
		<b>Fecha de revisión:</b> julio del 2016
Código: POECC-	Versión: 01	

## Anexo 7. Conservación de CEPAS

### 4 1-OBJETIVO:

Mantener y conservar las cepas de cryptococcus en cada una de las metodologías agua destilada, leche descremada la viabilidad y las particularidades, es necesario desarrollar técnicas óptimas que garanticen la conservación de características fisiológicas y morfológicas de cada aislamiento de cryptococcus.

### 2. INTRODUCCION

El mantenimiento y conservación de un cepario de cryptococcus es una tarea fundamental para el establecimiento de una colección que cumpla con los parámetros e implementar dos métodos de conservación agua destilada Y BHI glicerol, la finalidad de tener un protocolo de conservación de muestra la real importancia que tiene es conservar adecuadamente las muestras para su utilización posterior y su disminución de espacio en el laboratorio lo cual no tenga ninguna otra contaminación las cepas guardadas para el estudio molecular o ya sea con el propósito a procesar las muestras.

### 3. FUNDAMENTO:

Conservación por suspensión con agua destilada y congelación con BHI+glicerol 50%: Estos métodos muy utilizados y que dan altos porcentajes de viabilidad, muestran altos porcentajes de viabilidad en periodos superiores a 5 años.

### 4. SEGURIDAD

Se usará en todo momento las medidas de bioseguridad necesarias, tales como uso de bata, guantes, tapabocas, lentes de protección y gorro.

### 5. DEFINICIONES

Agua destilada: El agua destilada es aquella cuya composición se basa en la unidad de moléculas de H<sub>2</sub>O. Es aquella a la que se le han eliminado las impurezas e iones mediante destilación.

	<p align="center"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b></p> <p align="center">CONSERVACION DE CEPAS</p>	<p align="center"><b>Programa de Bacteriología y</b></p> <p align="center">Semillero de Investigación Dolly</p>
		<p align="center"><b>Fecha de revisión:</b> julio del 2016</p>
<p>Código: POECC- Versión: 01</p>		

**Déstillación:** La destilación es un método en desuso para la producción de agua pura a nivel industrial.

	<p align="center"><b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b></p> <p align="center">CONSERVACION DE CEPAS</p>	<p align="center"><b>Programa de Bacteriología y</b></p> <p align="center">Semillero de Investigación Dolly</p>
		<p align="center"><b>Fecha de revisión:</b> julio del 2016</p>
<p>Código: POECC-</p>	<p>Versión: 01</p>	

**Conidio:** Un conidio es una espora asexual inmóvil formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena

**Cepa:** es en microbiología, una variante fenotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias

**BHI:** es un medio de uso general adecuado para el cultivo de una amplia variedad de tipos de organismos, incluidos las bacterias, levaduras y hongos filamentosos, a partir de muestras clínicas.

**Glicerol:** compuesto higroscópico, lo que quiere decir que tiene la capacidad de ceder o absorber la humedad presente en el medio ambiente que lo rodea. Es fácilmente soluble en agua, y se descompone en ebullición, en la cual entra a una temperatura de 290°C. Es un compuesto líquido si se encuentra a temperatura ambiente, (a unos 25°C).

## 6. MATERIALES Y REACTIVOS

- ❖ Autoclave
- ❖ Agua destilada
- ❖ Vortex
- ❖ BHI
- ❖ Vaso precipitado
- ❖ Tubo con tapa rosca
- ❖ Glicerol
- ❖ Microviales
- ❖ Gradillas
- ❖ Tubos de ensayo
- ❖ Caja de Petri
- ❖ Asas desechables
- ❖ Micropipetas de 1000 ul
- ❖ Pipetas

## 7. RESPONSABLES

Erika Guerrero  
Martínez Eliana  
Moreno Mora Kelly  
Carrascal Quintero

	<b>PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR (POE)</b>  CONSERVACION DE CEPAS	<b>Programa de Bacteriología y</b>  Semillero de Investigación Dolly
		<b>Fecha de revisión:</b> julio del 2016
Código: POECC-	Versión: 01	

## 8. DURACION

2 Horas

## 9. PROCEDIMIENTOS:

### CONSERVACION EN AGUA DESTILADA:

- Esterilizar los tubos tapa de rosca conteniendo 2 ml de agua destilada durante 20 minutos a 121°C.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Repicar dos inoculo de dos colonias diferentes de la caja de Petri a los tubos por medio de una asada de las colonias de *Cryptococcus ssp*
- Preparar alícuotas 1 ml.
- Almacenar un vial a temperatura ambiente y uno en refrigeración (aproximadamente a 4°C). estas muestras deben ser duplicadas para mejores resultados como lo indica el estudio.

### PROCEDIMIENTO BHI+ GLICEROL al 50%

- Se debe adicionar 37 g de este caldo en 1 litro de agua destilada
- mezclar muy bien y distribuir en recipientes definitivos en este caso en una botella de 150mL con tapa rosca.
- Esterilizar en la autoclave a 121 ° C durante 15 minutos y finalmente se procede a que se enfríe a temperatura ambiente y se debe conservar a una temperatura de 4°C.
- Se realiza una siembra masiva en agar saboraud de la colonia aislada, la cual se trabajara mitad de parte para dos tubos y la otra mitad otros dos tubos los cuales cada uno va a tener 0.5ml de BHI y 0,5 ml de glicerol 50% en cada uno de los tubos se inoculara una asada tomada de la caja de Petri se hará el transpaso a los microviales dando vortex en por tres minutos donde se conservaran dos en congelación una muestras se deja para la otra y la otra como reserva.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

[http://www.gasp-lac.net/wpcontent/uploads2/SpanishFull\\_FINAL\\_VERSION-1\\_Mar-28-2012.pdf](http://www.gasp-lac.net/wpcontent/uploads2/SpanishFull_FINAL_VERSION-1_Mar-28-2012.pdf)

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602013000300009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602013000300009)

	EXTRACCION DE ADN	Programa de Bacteriología y Semillero de Investigación Dolly
		Fecha de revisión: Junio del 2017
Código: POE08-EADN	Versión: 01	

## Anexo 8. Extracción de ADN

1. **OBJETIVO:** Investigar las relaciones epidemiológicas de clínico y ambiental aísla del *Cryptococcus neoformans* el complejo de especie en Colombia.

### 2. INTRODUCCION:

Los miembros del complejo de especies de *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, son la causa de la criptococcosis, una micosis sistémica de seres humanos y animales Dentro de *C. neoformans*, se reconocen dos variedades y tres serotipos: *C. neoformans* var. Grubii (serotipo A), *C. neoformans* var. Neoformans (serotipo D) y un serotipo híbrido AD. *Cryptococcus gattii* comprende los serotipos B y C; En el medio ambiente, ambas especies se encuentran asociadas con diferentes huéspedes. La inhalación de los propágulos infecciosos (basidiospores o blastoconidios) del medio ambiente parece ser la fuente de la infección para animales y seres humanos.

### 3. FUNDAMENTO:

La criptococosis se considera una causa importante de morbilidad y mortalidad, especialmente en pacientes con un sistema inmunitario deteriorado, que afecta principalmente a los individuos positivos al virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Casadevall y Perfect, 1998). La mayoría de las infecciones en huéspedes inmunocomprometidos son causadas por *C. neoformans* var, mientras que *C. gattii* afecta principalmente a individuos inmunocompetentes (Kwon-Chung & Bennett, 1984a, Casadevall y Perfect, 1998). En Colombia, se ha reportado un aumento significativo en el número de casos de criptococosis en pacientes infectados por el VIH. *Cryptococcus gattii* es cada vez más frecuente en Colombia, siendo el serotipo B el causante de la mayoría de las infecciones criptocócicas en individuos inmunocompetentes.

	EXTRACCION DE ADN	Programa de Bacteriología y Semillero de Investigación Dolly
		Fecha de revisión: Junio del 2017
Código: POE08- EADN	Versión: 01	

## 4. SEGURIDAD

### a. PRECAUCIONES GENERALES

- i. Se usará en todo momento las medidas de bioseguridad necesarias, tales como uso de bata, guantes, tapabocas, lentes de protección y gorro.

## 5. DEFINICIONES

ADN: Es un ácido nucleico formado por nucleotidos que contiene azúcar fosfato base nitrogenada bases nitrogenadas se componen por 4 elementos adenina (a) guanina(g) □citosina (c) Timina (t).

### PCR

Reacción en Cadena de la Polimerasa Técnica de Biología Molecular que tiene por objetivo la amplificación directa de un gen (fragmento de DNA) o indirecta de un RNA, presente en mezclas de muy diversas fuentes. \* No es necesaria una purificación previa de la muestra íntegra original.

Locus: Un locus es el lugar específico del cromosoma donde está localizado un gen u otra secuencia de ADN

Alelos: un alelo resulta ser cada una de las formas alternativas que presenta un gen, que ocupa la misma posición en cada par de cromosomas homólogos, se diferencia en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

Criptococosis: es una micosis sistémica, generalmente, oportunista. Es producida por *Cryptococcus neoformans*, la mayoría de la veces, aunque también puede ser producida por *Cryptococcus gattii*.

Inmunocompetentes: Cuando el cuerpo puede producir una respuesta inmunitaria normal.

	EXTRACCION DE ADN	Programa de Bacteriología y Semillero de Investigación Dolly
		Fecha de revisión: Junio del 2017
Código: POE08-EADN	Versión: 01	

**Polimorfismo:** hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen. Es decir, un polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población.

**Amplificación:** es aumento en el número de copias de un fragmento de ADN particular. Una célula tumoral amplifica o copia segmentos de ADN en forma aberrante, como resultado de las señales celulares y en ocasiones debido a daños causados por efectos ambientales. También pueden tener su uso en medicina como técnicas de diagnóstico, reacción en cadena de la polimerasa

**Genotipo:** El genotipo resulta ser el conjunto de genes característicos de cada especie, vegetal o animal, es decir, el genotipo son los genes en formato de ADN que un animal, un vegetal o un ser humano recibe de herencia de parte de sus dos progenitores, madre y padre, y que por tanto se encuentra conformado por las dos dotaciones de cromosomas que contienen la información genética del ser en cuestión.

**Cebadores:** Es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde. Se necesita un partidor porque la mayoría de ADN polimerasas, enzimas que catalizan la replicación del ADN

**Termociclador:** Un termociclador es un aparato usado en Biología Molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para la amplificación de diversas hebras de ADN en la técnica de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) o para reacciones de secuencia con el método de Sanger

## 6. MATERIALES Y REACTIVOS

- Buffer de lisis 100 ml solución (0,5 g sodio Docedil sulfato SDS,1.,4 g NaCl,0,73 EDTA,20 ml Tris –HCl.
- 2-mercaptoetanol
- Fenol:cloroformo :alcohol isoamilico (v:v:v25:24:1)
- Isopropanol
- Etanol 70%
- Agua esteril o buffer Tris EDTA (TE)

	EXTRACCION DE ADN	Programa de Bacteriología y Semillero de Investigación Dolly
		Fecha de revisión: Junio del 2017
Código: POE08-EADN	Versión: 01	

## 7. RESPONSABLES

Aymet rubio  
 Damarys gelvez  
 Giovany rincón

## 8. DURACION

3 HORAS

## 9. PROCEDIMIENTO:

- 1- Tomar una asada del cultivo previamente sembrado durante 48 horas en agar glucosado de Saboraud o agar Extracto de levadura, peptona, dextrosa (YEPD), y transferida a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml y almacenarlo a -20°C durante 30 minutos por lo menos mejor durante la noche .
- 2-Adicionar 500ul de buffer de lisis y 5 ul de 2-mercaptoetanol. 3-agitar vigorosamente en vortex
- 4-incubar a 65°C durante 1 hora (agitar en vortex al menos 1 vez durante la incubación)
- 5-Adicionar 500 ul fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (v:v:v 25:24:1)y mezclar en vortex durante 2 minutos parahast obtener una suspension homogénea.
- 6-Centrifugar a 14000 rpm durante 15 minutos
- 7-Retirar la capa acuosa superior (sobrenadante),transferir a otro tubo de 1,5 ml y mezclar con un volumen igual de isopropanol.Precipitar el sobrenadante a -20°C durante 30 minutos por lo menos(la precipitación del ADN durante toda la noche a -20°C mejora el rendimiento de la extraccion )
- 8-centrifugar a 14.000 rpm a 4°C durante 15 minutos
- 9-descartar el sobrenadante y lavar el pellet con una solución acuosa de etanol al 70% 10-centrifugar a 14.000 rpm durante 15 minutos
- 11-descrtar e sobrenadante 12-secar el pellet
- 13-Re-suspender el ADN en 50-100 ul agua destilada esteril o buffer TE.
- 14-determinar la concentración del ADN y diluir según la concentración requerida para la PCR.

	EXTRACCION DE ADN	Programa de Bacteriología y Semillero de Investigación Dolly
		Fecha de revisión: Junio del 2017
Código: POE08- EADN	Versión: 01	

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Bogota, Colombia and 2 Molecular Mycology Research Laboratory, Center for Infectious Diseases and Microbiology at Westmead Hospital, Westmead Millennium Institute, The University of Sydney Western Clinical School, Westmead, NSW, Australia.

	EXTRACCION DE ADN	Programa de Bacteriología y Semillero de Investigación Dolly
		Fecha de revisión: Junio del 2017
Código: POE08- EADN	Versión: 01	

## Anexo 9. PCR huella digital

### 1. OBJETIVO.

Establecer los lineamientos para la realización de PCR Huella digital para el aislamiento de *Cryptococcus* sp a partir de muestras ambientales como corteza de árboles, suelo, y excretas de palomas.

### 2. FUNDAMENTO.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio común utilizada para hacer muchas copias (¡millones o miles de millones!) de una región particular de ADN. Esta región de ADN puede ser cualquier cosa que le interese al experimentador.

Por lo general, el objetivo de la PCR es producir suficiente ADN de la región blanco para que pueda analizarse o usarse de alguna otra manera. Por ejemplo, el ADN amplificado por PCR se puede secuenciar, visualizar por electroforesis en gel o clonar en un plásmido para otros experimentos.

La PCR se utiliza en muchas áreas de la biología y la medicina, como la investigación en biología molecular, el diagnóstico médico e incluso algunas ramas de la ecología.

El medio de cultivo contiene ácido cafeico contenido en el extracto de la semilla de girasol (*Guizzotia abisynica*) que permite detectar la enzima fenol oxidasa desarrollada por *Cryptococcus neoformans*. La reacción enzimática produce melanina, la cual es absorbida por la pared celular del hongo produciendo un color marrón.

El medio *Guizzotia abisynica* es usado para el aislamiento de *Cryptococcus neoformans* de substratos naturales, tales como las excretas de paloma, debido a que las colonias toman un pigmento marrón característico; sin embargo, el crecimiento excesivo de otras especies de levaduras puede impedir el crecimiento de *Cryptococcus neoformans*.

	EXTRACCION DE ADN	Programa de Bacteriología y Semillero de Investigación Dolly
		Fecha de revisión: Junio del 2017
Código: POE08- EADN	Versión: 01	

### 3. SEGURIDAD.

Se usará en todo momento las medidas de bioseguridad necesarias, tales como uso de bata, guantes de nitrilo, tapabocas, lentes de protección y gorro. Cambie los guantes cada vez que sea necesario.

Al terminar el procedimiento, quítese los guantes y lávese bien las manos.

### 4. DEFINICIONES.

PCR: técnica de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa

TERMOCICLADOR: es un aparato usado en Biología Molecular que permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para una reacción en cadena de la polimerasa de amplificación de ADN o para reacciones de secuencia con el método de Sanger.

### 5. MATERIALES Y EQUIPOS.

- Luz ultravioleta
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml
- Tubos Eppendorf de 0,25 ml
- Micropipetas P10, P20, P200
- Puntas amarillas
- Puntas azules
- Balanza
- Termociclador
- Microcentrífuga
- Papel absorbente
- Geles de agarosa
- Horno
- Erlenmeyer de 250 ml
- Vaso de precipitado de 500 ml
- Hielo
- Vortex

	EXTRACCION DE ADN	Programa de Bacteriología y Semillero de Investigación Dolly
		Fecha de revisión: Junio del 2017
Código: POE08- EADN	Versión: 01	

## 6. REACTIVOS.

- Agua desionizada esteril
- Soluciones de ADN genómico (10 ng/μl)
- Buffer de PCR 10X
- Cloruro de Magnesio MgCl<sub>2</sub> 50 mM
- dNTPs 2 mM
- Acetato de Sodio 50 mM
- Primer 10 ng/μl
- Albumina de suero bovino 2X
- Taq ADN Polimerasa 5 U/μl
- Tris/ HCL
- Gel Red
- Buffer carga

## 7. RESPONSABLES

Aymet Patricia Rubio  
Cano Damarys  
Lorena Gelves  
Trujillo  
Gyovany Alexander  
Rincón Castrillon Dra.  
Denny Cárdenas  
Dra. Karina Angarita

## 8. DURACIÓN.

2 días

## 9. PROCEDIMIENTO.

Para esta técnica se utiliza cebadores de la secuencia de núcleo minisatélite-específica del fago de tipo salvaje M13 (5'GAGGGTGGCGGTTCT3 ') y de las secuencias de microsátélites-específico (GTG) y (GACA).

	EXTRACCION DE ADN	Programa de Bacteriología y Semillero de Investigación Dolly
		Fecha de revisión: Junio del 2017
Código: POE08- EADN	Versión: 01	

Las amplificaciones se realizan en un volumen final de 50  $\mu$ l, que debe contener:

Agua desionizada esteril-----  
----- 31.5  $\mu$ l ADN-----  
----- 2.5  $\mu$ l  
PCR buffer----- 5  $\mu$ l  
Cloruro de Magnesio ( $MgCl_2$ )-----  
----- 2  $\mu$ l dNTPs-----  
----- 0.5  $\mu$ l  
Acetato de Sodio----- 3  $\mu$ l  
Primer----- 4  $\mu$ l  
Albúmina de suero bovino----- 1  $\mu$ l  
Taq ADN Polimerasa----- 0.5  $\mu$ l

- Cuando hay varias muestras de ADN para amplificar con el mismo iniciador de PCR, la forma más eficiente de realizar la PCR es preparar un “Maxter mix” de los ingredientes, que luego se pueden adicionar a cada muestra. Esto permite también que disminuyan los errores de pipeteo cuando se utilizan volúmenes muy pequeños, y se asegura de que cada reacción contiene la misma cantidad de cada componente. Siempre preparar mezcla maestra suficiente para una muestra adicional para compensar los pequeños errores de pipeteo.
- Centrifugar brevemente, para que todos los componentes bajen a la parte inferior del tubo Eppendorf. Cierre los tubos y colóquelos en el termociclador.
- La PCR se lleva a cabo en un Termociclador SimpliAmp™ utilizando las siguientes condiciones:

5 Primer Paso: 35 ciclos de:

6

- Desnaturalización: 94°C durante 20 seg
- Anillamiento: 50°C durante 1 min
- Extensión: 72 °C durante 20 seg

	EXTRACCION DE ADN	Programa de Bacteriología y Semillero de Investigación Dolly
		Fecha de revisión: Junio del 2017
Código: POE08- EADN	Versión: 01	

-

7 Segundo paso: 1 ciclo de:

8

- Ciclo de extensión final: 72°C durante 6 min

-

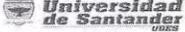
9 Tercer paso:

- Mantener a 5 °C

- Cuando se ha alcanzado el ciclo de enfriamiento, se finalizó la reacción de PCR. Este ciclo puede ser utilizado para ejecutar una reacción de PCR durante la noche y almacenar los productos de PCR a 5 °C hasta que se utilice para la electroforesis. Después de la PCR, tome los productos amplificados de PCR y almacénelos a 4 °C.
- Añadir a cada producto de PCR 1/5 de volumen de buffer carga, mezclar cada muestra muy bien.
- Los productos de amplificación se deben separar por electroforesis en geles de agarosa al 1,4% en tampón Tris-borato EDTA (TBE) 1X a 150 V durante 1,5 horas.
- Las bandas se deben visualizar bajo luz UV.
- Se debe cargar un marcador de tamaño molecular de 1 kb en tres pocillos para permitir la normalización de los geles.

Los tipos moleculares (VNI-VNIV y VGI-VGIV) se deben asignar por comparación con las cepas de referencia de los ocho tipos moleculares principales cargados en cada gel.

## Anexo 10. Formato de registro de muestras ambientales

 <b>Universidad de Santander</b> <small>UNSA</small>	REGISTRO CRECIMIENTO AGAR GIRASOL	BCAG-05 Versión: 01 Vigencia: Julio 2016 Revisión: Julio 2016
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------	------------------------------------------------------------------------

Fecha \_\_\_\_\_

Identificación muestra	Dia de lectura																															OBSERVACIONES				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31		32			
PS/Ind1/Hoja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 31/ENERO	
PS/Ind1/Cor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 31/ENERO	
PS/Ind1/Tie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 31/ENERO	
PS/Ind2/Hoja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 26/ENERO	
PS/Ind2/Cor	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 31/ENERO	
PS/Ind2/Tie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 31/ENERO	
PS/Ind3/Hoja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 26/ENERO	
PS/Ind3/Cor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 31/ENERO	
PS/Ind3/Tie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 30/ENERO	
PS/Ind4/Hoja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 26/ENERO	
PS/Ind4/Cor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 30/ENERO	
PS/Ind4/Tie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 31/ENERO	
PS/Ind5/Hoja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 26/ENERO	
PS/Ind5/Cor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 31/ENERO
PS/Ind5/Tie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 31/ENERO
PS/Ind6/Hoja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 31/ENERO
PS/Ind6/Cor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 31/ENERO
PS/Ind6/Tie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 31/ENERO
PS/Ind7/Hoja	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	DESCARTE 30/ENERO

Nota: Favor registrar con signo(+) las muestras positivas y con el signo(-) las muestras negativas.

### LECTURAS:

- |                                                |                                       |
|------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. PRIMERA LECTURA LUNES / 23 ENERO / 2017.    | 7. SEPTIMA LECTURA 1/FEBRERO/2017     |
| 2. SEGUNDA LECTURA MIERCOLES / 25 ENERO / 2017 | 8. OCTAVO LECTURA 02 / FEBRERO / 2017 |
| 3. TERCERA LECTURA JUEVES / 26 ENERO / 2017    |                                       |
| 4. CUARTA LECTURA VIERNES / 27 ENERO / 2017    |                                       |
| 5. QUINTA LECTURA SABES / 30 ENERO / 2017      |                                       |
| 6. SEXTA LECTURA MARTES 31/ENERO/2017.         |                                       |

## Anexo 11. Evidencias fotográficas

Foto 1. Recolección y Toma de Muestras.



Foto 2. Preparación de Medios de Cultivo.



Foto 3. Procesamiento de muestras en el Laboratorio.



**Foto 4. Procesamiento de PCR Huella Digital.**



**Foto 5. Observación Macroscópica de colonias *Cryptococcus* spp en Agar Girasol.**



**Foto 6. Observación Macroscópica de colonias *Cryptococcus* spp en Agar Saboraud.**



**Foto 7. Capacitación de la Doctora Patricia Escandón del Instituto Nacional de Salud para Notificación de Criptococosis.**



## Anexo 12. Actas



Avenida 4a. Esquina Calle 10 Norte  
Urbanización El Bosque  
Teléfonos. (7)5791008 - 5792742 - 5783211 - 5792747  
Fax. (7)5782977  
Cúcuta - Colombia  
Web Site: [www.udes.edu.co](http://www.udes.edu.co)

### ACTA DE SUSTENTACION DE TRABAJOS DE GRADO FACULTAD DE SALUD

El Consejo Académico en uso de sus facultades que le otorga el Acuerdo 010 del 9 de abril de 2014, determina la calificación de Trabajos de Grado así:

**Artículo cuarto:** El trabajo de grado puede desarrollarse en diferentes modalidades las cuales son:

- a. Participación en proyecto de investigación
- b. Pasantía social - comunitaria \_\_\_\_\_
- c. Práctica Empresarial \_\_\_\_\_
- d. Proyecto de emprendimiento \_\_\_\_\_

**Artículo décimo cuarto:** Los Trabajos de grado tendrán la siguiente escala de valoración según la calificación final en cualquiera de sus categorías: a. Aprobado laureado, b. Aprobado meritorio, c. Aprobado, d. Aplazado, e. Rechazado.

**APROBADO LAUREADO:** Se considera cuando éste sea un aporte de conocimiento nuevo a la ciencia y tecnología dentro de la solución de problemas de la comunidad o de la Universidad de Santander. Valoración 4.9 – 5.0

**APROBADO MERITORIO:** Se considera cuando constituya un aporte importante al área específica de la disciplina dentro de la solución de problemas de la comunidad o de la institución. Valoración 4.7 – 4.8

**APROBADO:** Se considera cuando cumpla con los objetivos que fueron planteados en él y con todos los requisitos exigidos por cada comité en su propia reglamentación según la modalidad de la que se trate. Valoración 3.5 – 4.6

**APLAZADO:** Se considera por causas fortuitas, disciplinarias, o de índole personal debidamente justificadas que sean estudiadas y aprobadas por el respectivo comité de trabajo de grado. Valoración 3.0 – 3.4

**RECHAZADO:** Se considera cuando se demuestre que el (los) estudiante (s) ha (n) incurrido en plagio en su elaboración o en faltas al Reglamento Académico y Estudiantil de la Institución o contra terceros que hayan sido parte del proyecto. Valoración 2.9 – Menor calificación.

El Comité de Trabajos de Grado por Acta No. 015 del día 23 del mes mayo de 2018, los designa Jurados Calificadores del Trabajo de Grado:

**DETERMINACIÓN DE *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* A PARTIR DE AISLADOS AMBIENTALES PROVENIENTES DE LOS PARQUES SANTANDER, MERCEDES ABREGO, JUANA RANGEL DE CUELLAR Y FUENTE DE LEONES EN EL MUNICIPIO DE SAN JOSÉ DE CÚCUTA, NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA.**

Presentado por el alumno:

Erika Yinett Guerrero Martínez  
Código: 12171007

Programa: Bacteriología y Laboratorio Clínico

Los Jurados Calificadores:

Carlos Moreno

Yesmit Karina Ríos

Confirmando la siguiente calificación:

Categoría,	Valoración,
<u>Aprobado</u>	<u>4.6</u>

OBSERVACIONES:

Realizar Copias y Anexos Exentos al documento de acuerdo a lo establecido luego de la sustentación

En San José de Cúcuta a los 7 días del mes de junio de 2018.

En Constancia firman:

Jurado



Jurado

Carlos Obando Moreno Salazar

ADMISIONES Y  
REGISTRO ACADÉMICO  
Fecha: 17 JUN 2018  
Firma:   
SE RECIBE PARA ESTUDIO  
IMPlica ACEPTACION



## ACTA DE SUSTENTACION DE TRABAJOS DE GRADO FACULTAD DE SALUD

El Consejo Académico en uso de sus facultades que le otorga el Acuerdo 010 del 9 de abril de 2014, determina la calificación de Trabajos de Grado así:

**Artículo cuarto:** El trabajo de grado puede desarrollarse en diferentes modalidades las cuales son:

- a. Participación en proyecto de investigación
- b. Pasantía social - comunitaria \_\_\_\_\_
- c. Práctica Empresarial \_\_\_\_\_
- d. Proyecto de emprendimiento \_\_\_\_\_

**Artículo décimo cuarto:** Los Trabajos de grado tendrán la siguiente escala de valoración según la calificación final en cualquiera de sus categorías: a. Aprobado laureado, b. Aprobado meritorio, c. Aprobado, d. Aplazado, e. Rechazado.

**APROBADO LAUREADO:** Se considera cuando éste sea un aporte de conocimiento nuevo a la ciencia y tecnología dentro de la solución de problemas de la comunidad o de la Universidad de Santander. Valoración 4.9 – 5.0

**APROBADO MERITORIO:** Se considera cuando constituya un aporte importante al área específica de la disciplina dentro de la solución de problemas de la comunidad o de la institución. Valoración 4.7 – 4.8

**APROBADO:** Se considera cuando cumpla con los objetivos que fueron planteados en él y con todos los requisitos exigidos por cada comité en su propia reglamentación según la modalidad de la que se trate. Valoración 3.5 – 4.6

**APLAZADO:** Se considera por causas fortuitas, disciplinarias, o de índole personal debidamente justificadas que sean estudiadas y aprobadas por el respectivo comité de trabajo de grado. Valoración 3.0 – 3.4

**RECHAZADO:** Se considera cuando se demuestre que el (los) estudiante (s) ha (n) incurrido en plagio en su elaboración o en faltas al Reglamento Académico y Estudiantil de la Institución o contra terceros que hayan sido parte del proyecto. Valoración 2.9 – Menor calificación.

El Comité de Trabajos de Grado por Acta No. 015 del día 23 del mes mayo de 2018, los designa Jurados Calificadores del Trabajo de Grado:

**DETERMINACIÓN DE *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* A PARTIR DE AISLADOS AMBIENTALES PROVENIENTES DE LOS PARQUES SANTANDER, MERCEDES ABREGO, JUANA RANGEL DE CUELLAR Y FUENTE DE LEONES EN EL MUNICIPIO DE SAN JOSÉ DE CÚCUTA, NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA.**

Presentado por el alumno:

Eliana Julieth Moreno Mora  
Código: 13172051

Programa: Bacteriología y Laboratorio Clínico

Los Jurados Calificadores:

Carlos Moreno  
Yesmit Karina Ríos

Confirmando la siguiente calificación:

<b>Categoría,</b>	<b>Valoración,</b>
<u>Aprobado</u>	<u>4.6</u>

OBSERVACIONES:

Realizar Correcciones y Ajustes Suavizados al documento de acuerdo a lo establecido legal del ICFES (Superintendencia)

En San José de Cúcuta a los 7 días del mes de junio de 2018.

En Constancia firman:

Jurado

[Firma]

Jurado

Carlos Osvaldo Moreno Salgado

ADMISIÓN Y  
REGISTRO ACADÉMICO  
Fecha: 26 JUN 2018  
Firma: [Firma]  
SE RECIBIÓ PARA ESTUDIO.  
NO HAY ACEPTACIÓN



**ACTA DE SUSTENTACION DE TRABAJOS DE GRADO  
FACULTAD DE SALUD**

El Consejo Académico en uso de sus facultades que le otorga el Acuerdo 010 del 9 de abril de 2014, determina la calificación de Trabajos de Grado así:

**Artículo cuarto:** El trabajo de grado puede desarrollarse en diferentes modalidades las cuales son:

- a. Participación en proyecto de investigación
- b. Pasantía social - comunitaria
- c. Práctica Empresarial
- d. Proyecto de emprendimiento

**Artículo décimo cuarto:** Los Trabajos de grado tendrán la siguiente escala de valoración según la calificación final en cualquiera de sus categorías: a. Aprobado laureado, b. Aprobado meritorio, c. Aprobado, d. Aplazado, e. Rechazado.

**APROBADO LAUREADO:** Se considera cuando éste sea un aporte de conocimiento nuevo a la ciencia y tecnología dentro de la solución de problemas de la comunidad o de la Universidad de Santander. Valoración 4.9 – 5.0

**APROBADO MERITORIO:** Se considera cuando constituya un aporte importante al área específica de la disciplina dentro de la solución de problemas de la comunidad o de la institución. Valoración 4.7 – 4.8

**APROBADO:** Se considera cuando cumpla con los objetivos que fueron planteados en él y con todos los requisitos exigidos por cada comité en su propia reglamentación según la modalidad de la que se trate. Valoración 3.5 – 4.6

**APLAZADO:** Se considera por causas fortuitas, disciplinarias, o de índole personal debidamente justificadas que sean estudiadas y aprobadas por el respectivo comité de trabajo de grado. Valoración 3.0 – 3.4

**RECHAZADO:** Se considera cuando se demuestre que el (los) estudiante (s) ha (n) incurrido en plagio en su elaboración o en faltas al Reglamento Académico y Estudiantil de la Institución o contra terceros que hayan sido parte del proyecto. Valoración 2.9 – Menor calificación.

El Comité de Trabajos de Grado por Acta No. 015 del día 23 del mes mayo de 2018, los designa Jurados Calificadores del Trabajo de Grado:

**DETERMINACIÓN DE *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* A PARTIR DE AISLADOS AMBIENTALES PROVENIENTES DE LOS PARQUES SANTANDER, MERCEDES ABREGO, JUANA RANGEL DE CUELLAR Y FUENTE DE LEONES EN EL MUNICIPIO DE SAN JOSÉ DE CÚCUTA, NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA.**

Presentado por el alumno:

Kelly Jhoana Carrascal Quintero  
Código: 13172037

Programa: Bacteriología y Laboratorio Clínico

Los Jurados Calificadores:

Carlos Moreno  
Yesmit Karina Ríos

Confirmando la siguiente calificación:

<b>Categoría,</b>	<b>Valoración,</b>
<u>Aprobado</u>	<u>4.6</u>

OBSERVACIONES:

Realizar correcciones y ajustes sugeridos al documento de acuerdo a lo establecido luego de la sustentación

En San José de Cúcuta a los 7 días del mes de junio de 2018.

En Constancia firman:

Jurado 

Jurado Carlos Osorio Moreno Salgado

ADMISIONES Y  
REGISTRO ACADÉMICO  
Fecha: 20 JUN 2018  
Firma:   
SE RECIBE POR  
LO IMPLICADO