



**Universidad De Oriente
Escuela De Ciencias De La Salud
"Dr. Francisco Batistini Casalta"
Departamento De Parasitología Y Microbiología**

**AISLAMIENTO DE *Cryptococcus* spp EN MUESTRAS
AMBIENTALES DE LOS ESTADOS BOLÍVAR Y ANZOÁTEGUI.**

Profesora Asesora:
Dra. Julman Cermeño

Tesis de Grado presentada por:

Br. Jean Félix Piñerúa Gonsálvez

Br. Rosanna del Carmen Zambrano Infantino

Como requisito parcial para optar al título de Médico
Cirujano.

Ciudad Bolívar, Febrero 2010.



DEDICATORIA

Dedicamos esta tesis, a nuestros profesores, quienes a lo largo de nuestra formación como profesionales de la medicina fueron un pilar fundamental, convirtiéndonos en médicos más humanos, defensores incansables de los valores éticos que rigen esta memorable profesión.

A nuestra Escuela de Ciencias De la Salud “Francisco Battistini Casalta”, que nos abrigó durante todos estos años de estudio, inculcándonos valores cívicos, éticos y morales, en pro del bienestar de nuestros pacientes.

A nuestras Familias por brindarnos apoyo incondicional, encaminado a la culminación de nuestras carreras.



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis que es el resultado de un gran esfuerzo emocional y material, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación mencionaremos y muchas de las cuales han sido un pilar importante para superar los obstáculos que se suscitaron.

Ante todo, damos gracias a Dios todo Poderoso, nuestro Protector celestial, quien se mantuvo como una estrella brillante, iluminando nuestro camino a lo largo de la realización de este proyecto, siendo escudo frente a las adversidades que se nos presentaron.

A nuestra tutora, Dra. Julman Cermeño, por su asesoramiento científico, disposición permanente e incondicional en aclarar nuestras dudas y por sus substanciales sugerencias durante la redacción de la Tesis, convirtiéndose en un estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

A nuestros Padres, Jesús Zambrano, Carmen Infantino de Zambrano, Marisa Gonsalvez de Medina y Jesús Medina, por su incondicional apoyo moral, emocional y material, por inculcarnos valores de familiaridad, humildad, bondad y amor, convirtiéndonos en personas de bien.

A nuestros Abuelos, Rosa Tedesco de Infantino, José Gonsalvez y Julia De Oliveira de Gonsalvez, por todas sus atenciones, dedicación y el profundo amor y protección que nos siguen brindando día a día.

A nuestros Hermanos, Maryanna y Jesús Antonio (Junior) Zambrano, Dinito y Mauricio Gonsalvez, amigos del alma, por hacer que la tristeza se transforme en alegría, sacando siempre con sus ocurrencias la mejor sonrisa. Los queremos.

A nuestras Familias, Tíos Dora Infantino, Dino Gonsalvez y Patricia de Gonsalvez, personas que desde el primer momento nos han brindado todo el apoyo, colaboración y cariño, en la realización de nuestros sueños.

A nuestros amigos Carelis González y Manuel Berdayes por su apoyo y colaboración en la realización de este trabajo.

Al personal, docente, administrativo, técnico y obrero, en especial a los señores José Gregorio Álvarez, Carmerlo Luces, Maribel de Mota, Carmen Meneses y Emilio Maitan del departamento de Parasitología y Microbiología de la Escuela de Ciencias De la Salud “Francisco Battistini”, por su disposición permanente a colaborar en la realización de esta investigación.



Al personal de PROFORCA y CVG, por su colaboración, la cual fue fundamental para la realización de este trabajo.



INDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE	v
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVOS	10
Objetivo general.....	10
Objetivos Específicos.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Diseño del Estudio.....	11
Muestra.....	11
Metodología.....	11
Análisis Estadísticos.....	13
RESULTADOS	14
Tabla 1.....	15
Tabla 2.....	16
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	21
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22



RESUMEN

AISLAMIENTO DE *Cryptococcus* spp EN MUESTRAS AMBIENTALES DEL ESTADO BOLÍVAR Y ANZOÁTEGUI.

Autores: Br. Jean F. Piñerúa G. Br. Rosanna del C. Zambrano I.

Tutora: Dra. Julman Cermeño

El género *Cryptococcus* incluye muchas especies, de las cuales *Cryptococcus neoformans* se considera frecuentemente patógeno humano. *Cryptococcus neoformans* agente etiológico de la criptococosis, es una levadura encapsulada. Actualmente son reconocidas dos especies del Complejo *neoformans*: *Cryptococcus gattii* y *Cryptococcus neoformans*. El objetivo del presente estudio fue identificar las especies de *Cryptococcus* aisladas de medios naturales del estado Bolívar y estado Anzoátegui (Venezuela). Se realizó un estudio prospectivo y descriptivo. Se recolectaron 576 muestras procedentes de 300 árboles de *Eucalyptus camaldulensis*; presentes en las plantaciones de PROFORCA Los Hachos, PROFORCA Coloradito y plantaciones de Maripa, además 20 muestras aéreas de dichas plantaciones y 50 muestras de excretas de aves (pollos y gallinas) de algunas ventas de aves de corral de Ciudad Bolívar. Cada una de las muestras fueron sembradas en agar Sabouraud dextrosa cloranfenicol, agar *Guizotia abyssinica*-creatinina y agar *Helianthus annuus* por duplicado. Los hongos filamentosos se observaron al microscopio bajo la forma de numerosos filamentos o hifas las cuales pueden presentar septos, a menudo ramificados o sin septos. La identificación de hongos filamentosos se realizó mediante las técnicas estándar de laboratorio aplicando criterios macroscópicos, microscópicos, características fisiológicas y bioquímicas. Las levaduras se observaron al examen microscópico directo como blastosporas. Se aislaron todas las cepas que presentaron características morfológicas compatibles con *C. neoformans* sometiénolas posteriormente a las pruebas de identificación y biotipificación: prueba de la ureasa, producción de pigmentos en agar *Guizotia abyssinica* y agar *Helianthus annuus*, crecimiento a 37°C, ausencia de nitrato-reductasa, estudio de asimilación de azúcares mediante el sistema de Api 20 C (Biomérieux®), test de resistencia a la actidiona y producción de fenoloxidasas. Los aislamientos identificados como *C. neoformans* fueron sembrados en medio con L-canavanina glicina azul de bromotimol (SIGMA®) para el estudio de especies. Se realizó estadística descriptiva. Los hongos aislados más frecuentemente en las muestras de tejido vegetal correspondían a los géneros *Aspergillus* en 75% (n=432), *Mucor* 9,5% (n=55) y *Penicilium* en 3,3% (n=19). El género *Cryptococcus* fue aislado en el 0,3% (n=2) de estas muestras. Las cepas de *Cryptococcus* fueron aisladas en un árbol de la plantación de eucalipto de PROFORCA Los Hachos y en un árbol de la plantación de Maripa. Se aisló *Cryptococcus* en el 2% (n=1) de las muestras de excretas de pollos y gallinas procedentes de aves de corral de Ciudad Bolívar. Las cepas aisladas de



Cryptococcus pertenecían a la especie *C. neoformans*. En el presente estudio *Cryptococcus neoformans* fue aislado en fuentes ambientales de los estados Bolívar y Anzoátegui lo cual demuestra la distribución ambiental de dicho patógeno, y contribuye al conocimiento epidemiológico de este hongo.

Palabras claves: *Cryptococcus neoformans*, *Eucalyptus camaldulensis*, criptococosis.



INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Cryptococcus* generalmente son considerados como levaduras no fermentadoras, asimilan inositol y producen ureasa (Barnet *et al.*, 1990). El género *Cryptococcus* pertenece al reino Fungi, Phylum Basidiomycota, Orden Cryptococcales, Familia Cryptococcaceae (Arenas, 2003). La clasificación de las levaduras se basa, en general, en características de la reproducción sexual y asexual. Se clasifican en *Ascomycetes* formadoras de ascosporas, *Basidiomycetes*, que se caracterizan por la presencia de Basidiosporas y en *Deuteromycetes* (mitospórico) u hongos imperfectos, en los que no se conoce reproducción sexuada. En este grupo también se incluye la fase anamorfa de la reproducción asexual. Se han descrito dos estados perfectos o telemórfico en *C. neoformans* y se les ha denominado *Filobasidiella neoformans* para los serotipos A y D y *Filobasidiella bacillispora* para los serotipos B y C (Kwon-Chung *et al.*, 1981).

El género *Cryptococcus* incluye alrededor de 37 especies. Dentro de los cuales *C. neoformans* es el agente etiológico predominante de la criptococosis, sin embargo, existen referencias en la literatura de otras especies como *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Cryptococcus adeliensis* y *Cryptococcus albidus* que han producido enfermedad en humanos, especialmente en los inmunodeprimidos (Baró *et al.*, 1999; Vázquez *et al.*, 2005; Tintelnot y Losert, 2005; Shankar *et al.*, 2006; Rosario *et al.*, 2008).

C. neoformans, agente etiológico de la criptococosis, es una levadura redonda u oval (3,5-8 μm), que se reproduce por gemación única, con un cuello estrecho entre la célula madre y la hija. Excepcionalmente, se observa gemación múltiple, formas alargadas y pseudohifas. Poseen una cápsula de naturaleza polisacaroídea que le confiere virulencia, protegiendo al hongo de la fagocitosis, y cuyo tamaño varía



dependiendo de la cepa y del medio de cultivo que se utilice para aislar la levadura. Se puede observar por examen en fresco con tinta china, tinción negativa, que tiñe toda la preparación excepto la cápsula (Martin y Valdeverde, 1999). La cápsula polisacárida no se tiñe con los colorantes habituales como el Gram, Giemsa ni otros más específicos para hongos como PAS o Gomori. Se ve por contraste negativo como un espacio claro alrededor de la célula. El uso más frecuente para su visualización es por el método de la tinta china que confiere un contraste oscuro sobre el que se destaca la célula con su cápsula. A veces también ayuda la tinción específica con mucicarmín (Baró, 2002).

C. neoformans crece muy bien en todos los medios de cultivo formando colonias mucosas, aunque con el tiempo pueden aparecer secas; el color es variable (crema, ocre, rosa, amarillo), virando a tonos más oscuros con la edad. Las cepas que poseen una cápsula pequeña, forman colonias similares a las del género *Candida*. Tienen metabolismo aerobio, por lo que no son fermentadoras, producen ureasa y utilizan varios hidratos de carbono. Las distintas especies de *Cryptococcus* se diferencian entre sí por una serie de características: crecimiento a 37° C, asimilación de la sacarosa, lactosa, galactosa, melobiosa, celobiosa, rafinosa, trealosa y dulcitol, utilización de KNO₃, producción de ureasa y fenil-oxidasa (Martin y Valdeverde, 1999).

En la fase anamorfa, se ha separado a *C. neoformans* en cuatro serotipos: *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D) y *C. neoformans* var. *gattii* (serotipo B y C) (Franzot *et al.*, 1999). La clasificación del serotipo es hecha en base a suero de conejo y refleja las diferencias antigénicas en el polisacárido capsular principal, glucuronoxilmananos. Esta clasificación ha sido utilizada por diversos autores. Este enfoque en la clasificación ha creado confusión en la nomenclatura de *C. neoformans* debido a que el serotipo se basa en la propiedad antigénica de la cepa que no es siempre estable, esto se ha observado en cepas



diploides que han sido serotipadas como A y D. Un ejemplo es la cepa de *C. neoformans* CBS 132T, que originalmente fue serotipada como D (Boekhout *et al.*, 2001), pero simultáneamente fue identificada como serotipo A por Lengeler *et al.* en el año 2001 (Kyung *et al.*, 2006). En una reciente revisión filogenética, diferentes genes (URA5, CNLAC1, CAP59, CAP64, IGS e ITS rRNA, mtLrRNA) de *Cryptococcus neoformans* var *gattii* y de *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* fueron analizados, demostrándose que independientemente del marcador utilizado, la especie *gattii* es un grupo monofilético diferente de la especie *neoformans*. Por lo tanto, actualmente son reconocidas dos especies del complejo *Cryptococcus neoformans*: *Cryptococcus gattii* (serotipos B y C) y *Cryptococcus neoformans* (serotipos A y D) (Grupo de Consenso de Criptococose, 2008).

Los polisacáridos capsulares de *C. gattii* son más complejos que los de *C. neoformans*. Las dos especies asimilan creatinina pero difieren en la regulación del metabolismo de la misma. El ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA) inhibe a la ureasa en *C. gattii* pero no en *C. neoformans*. Las dos variedades también manifiestan diferencias en la susceptibilidad a los agentes antifúngicos (Casadevall y Perfect, 1998).

Existen diferencias entre las especies *neoformans* y *gattii*, tanto desde el punto de vista patológico como de distribución geográfica, de tal forma que *C. neoformans* se encuentra en todo el mundo, es la especie aislada a partir del excremento de aves y representa la mayoría de los aislamientos a partir de pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (el serotipo más frecuentemente aislado en estos pacientes es el A). *C. gattii* se encuentra en climas tropicales y subtropicales, sin embargo, en los últimos 10 años el serotipo B ha sido una importante causa de criptococosis en personas sanas y animales en la Isla de Vancouver, Canadá. Más recientemente, esta epidemia se ha extendido al Noroeste de los Estados Unidos. Los brotes parecen haber descendido del acoplamiento de dos padres de tipo alfa. La



reproducción sexual permitió la extensión a un nuevo lugar geográfico y contribuyó a la producción de esporas infecciosas (Jane y Fries, 2008).

C. gattii se asocia a diferentes especies de árboles, entre ellos los de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus tereticornis*), *Cassia grandis*, *Senna multijuga*, *Ficus microcarpa*, *Terminalia catappa* y *Moquilea tomentosa*, y raramente causa infecciones diseminadas en pacientes con SIDA incluso en áreas endémicas (Rozemberbaum *et al.*, 1992). También se diferencian estas variedades por sus características bioquímicas: los tipos B y C, asimilan los ácidos l-málico, fumárico y succínico, producen pigmento sobre agar niger, de color verde, y sobre agar con L-canavanina-glicina-azul de bromotimol, y asimilan la glicina como única fuente de carbono. Los serotipos A y D, por el contrario, no presentan estas reacciones. Existen también diferencias genéticas por hibridación del ADN (Martin y Valdeverde, 1999).

La infección por *Cryptococcus* sp se adquiere por inhalación de las levaduras desecadas ($< 3 \mu\text{m}$) existentes en la naturaleza (Martin y Valdeverde, 1999). La patogenicidad está determinada por la cápsula que impide la fagocitosis por la activación del sistema del complemento y por la enzima fenil-oxidasa que contribuye al neurotropismo del hongo. La presencia *Cryptococcus* en los alvéolos pulmonares desencadena una respuesta de la inmunidad celular y humoral del huésped, que en condiciones normales es suficiente para controlar la infección. La resistencia a la infección depende principalmente de la activación de los macrófagos y los neutrófilos por los linfocitos sensibilizados; además es necesaria una buena respuesta humoral con participación de anticuerpos opsonizantes de la clase IgG e IgM. La infección se resuelve por sí sola en el 90% de los casos. Los pacientes más susceptibles a la infección por *Cryptococcus* tienen alteraciones de la inmunidad celular o humoral, razón por la que el microorganismo no es eliminado por los mecanismos de defensa apropiados cuando penetra en las vías respiratorias; de tal manera que la infección progresa, invade el pulmón, se disemina por vía hematógena y llega al Sistema



Nervioso Central (SNC). No se conoce bien el por qué del tropismo. Para explicar este fenómeno se han planteado las siguientes hipótesis: a) El Líquido Cefalorraquídeo (LCR) facilita el crecimiento del hongo, ya que carece de los efectos inhibidores que tiene la sangre. b) El alto nivel de dopamina en el SNC puede promover la virulencia del hongo pues sirve como sustrato para la producción de melanina por el microorganismo. c) La producción local de manitol por el hongo puede contribuir al edema cerebral e inhibir la fagocitosis.

La respuesta inflamatoria cerebral es de magnitud variable pero de menor intensidad a la que ocurre en la meningitis bacteriana. En el infiltrado inflamatorio predominan los mononucleares, mientras que los polimorfonucleares son escasos. Las alteraciones patológicas son las de una meningitis granulomatosa. Pueden formarse granulomas pequeños y quistes en la corteza cerebral; ocasionalmente los granulomas y los nódulos quísticos son de gran tamaño. Los quistes están constituidos por un material gelatinoso con gran número de levaduras encapsuladas en su interior. También pueden aparecer nódulos sólidos formados por fibroblastos, células gigantes, agregados de levaduras y zonas de necrosis (Vázquez *et al.*, 2005).

En el hombre la vía de entrada inhalatoria de la levadura ocasiona una primoinfección pulmonar. La criptococosis pulmonar no presenta signos y síntomas diagnósticos específicos. En la mayoría de los casos suele ser asintomática. Se suele presentar fiebre, tos, disnea, dolor pleurítico y pérdida de peso (Baró, 2002). La infección del SNC es la complicación más grave de la criptococosis. Se presenta usualmente como meningitis o meningoencefalitis subaguda o crónica; en ocasiones con lesiones granulomatosas (criptococoma) o pseudoquistes intraparenquimatosos. La meningitis se presenta en el 97% de los casos; la meningoencefalitis en el 2% y los criptococomas en el 1%. Las manifestaciones clínicas de la criptococosis del SNC difieren entre los pacientes con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y los que no lo tienen. Los pacientes sin SIDA generalmente tienen sintomatología crónica,



incluso varios meses antes de que se realice el diagnóstico. En el 70 a 90% de los pacientes, la criptococosis se presenta como una meningitis subaguda o una meningoencefalitis. El paciente puede sufrir cefalea de predominio frontal, temporal o retroocular; puede ser pulsátil y acompañarse de visión borrosa; fiebre intermitente de 38°C acompañada de escalofrío y sudación que dura el mismo tiempo que la cefalea; síndrome de hipertensión intracraneana con cefalea, papiledema, diplopía, náuseas y vómitos. También puede haber alteraciones de la conciencia como alucinaciones, desorientación, irritabilidad, pérdida de la memoria y convulsiones (Vázquez *et al.*, 2005).

Esta descrito la diferencia en la presentación clínica de la criptococosis causada por *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. Un estudio reciente realizado en Australia demostró una alta mortalidad por infecciones causadas por *Cryptococcus neoformans*. En contraste las infecciones causadas por *Cryptococcus gattii* presentan una baja mortalidad pero frecuentemente se complican con secuelas neurológicas que requieren cirugía y tratamiento prolongado (Casadevall y Perfect, 1998).

Cryptococcus neoformans es un hongo cosmopolita, los casos de criptococosis han sido señalados en todas las regiones del mundo. El hongo es un organismo de vida libre que puede sobrevivir en una variedad de nichos ambientales. La naturaleza saprófita de *C. neoformans* ha sido conocida desde 1894 cuando Sanfelice lo cultiva a partir del jugo de durazno (Pidcoe y Kaufman, 1968). *C. neoformans* raramente es aislado en individuos sanos y no parece ser un comensal humano común (Ikeda *et al.*, 1982). La naturaleza esporádica de la criptococosis humana, la poca documentación de eventos de transmisión humano-humano, y la alta prevalencia de *C. neoformans* en el ambiente indican que la infección humana es adquirida a partir de fuentes ambientales. Por lo tanto, el conocimiento de la ecología de este y su ciclo de vida es importante para la comprensión de la infección humana (Casadevall y Perfect, 1998).



El hábitat de *C. gattii* fue descrito por primera vez en Australia por Ellis y Pfeiffer quienes lograron aislar e identificar esta levadura a partir de muestras de hojas, madera corteza y restos vegetales colectados de la copa del árbol *Eucalyptus camaldulensis*; y lo realizaron en una zona con alta incidencia de criptococosis, en una población aborígen del territorio norte de su país. Posteriormente, los mismos autores lograron aislar *C. gattii* a partir de la corteza y restos de madera de *E. tereticornis* especie muy cercana a *E. camaldulensis*. Un hallazgo similar lo realizaron Gezuele *et al.*, en Uruguay a partir de un trozo deshabitado de un colmenar de la avispa (*Polybia occidentalis*), y otro aislamiento en Brasil por Lazara *et al.*, en guano de murciélago (Argüero *et al.*, 1996).

Estudios realizados sobre diferencias epidemiológicas entre los serotipos y entre las especies de *Cryptococcus* indican que *C. gattii* es un agente infeccioso poco frecuente que prevalece en climas tropicales y subtropicales únicamente el serotipo B fue 4,5 veces más frecuente que el C (Bennett *et al.*, 1977).

La asociación de *C. neoformans* con el excremento de aves, particularmente excremento de paloma se conoce desde 1950 y ha sido confirmada repetidamente por un gran número de investigadores (Emmons, 1955; Littman y Schneierson, 1959; Bergman, 1963; Denton y Di Salvo, 1968; Ansheng *et al.*, 1993; Castanon y Lopez, 1994). *C. neoformans* puede crecer a densidades de 30 a 60 millones de organismos por ml de excremento de paloma fresco o desecado. El excremento de paloma permite la supervivencia a largo plazo de *C. neoformans*, y cultivos han demostrado que el hongo permanece viable por casi dos años cuando se mantiene en excremento desecado de paloma (Casadevall y Perfect, 1998).

En Venezuela los casos de criptococosis han sido descritos en diferentes regiones, destacándose distrito federal, los estados Táchira, Zulia, Monagas, Miranda y Bolívar como regiones endémicas (Villanueva *et al.*, 1987; Caballera, 1998).



En Venezuela los serotipos existentes son el A, B y D con un predominio del serotipo A (63%) sobre el B (29%) y D (3,7%) (Villanueva *et al.*, 1989).

En particular, en el estado Bolívar sólo existe un estudio epidemiológico sobre aislamiento de *Cryptococcus* en excretas de paloma (Cermeño *et al.*, 2006) pero no existen estudios previos sobre aislamiento y serotipificación de *Cryptococcus* en plantaciones de *Eucaliptus* y excretas de aves de corral en los estados Bolívar y Anzoátegui. Debido a esto, se plantea el presente estudio con la finalidad de conocer mejor algunos aspectos epidemiológicos de dicha levadura en ambas regiones.



JUSTIFICACIÓN

Esta descrito que la fuente principal de infección y hábitat natural de *C. neoformans* es el excremento de aves, mientras que el hábitat natural de *C. gattii* son las hojas, madera y corteza de *Eucalyptus camaldulensis* (Argüero *et al.*,1996).

Los estados Bolívar y Anzoátegui se encuentran en una región tropical. Las condiciones de humedad, temperatura, la presencia de plantaciones de Eucaliptos, excremento de aves en las plazas públicas y la venta de aves de corral es un hallazgo frecuente en el medio urbano, las cuales constituyen las condiciones apropiadas para el posible crecimiento de *Cryptococcus neoformans*.

Esta investigación está destinada a determinar la presencia de especies de *Cryptococcus* en arboles de Eucalipto y en el ambiente de los estados Bolívar y Anzoátegui y en excretas de aves de corral de Ciudad Bolívar, con la finalidad de contribuir al conocimiento epidemiológico de la infección por *Cryptococcus* spp en estos estados.



OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la presencia de *Cryptococcus* spp en medios naturales del estado Bolívar y estado Anzoátegui (Venezuela).

Objetivos Específicos

- Identificar *Cryptococcus* spp de tejidos vegetales de *Eucalyptus* spp en las plantaciones de los estados Bolívar (Plantaciones de eucalipto de Maripa CVG) y Anzoátegui (PROFORCA Los Hachos y PROFORCA Coloradito).
- Determinar la presencia de *Cryptococcus* spp en muestras aéreas de las plantaciones de *Eucalyptus* en los estados Bolívar (Plantaciones de eucalipto de Maripa CVG) y Anzoátegui (PROFORCA Los Hachos y PROFORCA Coloradito).
- Detectar la presencia de *Cryptococcus* spp en excretas de aves (pollos y gallinas) de centros de venta de aves vivas de Ciudad Bolívar.
- Identificar las diferentes especies de *Cryptococcus* mediante diferentes medios bioquímicos y selectivos.



MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

Se realizó un estudio prospectivo y descriptivo.

Muestra

Se seleccionaron al azar 300 árboles de *Eucalyptus camaldulensis* presentes en las plantaciones de PROFORCA Los Hachos (latitud: 8°29'58.49"N, longitud: 63°23'0.03"O), PROFORCA Coloradito (latitud: 8°45'12.10"N, longitud: 63°27'2.51"O) y Plantaciones de Maripa (GVG) (latitud: 7°23'33.04"N, longitud: 65° 8'48.67"O), 20 muestras aéreas de dichas plantaciones y 50 muestras de excretas de aves (pollos y gallinas) de algunas ventas de aves de corral de Ciudad Bolívar.

Para la investigación de *Cryptococcus* spp se tomaron muestras de la corteza, hojas y flores (si las hubiese en el momento de la recolección de las muestras). Se seleccionaron aquellas muestras que se encontraban en estado de descomposición. Las muestras vegetales se fragmentaron y tinturaron, de igual manera que las excretas de las aves. Las muestras se recolectaron en bolsas plásticas, se rotularon y fueron transportadas al laboratorio de Parasitología y Microbiología de la Escuela de Ciencias de la Salud "Francisco Battistini" para su procesamiento.

Metodología

Las muestras recogidas fueron separadas en dos porciones, una de ellas fue resuspendida en solución salina fisiológica con cloranfenicol y se agitó. Las muestras fueron homogeneizadas agitándolas vigorosamente durante 15 minutos, luego, se las dejó reposar durante 30 minutos. A partir del sobrenadante se tomaron 100



microlitros (μl) y se inocularon sobre Agar Sabouraud Dextrosa Cloranfenicol (SDA) (Himedia®), Agar *Guizotia abyssinica*-creatinina (AGA) y Agar semillas de girasol (*Helianthus annuus*) por duplicado.

La otra porción de la muestra se inoculó extendiendo la muestra directamente en la superficie de los medios de cultivo SDA, AGA y agar semillas de girasol. Se incubaron a 35°C durante 48-72 horas.

Para coleccionar muestras aéreas se expusieron las placas de Petri, con Sabouraud dextrosa cloranfenicol y *Guizotia abyssinica*-creatinina, abiertas al aire libre por espacio de diez minutos (método de Koch) (Curo *et al.*, 2005). Las placas de Petri expuestas al ambiente fueron incubadas a 35°C y observadas diariamente hasta evidenciar crecimiento fúngico, hasta por cuatro semanas.

La observación microscópica directa de las colonias se realizó con un condensador de contraste de fases (OLYMPUS®). La observación se realizó primero a pequeño aumento, usando un objetivo de 10X, para buscar los elementos fúngicos, y después se pasó a mayor aumento (con un objetivo de 25 a 40x) para confirmar la naturaleza micótica de los elementos visualizados y estudiar la morfología.

Los hongos filamentosos se observaron bajo la forma de numerosos filamentos o hifas las cuales pueden presentar septos, a menudo ramificado o sin septos. Las levaduras se observaron al examen microscópico directo como blastosporas.

La identificación de los hongos aislados se realizó mediante las técnicas estándar de laboratorio aplicando los siguientes criterios para todos los agentes: estructuras observadas en el examen directo, características macroscópicas y microscópicas de la colonia obtenida, determinación de las características fisiológicas



y bioquímicas. Las colonias que no esporularon luego de cuatro semanas de incubación fueron consideradas como *Mycelia sterilia* (Calvo *et al.*, 1980; Pitt y Hocking, 1997).

Las colonias sospechosas de levaduras se estudiaron observando en primer lugar, su morfología microscópica utilizando tinciones de azul de lactofenol y tinta china. Se aislaron todas las cepas que presentaron características morfológicas compatibles con *Cryptococcus* sp sometiéndolas posteriormente a las pruebas de identificación y biotipificación: prueba de la ureasa, producción de pigmentos en agar de semillas de alpiste (*Guizotia abyssinica*) y de girasol (*Helianthus annuus*), crecimiento a 37°C, ausencia de nitrato-reductasa, estudio de asimilación de azúcares mediante el sistema de Api 20 C (Biomérieux®), test de resistencia a la actidiona y producción de fenoloxidasas. Con los resultados que se obtuvieron se adjudicó un biotipo representado en el código correspondiente al sistema comercial Api 20 C. Los aislamientos identificados como *C. neoformans* fueron sembrados en medio con L-canavanina glicina azul de bromotimol (CGB) (Sigma®) para el estudio de especies (Bennet *et al.*, 1977; Casadevall y Perfect, 1998; Grupo de Consenso de Criptococose, 2008). Las cepas que modificaron el color inicial del medio CGB de amarillo verdoso hacia un color azul cobalto fueron identificadas como *C. gattii*, si el medio permanece sin cambio de color las cepas son identificadas como *C. neoformans* (Kwon-Chung *et al.*, 1981).

Análisis Estadísticos

Empleando el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) para Windows versión 15 se realizó estadística descriptiva.



RESULTADOS

Se recolectaron 576 muestras vegetales procedentes de 300 árboles de *Eucalyptus camaldulensis* pertenecientes a las plantaciones de PROFORCA Los Hachos (n=103), PROFORCA Coloradito (n=47) y las plantaciones de Maripa (n=150). Los hongos aislados más frecuentemente en estas muestras correspondían a los géneros *Aspergillus* en 75% (n=432), *Mucor* 9,5% (n=55) y *Penicilium* en 3,3% (n=19). El género *Cryptococcus* fue aislado en el 0,3% (n=2) de las muestras analizadas (Tabla 1). Las cepas de *Cryptococcus* fueron aisladas en un árbol de la plantación de eucalipto de PROFORCA Los Hachos y en un árbol de la plantación de Maripa. Ambas cepas fueron aisladas a partir de hojas de los árboles de eucalipto. Estas cepas fueron identificadas como *Cryptococcus neoformans*.

Se recolectaron un total de 20 muestras aéreas de las cuales la mitad fueron tomadas en la plantación de PROFORCA Coloradito y la otra mitad en las plantaciones de Maripa. Los hongos aislados fueron *Aspergillus* en 95% (n=19) y *Mucor* en 5% (n=1).

Se recolectaron un total de 50 muestras de excretas de pollos y gallinas procedentes de algunas ventas de aves de corral de Ciudad Bolívar. Los hongos aislados en estas muestras pertenecían al género *Aspergillus* en un 72% (n=36), *Mucor* en 8% (n=4) y *Cryptococcus* en 2% (n=1) (Tabla 2). La cepa de *Cryptococcus* aislada fue identificada como *C. neoformans*.

**Tabla 1****Hongos filamentosos y levaduriformes aislados en plantaciones de *Eucalyptus camaldulensis* de los estados Anzoátegui y Bolívar.**

Hongo	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
<i>Aspergillus</i> sp	432	75,0
<i>Mucor</i> sp	55	9,5
<i>Penicilium</i> sp	19	3,3
<i>Madurella</i> sp	13	2,3
<i>Fonsecae</i> sp	10	1,7
<i>Cladophialophora</i> sp	7	1,2
<i>Acremonium</i> sp	7	1,2
<i>Curvularia</i> sp	6	1,0
<i>Trichoderma</i> sp	4	0,7
<i>Exophiala</i> sp	3	0,5
<i>Scopulariopsis</i> sp	3	0,5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	0,3
<i>Pacelomyces</i> sp	1	0,2
<i>Trichophyton</i> sp	1	0,2
<i>Rhizopus</i> sp	1	0,2
<i>Mycelia sterilia</i>	2	0,3
Negativo	10	1,7
Total	576	100,0



Tabla 2

Hongos filamentosos y levaduriformes aislados en excretas de pollos y gallinas de Ciudad Bolívar

Hongo	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Filamentosos		
<i>Aspergillus</i> sp	36	72,0
<i>Mucor</i> sp	4	8,0
<i>Cladophialophora</i> sp	2	4,0
<i>Trichosporon asahii</i>	2	4,0
Levaduras		
<i>Candida guilliermondii</i>	3	6,0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	2,0
<i>Candida famata</i>	1	2,0
<i>Candida albicans</i>	1	2,0
Total	50	100,0



DISCUSIÓN

La importancia mundial de infecciones micóticas ha aumentado significativamente desde la década de los 80, debido al incremento de pacientes inmunosuprimidos, en particular aquellos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana. Por consiguiente, se hace cada vez más importante el entendimiento de la epidemiología, el modo de reproducción, y los rasgos patógenos de estos organismos, para la prevención de infecciones fúngicas así como para el desarrollo de tratamientos antifúngicos y vacunas (Halliday y Carter, 2003).

A diferencia de *C. neoformans*, que ha sido aislado en todo el mundo, *C. gattii* está restringido predominantemente a climas tropicales y subtropicales y se ha propuesto una asociación ecológica específica con un número de especie de Eucalipto, en particular el *Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus tereticornis* (Ellis y Pfeiffer, 1992). Sin embargo, a pesar de los diferentes patrones de distribución geográfica, las cepas de todas las especies han sido aisladas en todos los continentes (Casadevall y Perfect, 1998).

Un evento de gran importancia a nivel mundial, debido al cambio en el patrón epidemiológico de *Cryptococcus* fue el de la Isla de Vancouver, Columbia Británica, Canadá en el año 1999, donde *Cryptococcus gattii* emergió entre los residentes y visitantes de la isla así como en poblaciones de animales domésticos y salvajes. La incidencia de la enfermedad en la Isla de Vancouver se mantuvo en 36 casos por millón de habitantes por año entre 2002-2005, la cual es notablemente más alta que las tasas en otras zonas endémicas de *C. gattii* (Chen et al., 2000; Sorrell, 2001). *C. gattii* ha sido aislado en más de 10 diferentes especies de árboles nativos de la Isla de Vancouver (*Eucalyptus* spp, *Arbutus menziesii*, *Alnus* spp, *Cedrus* spp, *Pseudotsuga* spp, entre otras) (Kidd et al., 2004; MacDougall et al., 2007).



Cepas de *C. neoformans* han sido aisladas en aborígenes pertenecientes a zonas rurales del Sur de Australia las cuales son áreas endémicas de *C. gattii*. Esto motivó a la búsqueda de fuentes ambientales de dicho hongo. En abril de 1989 se inició una búsqueda a gran escala en el valle de Barossa, un área rural donde se habían diagnosticado casos de criptococosis diseminada. Se tomaron muestras aéreas, de suelo y de tejidos vegetales. En noviembre de 1989, después de 8 meses de recolectar y procesar 2.100 muestras, se logró aislar *C. gattii* simultáneamente en dos sitios del valle. El primer sitio fue en la reserva de Barossa, situada a 5 km al sur de Sandy Creek, mientras que el segundo sitio estaba en los parques de Nuriootpa, a 25 km al norte. En ambos sitios *C. gattii* fue aislado a partir de muestras vegetales procedentes de arboles de *Eucalyptus camaldulensis*. Todas las otras muestras recogidas de materia vegetal procedente de otras especies de árboles y del suelo fueron negativas lo cual indicaba una asociación específica entre *C. gattii* y *E. camaldulensis*. Se observó que la aparición súbita de *C. gattii* en el medio ambiente parecía coincidir con el florecimiento de los árboles de *E. camaldulensis* en la zona de estudio (Ellis y Pfeiffer, 1990); sin embargo, en el presente estudio los arboles de eucalipto no estaban floreciendo en el momento en que se realizó la toma de muestras, por lo tanto, no se pudo demostrar la presencia de *Cryptococcus* en las flores de dichos árboles.

En este estudio fueron aisladas cepas de *Cryptococcus neoformans* en materia vegetal en descomposición perteneciente a arboles de eucalipto, lo que demuestra que este tipo de materia orgánica le provee a esa levadura los requisitos nutricionales básicos, así como de un hábitat idóneo para su desarrollo. Investigaciones como la de Quintero et al. en el año 2005, sugieren que al analizar las fuentes de tipo vegetal es más probable encontrar altas densidades del hongo en árboles con materia en descomposición (como fue el caso de los eucaliptos) que en lugares con escasa cantidad de detritos (como ocurre con los árboles de almendro). Recientemente, algunos estudios en Estados Unidos y Brasil han señalado la presencia de



Cryptococcus neoformans en materia orgánica en descomposición pertenecientes a diferentes especies de árboles entre ellas *Eucalyptus* spp, *Cassia grandis*, *Senna multijuga*, *Ficus microcarpa*, *Terminalia catappa* y *Moquilea tomentosa* (Lazéra et al., 1996; Litvintseva et al., 2005; Ribeiro et al., 2006).

En nuestro estudio no se aislaron cepas de *Cryptococcus* en las muestras aéreas recolectadas en las cercanías de los árboles de eucalipto, a diferencia de otros estudios como por ejemplo los realizados por Ellis y Pfeiffer en 1990 en donde se aisló esta levadura. Estos investigadores recolectaron las muestras aéreas, bajo árboles de eucalipto que estaban floreciendo, demostrándose la presencia de propágulos, los cuales son los transportadores aéreos del hongo. Los experimentos con muestras aéreas tomadas bajo árboles de eucalipto que no estaban floreciendo para el momento de la toma de muestra, resultaron negativos para el aislamiento de *Cryptococcus* (Ellis y Pfeiffer, 1990).

Se aisló *C. neoformans* en muestras de excremento de aves de corral (gallinas y pollos) en Ciudad Bolívar, este hallazgo concuerda con varias investigaciones que señalan la asociación entre *C. neoformans* y los excrementos de aves (Emmons, 1955; Littman y Schneierson, 1959; Bergman, 1963; Denton y Di Salvo, 1968; Ansheng *et al.*, 1993; Castanon y Lopez, 1994; Casadevall y Perfect, 1998). Múltiples estudios sustentan que el excremento de palomas y aves de corral proporciona un ambiente sumamente favorable (alcalino, hiperosmolar, rico en compuestos nitrogenados, creatinina, xantina, urea y ácido úrico) para el desarrollo de *Cryptococcus* (Rosario *et al.*, 2008). El aislamiento de *Cryptococcus* en excrementos, de paloma está relacionado con los niveles de glucosa en el medio. El hecho de que el aislamiento de *Cryptococcus* en el guano de aves marinas no es significativo a menos que el medio sea complementado con glucosa, apoya esta teoría. De allí que *Cryptococcus* tiene predilección por ciertas aves, dependiendo de la composición de sus excrementos. Estos hallazgos pueden definir claramente el papel del excremento



de aves, en particular palomas, en la transmisión de *C. neoformans* (Nielsen *et al.*, 2007; Cermeño *et al* 2006). Sin embargo, las aves no adquieren la criptococosis, probablemente porque *C. neoformans* no puede crecer a la temperatura normal del cuerpo de las aves (42°C) (Litvintseva *et al.*, 2005).



CONCLUSIONES

La presencia de *Cryptococcus neoformans* aislado en muestras de tejido vegetal (hojas) de las plantaciones de *Eucalyptus camaldulensis* de PROFORCA Los Hachos, Estado Anzoátegui y en las plantaciones de Maripa (CVG), Estado Bolívar, y en excretas de aves de corral de Ciudad Bolívar, es un hallazgo importante debido a que demuestra la distribución ambiental de dicho patógeno en los estados mencionados.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ansheng, L., Nishimura, H., Taguchi, H., Tanaka, R., Shaoxi, W., Miyaji, M. 1993. The insolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinically sourced insulates in China. *Mycopathol.* **124**:1-5.
- Arenas, R. 2003. *Micología Médica ilustrada*. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F. 2nd Ed. pp 339.
- Argüero, B., Garza, D., Torres, M. Junio 1996. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* de *Eucalyptus tereticornis*. *Rev Iberoam Micol.* **13**:27-28.
- Barnett, J. 1990. *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge University Press, Cambridge. 2nd Ed. pp 1002.
- Baró, T., Torres, J., Morena, Y., Alia, C., López, O., Méndez, R. 1999. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and enviromental sources in Spain. *J Clin Microbiol.* **37**:1170-1172.
- Baró, M. 2002. "Epidemiología de la Criptococosis en España, Caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans*". [En línea]. Disponible: http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1222103-150121//mtbt1de2.pdf. [Octubre, 2007].
- Bennet, J., Kwon-Chung, K., Howard, D. 1977. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol.* **105**: 582-586.
- Bergman, F. 1963. Occurrence of *Cryprococcus neoformans* in Sweden. *Acta Med Scand.* **174**:651-655.
- Boekhout, T., Theelen, B., Diaz, M., Fell, J., Hop, W., Abeln, E., Dromer, F., Meyer, W. 2001. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol.* **147**: 891-907.
- Caballera, E. 1998. Situación de las micosis Distrito Federal 1988-1997. *Bol Inf Las Micosis en Vzla.* **31-32**:4-6.



- Calvo, M., Guarro, J., Suárez, G., Ramirez, C. 1980. Air-borne fungi in Barcelona city (Spain). *Mycopathol.* **71**: 89-93.
- Casadevall, A., Perfect, J. 1998. *Cryptococcus neoformans*. American Society for Microbiology. Washington, DC. pp 541.
- Castanon, L., Lopez, R. 1994. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in Mexico City. *Mycoses.* **37**:325-327.
- Cermeño, J.R., Hernández, I., Cabello, I., Orellán, Y., Cermeño, J.J., Albornoz, R., Padrón, E., Godoy, G. 2006. *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* in dove's (*Columbia livia*) excreta in Bolívar State, Venezuela. *Rev Latinoam Microbiol.* **48** (1):6-9.
- Curo, M., Salinas, M. Casquero, J. 2005. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas, suelo y aire de los palomares del perímetro urbano de ICA, 2002. *Rev Perú Med Exp Salud Pública.* **22**:262-266.
- Chen, S., Sorrell, T., Nimmo, G., Speed, B., Currie, B., Ellis, D., *et al.* 2000. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. *Clin Infect Dis.* **31**:499–508.
- Denton, J., Di Salvo, A. 1968. The prevalence of *Cryptococcus neoformans* in various natural habitats. *Sabouraudia.* **6**:213-217.
- Ellis, D., Pfeiffer, T. 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol.* **28** (7):1642-1644.
- Ellis, D., Pfeiffer, T. 1992. The ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Eur J Epidemiol.* **8**:321–325.
- Emmons, C. 1955. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am J Hyg.* **62**:227-252.
- Franzot, S., Salkin, I., Casadevall, A. 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates. *J Clin Microbiol.* **37**:838-840.



- Grupo do Consenso de Criptococose. 2008. Consenso em criptococose. Rev Soc Bras Med Trop. **41** (5): 524-544.
- Halliday, C., Carter, D. 2003. Clonal reproduction and limited dispersal in an environmental population of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolates from Australia. J Clin Microbiol. **41** (2):703-711.
- Ikeda, R., Shinoda, Fukusawa, Y., Kaufman, L. 1982. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. J Clin Microbiol. **36**:22-29.
- Jane, N., Fries, B., 2008. Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Mycopathol. **166**:181–188.
- Kidd S., Hagen F., Tschärke R., Huynh M., Bartlett K., Fyfe M., *et al.* 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). Proc Natl Acad Sci U S A. **101**:17258–17263.
- Kyung, J., Kwon-Chung. Ashok, V. 2006. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?. FEMS Yeast Res. **6**: 574-587.
- Kwon-Chung, K., Polachek, I., Bennett, J. 1981. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Serotypes B and C). J Clin Microbiol. **15**:535-537.
- Lazéra, M., Pires, F., Camillo-Coura, L., Nishikawa, M., Bezerra, C., Trilles, L., Wanke, B. 1996. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. J Med Vet Mycol. **34**:127-131.
- Lengeler, K., Cox, G., Heitman, J. 2001. Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. Infect Immun. **69**:115–122.
- Littman, M., Schneerson, S. 1959. *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City. Am J Hyg. **69**:49-59.



- Litvintseva, A., Kestenbaum, L., Vilgalys, R., Mitchell, T. 2005. Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* **43** (2):556-564.
- Martin, E., Valdeverde, A. 1999. Diagnóstico microbiológico y estudio de la sensibilidad *in vitro*. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Valme. Sevilla. [En Línea]. http://www.seimc.org/control/revi_Mico/cripto.htm. [Octubre 2007].
- MacDougall, L., Kidd, S., Galanis, E., Mak, S., Leslie, M., Cieslak, P., *et al.* 2007. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the pacific northwest, USA. *Emerg Infect Dis.* **13** (1): 42-50.
- Nielsen, K., De Obaldia, A., Heitman, J. 2007. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: Implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryot Cell.* **6**: 949–959
- Pidcoe, V., Kaufman, L. 1968. Fluorescent-antibody reagent for the identification of *Cryptococcus neoformans*. *Appl Microbiol.* **16**: 271-275.
- Pitt, J., Hocking, A. 1997. *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic and Profesional. Londres. 2nd Ed. pp 593.
- Quintero, E., Castañeda, E., Ruiz, A. 2005. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca-Colombia. *Rev Iberoam Micol.* **22**: 93-98
- Ribeiro, A., Silva, L., Schrank, I. Schrank, A., Meyer, W., Vainstein, M. 2006. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* serotype D from Eucalypts in South Brazil. *Med Mycol.* **44**:707-713.
- Rosario, I., Acosta, B., Colom, F. 2008. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. *Rev Iberoam Micol.* **25**: S13-S18
- Rozenbaum, R., Goncalvez, B., Wanke, M., Caiuby, J., Clemente, M., Monteiro, P., Londero, A. 1992. *Cryptococcus neoformans* varieties as agents of cryptococcosis in Brazil. *Mycopathol.* **119**:133-136.



- Shankar, E., Kumarasamy, N., Bella, D., Renuka, S., Kownhar, H., Suniti, S., Rajan, R., Rao, U. 2006. Pneumonia and pleural effusion due to *Cryptococcus laurentii* in a clinically proven case of AIDS. *Can Respir J.* **13**(5): 275–278.
- Sorrell, T. 2001. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med Mycol.* **39**:155–68.
- Tintelnot, K., Losert, H., 2005. Isolation of *Cryptococcus adeliensis* from clinical samples and the environment in Germany. *J Clin Microbiol.* **43**(2): 1007.
- Villanueva, E., Sánchez, E., Albornoz, M. 1987. Aislamiento del *C. neoformans* de diferentes áreas de la zona metropolitana de Caracas. *Bol Inf Las Micosis en Vzla.* **3**:22.
- Villanueva, E., Mendoza, M., Torres, E. M.B de Albornoz. 1989. Serotipificación de 27 cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas en Venezuela. *Acta Cient Venezolana.* **40**:151-154.
- Vázquez, O., Martínez, I., Campos, T. 2005. Criptococosis. Historia natural y estado actual del tratamiento. *Acta Pediatr Mex.* **26** (1):18-28.



METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

TÍTULO	Aislamiento de <i>Cryptococcus</i> spp en muestras ambientales de los estados Bolívar y Anzoátegui.
SUBTÍTULO	

AUTOR (ES):

APELLIDOS Y NOMBRES	CÓDIGO CULAC / E MAIL
Piñerúa G., Jean F.	CVLAC: 18.013.197 E MAIL: jeanfelixmedicina@hotmail.com
Zambrano I., Rosanna del C.	CVLAC: 17.382.568 E MAIL: rosannamedicina@hotmail.com
	CVLAC: E MAIL:
	CVLAC: E MAIL:

PALÁBRAS O FRASES CLAVES:

Cryptococcus neoformans

Eucalyptus camaldulensis

Criptococosis



METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

ÁREA	SUBÁREA
Parasitología y Microbiología	Micología

RESUMEN (ABSTRACT):

El género *Cryptococcus* incluye muchas especies, de las cuales *Cryptococcus neoformans* se considera frecuentemente patógeno humano. *Cryptococcus neoformans* agente etiológico de la criptococosis, es una levadura encapsulada. Actualmente son reconocidas dos especies del Complejo neoformans: *Cryptococcus gattii* y *Cryptococcus neoformans*. El objetivo del presente estudio fue identificar las especies de *Cryptococcus* aisladas de medios naturales del estado Bolívar y estado Anzoátegui (Venezuela). Se realizó un estudio prospectivo y descriptivo. Se recolectaron 576 muestras procedentes de 300 árboles de *Eucalyptus camaldulensis*; presentes en las plantaciones de PROFORCA Los Hachos, PROFORCA Coloradito y plantaciones de Maripa, además 20 muestras aéreas de dichas plantaciones y 50 muestras de excretas de aves (pollos y gallinas) de algunas ventas de aves de corral de Ciudad Bolívar. Cada una de las muestras fueron sembradas en agar Sabouraud dextrosa cloranfenicol, agar *Guizotia abyssinica*-creatinina y agar *Helianthus annuus* por duplicado. Los hongos filamentosos se observaron al microscopio bajo la forma de numerosos filamentos o hifas las cuales pueden presentar septos, a menudo ramificados o sin septos. La identificación de hongos filamentosos se realizó mediante las técnicas estándar de laboratorio aplicando criterios macroscópicos, microscópicos, características fisiológicas y bioquímicas. Las levaduras se observaron al examen microscópico directo como blastosporas. Se aislaron todas las cepas que presentaron características morfológicas compatibles con *C. neoformans* sometiénolas posteriormente a las pruebas de identificación y biotipificación: prueba de la ureasa, producción de pigmentos en agar *Guizotia abyssinica* y agar *Helianthus annuus*, crecimiento a 37°C, ausencia de nitrato-reductasa, estudio de asimilación de azúcares mediante el sistema de Api 20 C (Biomérieux®), test de resistencia a la actidiona y producción de fenoloxidasas. Los aislamientos identificados como *C. neoformans* fueron sembrados en medio con L-canavanina glicina azul de bromotimol (SIGMA®) para el estudio de especies. Se realizó estadística descriptiva. Los hongos aislados más frecuentemente en las muestras de tejido vegetal correspondían a los géneros *Aspergillus* en 75% (n=432), *Mucor* 9,5% (n=55) y *Penicilium* en 3,3% (n=19). El género *Cryptococcus* fue aislado en el 0,3% (n=2) de estas muestras. Las cepas de *Cryptococcus* fueron aisladas en un árbol de la plantación de eucalipto de PROFORCA Los Hachos y en un árbol de la plantación de Maripa. Se aisló *Cryptococcus* en el 2% (n=1) de las muestras de excretas de pollos y gallinas procedentes de aves de corral de Ciudad Bolívar. Las cepas aisladas de *Cryptococcus* pertenecían a la especie *C. neoformans*. En el presente estudio *Cryptococcus neoformans* fue aislado en fuentes ambientales de los estados Bolívar y Anzoátegui lo cual demuestra la distribución ambiental de dicho patógeno, y contribuye al conocimiento epidemiológico de este hongo.



METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

CONTRIBUIDORES:

APELLIDOS Y NOMBRES	ROL / CÓDIGO CVLAC / E_MAIL				
Cermeño, Julman	ROL	CA	AS	TU X	JU
	CVLAC:	8.939.807			
	E_MAIL	jcerme30@gmail.com			
	E_MAIL				
Guevara P., Armando J.	ROL	CA	AS	TU	JU x
	CVLAC:	9.460.962			
	E_MAIL	agvillefort@yahoo.com			
	E_MAIL				
Blanco M., Ytalia Y.	ROL	CA	AS	TU	JU X
	CVLAC:	8.914.874			
	E_MAIL	ytaliablanca@hotmail.com			
	E_MAIL				
	ROL	CA	AS	TU	JU
	CVLAC:				
	E_MAIL				
	E_MAIL				

FECHA DE DISCUSIÓN Y APROBACIÓN:

2010	02	08
AÑO	MES	DÍA

LENGUAJE. SPA



METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

ARCHIVO (S):

NOMBRE DE ARCHIVO	TIPO MIME
Tesis.Aislamiento de Cryptococcus spp en muestras ambientales de los estados Bolívar y Anzoátegui.	MS.word

ALCANCE

ESPACIAL: Escuela de Ciencias de la Salud “Francisco Batistini”

TEMPORAL: 10 años

TÍTULO O GRADO ASOCIADO CON EL TRABAJO:

Médico Cirujano

NIVEL ASOCIADO CON EL TRABAJO:

Pregrado

ÁREA DE ESTUDIO:

Departamento de Parasitología y Microbiología

INSTITUCIÓN:

Universidad de Oriente



METADATOS PARA TRABAJOS DE GRADO, TESIS Y ASCENSO:

DERECHOS

De acuerdo al artículo 44 del reglamento de trabajos de grado

**“Los Trabajos de grado son exclusiva propiedad de la
Universidad de Oriente y solo podrán ser utilizadas a otros
fines con el consentimiento del consejo de núcleo respectivo,
quien lo participara al Consejo Universitario”**

Jean
AUTOR
Jean Piñero

Rosanna
AUTOR
Rosanna Lambrano

Fernando
TUTOR

Antonio
JURADO 1

L.F.
JURADO 2

POR LA SUBCOMISION DE TESIS