39/2003-04

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.
Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de Sobresaliente "Cum Laude"

Las Palmas de Gran Canaria, a 26 de febrero de 2004.

El/la Presidente/a: Dr. D. Miguel Hermoso de Mendoza Salcedo

El/la Secretario/a: Dr. D. Pablo Antonio Luniola Gómez

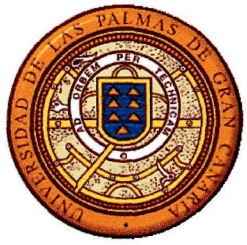
El/la Vocal: Dra. Dña. María Francisca Colom Valiente

El/la Vocal: Dr. D. Fernando Real Valcárcel

El/la Vocal: Dr. D. José Bismarck Poveda Guerrero

El/la Doctorando/a: Dña. Inmaculada Rosario Medina

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

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

Mª Inmaculada Rosario Medina

Las Palmas de Gran Canaria, 2004

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

Dª ENCARNACIÓN CASTELLANO SANTANA, SECRETARIA DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fecha de de 2004 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la Tesis Doctoral titulada **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,** presentada por la doctoranda Dª Mª Inmaculada Rosario Medina y dirigida por la Doctora Dª Begoña María Acosta Hernández.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente certificación en Las Palmas de Gran Canaria, a tres de Febrero de dos mil cuatro.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

Programa de doctorado Sanidad y Patología Animal

LA PALOMA (*Columba livia*) COMO PORTADORA DE *CRYPTOCOCCUS* SPP. Y OTROS HONGOS LEVADURIFORMES CON IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA. ESTUDIO EN LA ISLA DE GRAN CANARIA

Tesis Doctoral presentada por Dª Mª Inmaculada Rosario Medina

Dirigida por la Dra. Dª Begoña Mª Acosta Hernández

Codirigida por la Dra. Dª Soraya Déniz Suárez

La Directora **La Codirectora** **El Doctorando**

Las Palmas de Gran Canaria, enero de 2004.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

BEGOÑA Mª ACOSTA HERNÁNDEZ, PROFESORA TITULAR DE "ENFERMEDADES INFECCIOSAS" DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

INFORMA:

Que **Dª Mª Inmaculada Rosario Medina**, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **"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",** el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria a 15 de enero de 2004

Fdo: Begoña Mª Acosta Hernández

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

SORAYA DÉNIZ SUÁREZ, PROFESORA TITULAR DE "ENFERMEDADES INFECCIOSAS" DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

INFORMA:

Que **Dª Mª Inmaculada Rosario Medina**, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **"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",** el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria a 15 de enero de 2004

Fdo: Soraya Déniz Suárez

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

A mis padres y hermanos por apoyarme en todo momento y especialmente a Giommy por el tiempo que *no le he podido dedicar.*

Descubrir es ver lo que todo el mundo ha visto y pensar de ello lo que nadie ha pensado.

A. Szent Gyorgyi

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Índice

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

1.- INTRODUCCIÓN **1**

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA **5**

2.1.- LA COLOMBOFILIA 5
2.1.1.- Historia de la colombofilia 5
2.1.2.- El progreso constante en Canarias 7

2.2.- CRIPTOCOCOSIS 11
2.2.1.- Consideraciones generales 11

2.2.1.1.- Concepto y sinonimia de la enfermedad 11
2.2.1.2.- Historia de la enfermedad 11

2.2.2.- Etiología 15

2.2.2.1.- Clasificación taxonómica de los basidiomicetos 15
2.2.2.2.- El Género *Cryptococcus*. Características generales 19

2.2.2.2.1.- Caracteres morfológicos y tintoriales del Género *Cryptococcus* 20
2.2.2.2.2.- Descripción de las especies y variedades 23
2.2.2.2.3.- Características bioquímicas del Género *Cryptococcus* 25

2.2.2.2.3.1.- Test de ureasa 25
2.2.2.2.3.2.- Tests de asimilación 26
2.2.2.2.3.3.- Actividad fenoloxidasa y pigmentación 28
2.2.2.2.3.4.- El sistema coenzima Q 30

2.2.2.3.- Formas perfectas de *Cryptococcus neoformans* 31
2.2.2.4.- Resistencia a los agentes físicos y químicos 32
2.2.2.5.- Medios de cultivo 34

2.2.3.- Epidemiología 37

2.2.3.1.- Especies sensibles y receptivas a *Cryptococcus neoformans* e impacto en la salud pública 37
2.2.3.2.- Ecología y distribución 40

2.2.3.2.1.- Relación existente entre la paloma y *Cryptococcus neoformans* 41
2.2.3.2.2.- *Cryptococcus neoformans* 43

2.2.3.2.2.1.- Variedad *neoformans* 44
2.2.3.2.2.2.- Variedad *gattii* 47

2.2.3.2.3.- La paloma y otras aves como portadoras de otras especies de criptococos 49
2.2.3.2.4.- Estudios realizados en España 50

2.2.3.3.- Contagio: formas y vías de contagio 52
2.2.4.- Patogenia de la criptococosis 55

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

2.2.4.1.- Determinantes de la enfermedad dependientes del hospedador..... 55
2.2.4.2.- Factores de patogenicidad de *Cryptococcus neoformans* y respuesta inmunológica del huésped..... 58
2.2.4.3.- Acción patógena en la especie humana..... 61
2.2.4.4.- Acción patógena animal..... 63

2.2.5.- Clínica de la enfermedad..... 64

2.2.5.1.- Manifestaciones clínicas de la criptococosis humana..... 65

2.2.5.1.1.- Forma pulmonar..... 66
2.2.5.1.2.- Formas diseminadas..... 66

2.2.5.1.2.1.- Afección del SNC o manifestaciones nerviosas..... 66
2.2.5.1.2.2.- Manifestaciones cutáneas..... 66
2.2.5.1.2.3.- Otras manifestaciones..... 67

2.2.5.1.3.- Cuadros clínicos descritos en medicina humana por otras especies de criptococos..... 69

2.2.5.2.- Manifestaciones clínicas de la criptococosis en animales domésticos..... 70

2.2.6.- Lesiones..... 73

2.2.7.- Diagnóstico..... 75

2.2.7.1.- Frotis y cultivo..... 76
2.2.7.2.- Hallazgos en sangre y LCR..... 76
2.2.7.3.- Tinción negativa..... 77
2.2.7.4.- Diagnóstico histopatológico..... 77
2.2.7.5.- Pruebas de detección del antígeno capsular. Prueba de látex..... 78
2.2.7.6.- Tomografía y resonancia magnética..... 78
2.2.7.7.- Diagnóstico mediante técnicas de biología molecular.. 79

2.2.8.- Tratamiento..... 79
2.2.9.- Profilaxis..... 82

3.- MATERIAL Y MÉTODOS..... 83

3.1.- DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES LEVADURIFORMES DE INTERÉS CLÍNICO AISLADAS MÁS FRECUENTEMENTE EN PALOMARES DE LA ISLA DE GRAN CANARIA..... 83

3.1.1.- Muestreo..... 83
3.1.2.- Toma y procesado de las muestras en palomares..... 90

3.1.2.1.- Muestras de heces..... 90
3.1.2.2.- Muestras de buche..... 91
3.1.2.3.- Muestras de cloaca..... 92

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

3.2.- DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES LEVADURIFORMES AISLADAS MÁS FRECUENTEMENTE DE LAS PLAZAS PÚBLICAS DE LA ISLA DE GRAN CANARIA CON UNA POBLACIÓN SIGNIFICATIVA DE PALOMAS Y/O TÓRTOLAS 93

3.2.1.- Muestreo 93
3.2.2.- Toma y procesado de las muestras en plazas públicas 95
3.2.2.1.- Muestras de heces 95

3.3.- ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS CEPAS OBTENIDAS EN 3.1 Y 3.2 95

3.3.1.- Aislamiento 95
3.3.2.- Identificación 97

3.4.- MEDIOS DE CULTIVO 102

3.4.1.- Agar de Staib (Guizotia abyssinica o Agar semillas de Niger) 102
3.4.2.- Nitrato potásico 104
3.4.3.- Medio GCP (Glicina Cicloheximida Rojo de Fenol) 104
3.4.4.- Medio CGB (Canavanina-Glicina-Azul de Bromotimol) 105
3.4.5.- Medio de Aschner 106
3.4.6.- Agar Urea de Christensen 106
3.4.7.- Candida ID 107

3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO 108

3.5.1.- Valoración estadística de las cepas de *Cryptococcus* spp. obtenidas de buche, heces y cloaca en palomares 108
3.5.2.- Auxanotipos de origen humano y animal 109

3.6.- ESTUDIO DE PREVALENCIA Y FRECUENCIA MEDIA DE INFECCIÓN 110

4.- RESULTADOS 113

4.1.- RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS 113

4.1.1.- Resultados obtenidos en el estudio microbiológico de las cepas de *C. neoformans* de origen aviar y de origen humano, *Cryptococcus* spp y *Candida albicans* 113

4.2.- RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MUESTREO DE PALOMARES 120

4.2.1.- Resultados preliminares 120
4.2.2.- Presencia de levaduras del Género *Cryptococcus* en muestras de heces, buche y cloaca de palomares 123

4.2.2.1.- Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* 123
4.2.2.2.- Aislamiento de *Cryptococcus uniguttulatus* 124
4.2.2.3.- Aislamiento de *Cryptococcus laurentii* 124
4.2.2.4.- Aislamiento de *Cryptococcus albidus* 125

4.2.3.- Evaluación total de levaduras aisladas en palomares 128

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.4.- Frecuencia de palomas portadoras en buche y en cloaca de las distintas especies levaduriformes aisladas en el estudio..... 131
4.2.5.- Frecuencia de aislamiento en muestras de excretas..... 134
4.2.6.- Prevalencia de las distintas especies levaduriformes por palomar independientemente de la muestra en la que se haya aislado dicha levadura..... 137
4.2.7.- Correlación de aislamientos levaduriformes más relevantes de nuestro estudio: *C. neoformans, C. uniguttulatus, C. laurentii, C. albidus* y *Candida albicans*..... 137

4.2.7.1.- Asociaciones buche-cloaca (palomas)..... 124

4.2.7.1.1.- *Cryptococcus neoformans*..... 138
4.2.7.1.2.- *Cryptococcus uniguttulatus*..... 139
4.2.7.1.3.- *Cryptococcus laurentii*..... 139
4.2.7.1.4.- *Cryptococcus albidus*..... 140
4.2.7.1.5.- *Candida albicans*..... 140

4.2.7.2.- Asociaciones heces-buche (palomares)..... 141

4.2.7.2.1.- *Cryptococcus neoformans*..... 141
4.2.7.2.2.- *Cryptococcus uniguttulatus*..... 143
4.2.7.2.3.- *Cryptococcus laurentii*..... 144
4.2.7.2.4.- *Cryptococcus albidus*..... 145
4.2.7.2.5.- *Candida albicans*..... 146

4.2.7.3.- Asociaciones heces-cloaca (palomares)..... 147

4.2.7.3.1.- *Cryptococcus neoformans*..... 147
4.2.7.3.2.- *Cryptococcus uniguttulatus*..... 148
4.2.7.3.3.- *Cryptococcus laurentii*..... 149
4.2.7.3.4.- *Cryptococcus albidus*..... 150
4.2.7.3.5.- *Candida albicans*..... 151

4.2.8.- Estudio distritos..... 152

4.2.8.1.- *Cryptococcus neoformans*..... 153
4.2.8.2.- *Cryptococcus uniguttulatus*..... 154
4.2.8.3.- *Cryptococcus laurentii*..... 155
4.2.8.4.- *Cryptococcus albidus*..... 156
4.2.8.5.- *Candida albicans*..... 157

4.3.- AISLAMIENTOS LEVADURIFORMES OBTENIDOS EN EL MUESTREO DE LAS PLAZAS PÚBLICAS..... 158

5.- DISCUSIÓN..... **161**

6.- CONCLUSIONES..... **181**

7.- RESUMEN..... **183**

8.- SUMMARY..... **185**

9.- BIBLIOGRAFÍA..... **187**

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

10.- ABREVIATURAS..... 215

11.- AGRADECIMIENTOS..... 217

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Introducción

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

1.- INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha producido un aumento llamativo de las infecciones y enfermedades sistémicas causadas por hongos considerados generalmente saprofitos. Estos hongos causantes de dichas infecciones se denominan, "hongos oportunistas", entre los más importantes se encuentran distintas especies de candidas y criptococos, especialmente *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, existiendo muy poca información de su incidencia en los diferentes grupos de riesgo (enfermos de SIDA, receptores de trasplantes o pacientes con cáncer) (Xu y cols., 2000; Colom y cols., 2001).

C. neoformans se encuentra en el suelo y en los excrementos de aves, especialmente en los de palomas. Las palomas, independientemente de que vivan en libertad o en cautiverio, pueden actuar como portadoras de agentes etiológicos peligrosos para el hombre y los animales. Las heces de estas aves constituyen un sustrato importante para el desarrollo del agente responsable de esta enfermedad denominada criptococosis, que puede afectar al ser humano y a una amplia gama de animales (Frisvald y Samson, 1991).

El aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de las heces de palomas muestra que dicho hongo existe como contaminante ambiental. Un grado de contaminación elevado podría convertirse en un peligro para la salud pública (Kelley y Mosier, 1977) y más concretamente para las personas dedicadas al cuidado, cría y limpieza de las palomas y palomares, así como para aquellos que han de remover la tierra contaminada con heces de paloma y los que alimentan a palomas salvajes o en libertad (Schwarz y Kauffman, 1977; Glunder, 1989; Nodarse y Bravo, 1999).

Por esta razón, esta levadura se ha convertido en el centro de nuestra investigación, si bien, desde el punto de vista epidemiológico es necesario tener presente las posibles implicaciones patógenas que pueden tener para el hombre y los animales otras especies de criptococos: *C. albidus, C.*

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

laurentii, C. uniguttulatus, C. humicolus y C. curvatus (Krumholz, 1972; Howard, 1973; Wieser, 1973; Da Cunha y Lusins, 1973; Decostere y cols., 2003), existiendo en la actualidad poca información de cual es el papel que juega la paloma como portadora de estas especies citadas. Conocemos muchísimos datos sobre la criptococosis, no obstante, sigue existiendo un gran desconocimiento sobre algunos puntos epidemiológicos, clínicos y biológicos (Kwon-Chung, 2000). Es por esta razón, que en nuestro estudio investigamos en buche, cloaca y excrementos de palomas, no sólo la presencia de *C. neoformans*, sino también la de estas otras especies de criptococos, sin olvidarnos de *C. albicans*, esta última levadura frecuentemente aislada de heces de palomas e implicada al igual que las distintas especies de criptococos citadas como productora de enfermedad tanto en el hombre como en los animales.

Actualmente, se desconoce en nuestra Comunidad Autónoma el papel que pueden desempeñar las palomas como portadoras o fuente de hongos levaduriformes, especialmente *Cryptococcus neoformans*, sobre todo en aquellos lugares en donde se concentran un gran número de las mismas y que constituyen al mismo tiempo un espacio de recreo y ocio para la sociedad.

Canarias es una de las Comunidades Autónomas con mayor número de palomas mensajeras de España, y actualmente tiene un destacadísimo nombre en la colombofilia mundial, razón por la cual creemos de gran importancia realizar un estudio epidemiológico centrado en la paloma cuyos objetivos principales serían:

- **OBJETIVO 1º.-** Determinar las especies de criptococos y otras especies levaduriformes de interés clínico tanto en patología humana como veterinaria, aisladas frecuentemente en muestras de buche, heces y cloaca de las palomas existentes en los palomares privados de la isla de Gran Canaria.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

- **OBJETIVO 2º.-** *Determinar las especies de criptococos y otras* especies levaduriformes aisladas frecuentemente en heces de palomas y/o tórtolas de las plazas públicas de la isla de Gran Canaria con una población significativa de las mismas.

- **OBJETIVO 3º.-** Comprobar la relación existente entre los aislamientos obtenidos de buche, heces y cloaca en los palomares muestreados.

- **OBJETIVO 4º.-** Determinar los auxanotipos de *C. neoformans* presentes en nuestro estudio, todas de origen aviar, y comparación con las cepas aisladas de enfermos humanos cedidas por el hospital Dr. Negrín de Las Palmas de Gran Canaria.

- **OBJETIVO 5º.-** Determinación de la prevalencia de las especies levaduriformes implicadas habitualmente en la salud pública en la isla de Gran Canaria, tanto por palomares privados como en la población colombófila afincada en las plazas urbanas de la zona centro norte de la isla.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Revisión Bibliográfica

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.- LA COLOMBOFILIA

2.1.1.- HISTORIA DE LA COLOMBOFILIA

La fidelidad de las palomas mensajeras, su rapidez y su silencio, son propiedades altamente valoradas por el hombre. Según Charles Darwin, el primer colombófilo que recuerda la historia, fue el faraón Userkaf de la quinta dinastía egipcia (3000 A.C.) (Pulido y Thopam, 1999).

En Egipto había palomares postales y el Gobierno expedía con tal medio avisos para anunciar los diversos grados de crecimiento del Nilo. En los tiempos heroicos de Grecia se anunciaban los nombres de los vencedores de los Juegos Olímpicos por medio de palomas mensajeras. Éstas se criaban en los palomares sacerdotales de los templos para utilizarlas como medio de comunicación directa entre los distintos templos.

Los palomares fijos y móviles constituían un servicio militar de la mayor importancia. Los romanos empleaban las palomas como estafetas: eran sus telégrafos. La historia guarda en el recuerdo escenas en las que las palomas han sido protagonistas. En Bagdad, en el año 1100 ya funcionaba un servicio postal de palomas mensajeras (Torres, 2001).

En Europa, el empleo de las palomas mensajeras, toma impulso a partir del siglo XIII. La costumbre de adiestrar palomas mensajeras pasa a Inglaterra a principios del siglo XVIII. En Francia, hasta la revolución francesa, la cría de palomas mensajeras era privilegio de la nobleza, mientras que el resto de las clases sociales tenía prohibida su posesión bajo pena de muerte.

En el siglo XIX, entre 1812 y el 1820, las palomas mensajeras son usadas en Italia, Francia, Bélgica y en Inglaterra para enviar los números de la lotería, las cotizaciones de bolsa, las órdenes de compra-venta, etc.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Aunque la paloma es símbolo de paz, ha sido frecuentemente utilizada durante la guerra, por los ejércitos alemán, francés y belga. El primer concurso de palomas mensajeras se efectuó el 15 de julio de 1820. A partir de esta época empiezan a implantarse los palomares militares; el primero se instauró en Alemania, siguieron Austria, Rusia, Italia, Francia, España, Rumanía y Turquía.

Es, en realidad, a mediados del siglo XIX, y en especial en Bélgica, considerada como la cuna de la colombofilia, donde comienza a desarrollarse la afición a la cría y educación de las palomas mensajeras (Pulido y Thopam, 1999).

En el año 1914, la paloma mensajera desempeñó un papel importantísimo durante la Primera Guerra Mundial. El hilo telefónico era cortado frecuentemente, las emisoras de radio se estropeaban. La paloma mensajera era el medio de comunicación idóneo para cortas distancias. En ocasiones, las cestas que contenían las palomas eran transportadas por los propios soldados y en otras eran lanzadas en paracaídas. La vida de muchos soldados dependía de estas pequeñas aves que volaban desde las posiciones de retaguardia a las de vanguardia sin que nadie las detectase, aspectos importantes en la estrategia belga.

Fueron los árabes, amantes de la práctica de la cetrería, quienes introdujeron la paloma mensajera en la Península Ibérica. De ahí el origen de la Colombofilia Española, o lo que es lo mismo, del arte de criar y entrenar palomas mensajeras (Torres, 2001).

En España, ilustres y distinguidos ciudadanos de Barcelona formaron en febrero de 1890 la Sociedad Colombófila de Cataluña. El 7 de septiembre de 1894, se funda en Málaga la Federación Española de Colombofilia (Pulido y Thopam, 1999).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

2.1.2.- EL PROGRESO CONSTANTE EN CANARIAS

La llegada de las primeras palomas mensajeras a Canarias data de 1882, fecha en que el colombófilo grancanario D. Francisco Manrique de Lara hizo construir el primer palomar de Las Palmas de Gran Canaria, considerado en la actualidad como el más antiguo de Canarias. El palomar estaba situado en la azotea de su vivienda en el histórico barrio de Vegueta. Las palomas mensajeras traídas por marineros de muchos lugares del mundo, se utilizaban para pedir suministros desde los barcos, ya que no había muelle de atraque y eran llevadas a éstos en barcos de remos y soltadas con notas de pedidos (Sánchez Ramírez, 1992).

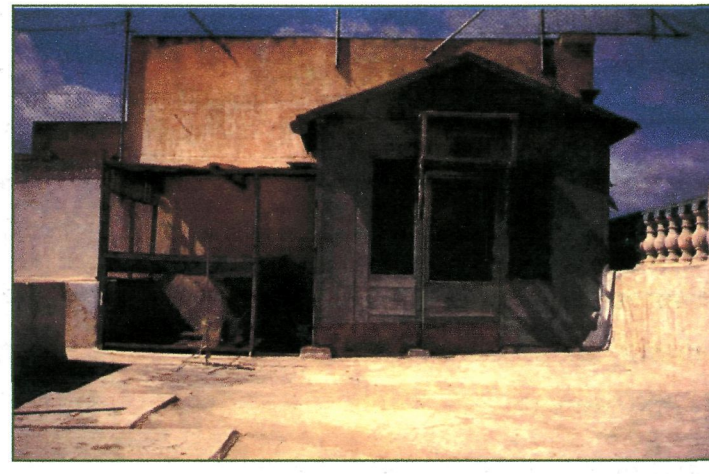


Figura 1.- Palomar de D. Francisco Manrique de Lara, construído hace más de un siglo en Las Palmas de Gran Canaria (1882) y considerado como el más antiguo de nuestra capital para las actividades colombófilas

D. Francisco Manrique de Lara fue uno de los pioneros de la colombofilia en las Islas Canarias, junto a D. Alonso Nava Grimón, VIII Marqués de Villanueva del Prado. De hecho, ambos trajeron a este archipiélago los primeros pichones desde Bélgica. Como dato anecdótico, podríamos comentar que estas palomas fueron utilizadas en sus comienzos para comunicar resultados de los encuentros de lucha canaria, de peleas de gallos y, en definitiva, de otros certámenes de interés social y deportivo (Pulido y Thopam, 1999).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

A principios del siglo XX se inició en las Islas Canarias la práctica de este interesante deporte, de gran utilidad militar en las transmisiones, surgiendo la primera sociedad colombófila en Las Palmas de Gran Canaria el día 4 de junio de 1900, siendo su fundador Santiago Cullén y Verdugo, militar ilustre y figura fundamental para el desarrollo de la colombofilia en Canarias. En 1900 escribió un libro titulado "Nociones de Colombofilia y estudio de Telegrafía Alada aplicada a las Islas Canarias", que continúa siendo de inestimable consulta para conocer las claves del apasionante mundo de la paloma mensajera en nuestras islas (Rivero Gómez, 1990).

El día 5 de noviembre de 1902 se constituye la segunda sociedad de las islas, la Real de Tenerife, teniendo como presidente al general Juan Villavicencio y Gámez. La tercera se creó en 1926 bajo la denominación de Círculo Colombófilo, desapareciendo y volviéndose a presentar el 23 de agosto de 1945. Sucesivamente, siguen formándose nuevos clubes y de esta forma sigue creciendo el deporte en Canarias (Montesdeoca, 1989).

Transcurridos ciento tres años, Canarias dispone de 52 clubes colombófilos, con más de 2000 socios federados y un censo de palomas mensajeras que supera las 170.000 aves (Tabla 1), educadas para los vuelos marítimos, comunicando en poco tiempo las islas y la costa de África.

ISLA	PALOMARES	PALOMAS	CLUB
TENERIFE	**950**	**82.476**	**25**
LA PALMA	**145**	**9.734**	**3**
LA GOMERA	**67**	**4.721**	**2**
GRAN CANARIA	**720**	**59.359**	**17**
FUERTEVENTURA	**89**	**7.442**	**2**
LANZAROTE	**99**	**6.785**	**3**
EL HIERRO	**0**	**0**	**0**
TOTAL	**2.070**	**170.517**	**52**

Tabla 1.- Censo de palomas y palomares de las Islas Canarias cedido por el Batallón de Transmisiones de Servicios Especiales (El Pardo, Madrid)

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Poco a poco lograron aumentar las distancias, disminuir las pérdidas de las palomas en las sueltas y mejorar las velocidades. Hoy, debido a una constante experiencia, estudio y selección, la Colombofilia Canaria presenta al mundo un ejemplo de progreso, que admiran propios y extraños, y que explica que las palomas canarias sean calificadas como las mejores del mundo en vuelos marítimos.

La gran afición que existe en las Islas Canarias es digna de todo elogio, pues a pesar de sufrir pérdidas muy crecidas, y ello año tras año, los aficionados de nuestras islas continúan mejorando sus estirpes, trabajando intensamente en su preparación y cuidado, con objeto de irlas mejorando y aclimatándolas al vuelo sobre el mar, siempre con miras a resarcirse de los fracasos habidos. Parece ser que la causa de estos fracasos la constituyen las profundidades del mar que atraviesan (Ferrán Andreu, 1973).

Los vuelos de educación de la paloma mensajera se iniciaron en 1900. En un principio éstos quedaron reducidos a vuelos sobre tierra dentro de cada isla. Por el año 1905 se efectuaron los vuelos de educación sobre mar en las direcciones Gran Canaria-Tenerife y viceversa. Más tarde, en 1915 comienzan los vuelos desde las islas de Fuerteventura y Lanzarote. En 1920 se realizaron los viajes desde la costa de África occidental española, Cabo Jubí a Las Palmas de Gran Canaria y Santa Cruz de Tenerife. En 1934 Sidi Ifni, y luego en 1940 Tan-Tan y Aaiún en 1941 (Sánchez Ramírez, 1997).

La colombofilia no es solamente un deporte apasionante, es de utilidad nacional. Canarias tiene actualmente un gran historial y un destacadísimo nombre en la colombofilia mundial.

En España, todas las palomas mensajeras dependen del Ministerio de Defensa. El Ejército Español tiene su propio servicio colombófilo dotado de palomares en diversas provincias componiendo las llamadas líneas militares de colombofilia. Cada palomar está atendido por personas especializadas encargadas del mantenimiento y control de las palomas mensajeras.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

En nuestro país, el Ministerio de Defensa tiene censadas a todas las palomas mensajeras, tanto militares como de competición. Cuando se realizan maniobras militares es frecuente la participación de equipos colombófilos. Las palomas son lanzadas en paracaídas para ser utilizadas en el envío de mensajes, pues aún hoy en día, cuando disponemos de sofisticados medios de comunicación, la paloma mensajera es considerada por el ejército como un fiel agente de transmisión.

La paloma mensajera no sólo ha tenido y tiene aplicaciones militares. La colombofilia es también un deporte con miles de seguidores en todo el mundo. La nobleza y el asombroso sentido de orientación hacen que cada vez, mayor número de aficionados dediquen su tiempo libre a la conservación de estos pequeños y a su vez grandes atletas del aire.

Cuando estamos en el siglo XXI, la naturaleza todavía nos esconde numerosos secretos. Uno de ellos es el sistema de orientación que utilizan las palomas mensajeras. Enviadas y soltadas a cientos de kilómetros de sus palomares, son capaces de volver a ellos. Es posible que su mejor referencia esté en el sol, pero no es la única, ya que en días nublados también son capaces de encontrar la ruta que las lleve hasta su morada.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

2.2.- CRIPTOCOCOSIS

2.2.1.- CONSIDERACIONES GENERALES

2.2.1.1.- CONCEPTO Y SINONIMIA DE LA ENFERMEDAD

La criptococosis es una micosis sistémica producida por un hongo levaduriforme capsulado denominado *Cryptococcus neoformans,* si bien existen referencias en la literatura de enfermedad producida en humanos y en animales, especialmente en inmunodeprimidos, por otras especies de criptococos como *Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus albidus* (Kamalam y cols., 1977; Monga y cols., 1983 (cit., Riley y cols., 1992), Horowith y cols., 1993; Ikeda y Shinoda, 2000).

Es una enfermedad de distribución mundial que cursa de forma subaguda o crónica y que afecta a animales domésticos, silvestres y al hombre, provocando cuadros neumónicos y/o meningoencefalíticos, a menudo mortales (Sansinforiano y cols., 2001; Garau y Palacio, 2002).

La criptococosis ha recibido diferentes sinonimias a lo largo de la historia (Busse, 1895; Rose y Harrison, 1987; Ackerman, 1988; Diamond, 1997).

- Sacaromicosis hominis
- Enfermedad de Busse y Buschke
- Blastomicosis europea
- Torulosis

2.2.1.2.- HISTORIA DE LA ENFERMEDAD

El responsable etiológico de la criptococosis es un hongo levaduriforme capsulado denominado *Cryptococcus neoformans*, descubierto hace aproximadamente 100 años por Francesco Sanfelice, quien aisló originalmente al microorganismo en Italia de un jugo de

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

melocotón, en el año 1894. En esa época, denominó al microorganismo aislado *Saccharomyces neoformans*. Estableció así la prioridad al nombre de la especie. Además, aisló un hongo parecido a una levadura del ganglio linfático de un bovino. Al parecer, esto representa el primer dato de infección en un animal por este agente etiológico.

En 1895, Busse (cit., Jungerman y Schwartzman, 1977), notificó el primer caso de criptococosis humana bajo la presentación de una lesión ósea similar a un sarcoma denominando la enfermedad sacaromicosis hominis o enfermedad de Busse y Buschke.

En 1901, Vuillemin (cit., Jungerman y Schwartzman, 1977) lo aisló de una lesión pulmonar porcina. Determinó que la falta de formación de ascosporas diferenciaba al microorganismo de las verdaderas levaduras y lo transfirió al género *Cryptococcus* (*Cryptococcus hominis*).

En este mismo año, Klein (cit., Jungerman y Schwartzman, 1977) describió una levadura patógena que aisló de la leche, de la cual posteriormente se informó ser idéntica a las cepas de *C. neoformans* de origen humano y vegetal. En 1902, Frothingham (cit., Jungerman y Schwartzman, 1977), describió la criptococosis en un caballo. Se encontró en pulmón una masa mixomatosa después de una persistente descarga nasal de un año de duración.

En 1905, Von Hansemann (cit., Jungerman y Schwartzman, 1977), lo observó por primera vez asociado con meningitis. Esta forma clínica de la enfermedad humana y en la cual la afección del SNC es característica, fue reconocida por primera vez en un paciente y reportada por Verse en 1914.

En 1916, Stoddard y Cutler, informaron de casos adicionales y describieron las diferencias clínicas y patológicas entre la criptococosis (en esta época conocida como blastomicosis europea), la blastomicosis norteamericana producida por *Blastomyces dermatitidis* y otras infecciones fúngicas con las cuales se podía llegar a confundir por esa época.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Denominaron al microorganismo causal *Torula histolytica* a causa de una supuesta "acción histolítica" del microorganismo en formar quistes en los tejidos, denominando a esta enfermedad como torulosis. Esto no fue sostenido por ninguna regla taxonómica.

Después de evaluar la patogenicidad de 22 cepas de criptococos patógenos, Benham en 1935, sugirió el nombre de *Cryptococcus hominis* anteriormente propuesto por Vuillemin, pero tras un consenso entre los micólogos de la época se acepta que el nombre más válido, sobre la base de uso y prioridad sea *Cryptococcus neoformans*.

A partir de 1950 aumenta el interés sobre las micosis animales, de tal forma que a partir de entonces comienzan a documentarse con mayor frecuencia. Antes de esta fecha sólo se habían documentado casos esporádicos de criptococosis animal. El primero en informar de la existencia de criptococosis en el gato fue Holzworth en 1952. Se trataba de un macho adulto y la necropsia reveló una infección generalizada. Un año más tarde (1953), el mismo autor y Coffin informaron un segundo caso en una hembra adulta castrada. Ambos tenían historias de desórdenes respiratorios crónicos. El primer caso de criptococosis canina lo describieron Seibold y cols. en el mismo año. Wagner y cols. (1968), informaron de un caso de meningoencefalitis canina por *Cyptococcus neoformans* en el cual, la levadura alcanzó el SNC por extensión de una otitis externa.

Pounden y cols. describen los aspectos clínicos de un brote de mamitis criptocócica bovina en 1952 y en el mismo año Innes y cols. muestran que *C. neoformans* es el agente primario de estas mamitis cuya vía de entrada es la intracanalicular, vehiculado en soluciones antibióticas contaminadas.

Barron (1955), observó que al igual que sucede en el caso del ser humano, en los animales la afección del SNC es una manifestación común.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Son muy diversos los sustratos de los cuales se ha aislado a *C. neoformans*. En 1951, Emmons lo aisla del suelo y en 1954, Clark y cols. lo aíslan de manzanas. El papel de las aves como portadoras de hongos patógenos fue establecido por Emmons en 1955, el cual aisló *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* de las excretas de palomas salvajes, *Columba livia*, siendo el primero en establecer la relación existente y actualmente consolidada entre el microorganismo y las heces de paloma.

Estudios posteriores realizados por el propio Emmons y por otros investigadores muestran que las excretas viejas de palomas son la fuente conocida más abundante de dicho microorganismo.

Tras el descubrimiento de Emmons, una larga lista de investigadores siguieron sus pasos, adentrándose así en esta línea de investigación e intentando aislar este hongo levaduriforme de gran importancia en patología humana y veterinaria.

El primer caso de criptococosis humana directamente atribuida a la infección por excretas de palomas fue descrito por Littman en el año 1959. Muchmore y cols. en 1963 citan tres casos más de meningitis en humanos relacionado siempre con aves y dos años más tarde, Procknow y cols. (cit., Littman y Borok, 1968), observaron criptococosis pulmonar en dos pacientes tras la exposición de éstos a heces de palomas presentes en un edificio abandonado.

Si bien es cierto que *C. neoformans* var. *neoformans* ha sido el agente mayormente implicado tanto en patología humana como veterinaria, en los últimos años son muchos los autores que describen a la var. *gattii* en este proceso (Riley y cols., 1992; Bustamante Rufino y Swinne, 1998). El nombre de *C. neoformans* var. *gattii* fue propuesto en 1970 por Vanbreuseghem y Takashio, después de que Gattii y Eeckels (1970) (cit., Sorrell, 2001), aislaran en el LCR de un chico africano con meningitis, una cepa de *C. neoformans* con morfología atípica.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

En España, las primeras descripciones que se tienen afectando a la especie humana son las de Ledesma y Alguacil en 1952 (cit., Hermoso de Mendoza, 1984 A) y en 1959 De Gracia Mira describe el primer caso de criptococosis animal en un brote de mamitis bovina. Aller y cols. (1971), describieron en Extremadura el primer caso de criptococosis pulmonar en cabras. Ya desde 1984 fue conocido el papel de las palomas como portadoras en buche de *C. neoformans* var. *neoformans* y *C. albidus* en nuestro país (Hermoso de Mendoza, 1984 A).

Son muchos los autores que han hecho descripciones de esta patología en España pero todas ellas debidas a *C. neoformans* var. *neoformans*, sin embargo, la demostración de que *C. neoformans var. gattii* existe en nuestro país y que es capaz de ocasionar infecciones graves en animales sin otras patologías previas se debe a Baró y cols. (1998 A), quienes identificaron como pertenecientes al serotipo B, 13 cepas previamente aisladas de tejido pulmonar, hepático y cerebral obtenidos durante la necropsia de 6 cabras, en el curso de varios episodios de neumonía crónica caquectizante que tuvieron lugar entre los años 1990-1994 en la provincia de Cáceres (Extremadura). En España no se ha aislado a partir del medio ambiente, ni se ha descrito ningún caso de criptococosis humana producido por la variedad *gattii* (Colom y cols., 2001).

2.2.2.- ETIOLOGÍA

2.2.2.1.- CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS BASIDIOMICETOS

Cryptococcus neoformans, pertenece a la división Basidiomycota (Hoog y Guarro, 1995; Diamond, 1997; Boekhout y cols., 1998; García Rodríguez y Picazo, 1998; Payá, 2002; Quin y cols., 2002). En la siguiente tabla quedan representados los principales estados anamórficos y teleomórficos del Género. De acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura Botánica, la nomenclatura correcta para *C. neoformans*, es *Filobasidiella neoformans*, sin embargo, *C. neoformans* var. *neoformans* y *C.*

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

neoformans var. *gattii* son los términos más comúmmente usados (Sorrell, 2001).

TELEOMORFO	ANAMORFO PATÓGENO
Filobasidiellla neoformans* var. *neoformans	*C. neoformans* var. *neoformans*
Filobasidiellla neoformans* var. *bacillispora	*C. neoformans* var. *gattii*
Filobasidium uniguttulatum	*Cryptococcus uniguttulatus*
	Cryptococcus albidus
	Cryptococcus laurentii
	Cryptococcus humicolus
	Cryptococcus curvatus

Tabla 2.- Estados anamórficos y teleomórficos del Género *Cryptococcus*.

- LEVADURAS CUYO TELEOMORFO SE ENCUENTRA EN LA DIVISIÓN BASIDIOMYCOTA: ESTADO ANAMÓRFICO

Incluye dos familias con sus correspondientes géneros.

- ✓ Familia *Cryptococcaceae*: Dentro de esta familia existen diez géneros que se caracterizan porque generalmente asimilan el mio-inositol y el D-glucuronato y producen compuestos extracelulares similares al almidón (Boekhout y cols., 1998). El género tipo es *Cryptococcus*, otros géneros son: *Bullera*, *Fellomyces*, *Kockovaella*, *Phaffia*, *Trichosporon*, *Tsuchiyaea*, *Udeniomyces*, *Hyalodendron* y *Moniliella*.

- ✓ Familia *Sporobolomycetaceae*: Incluye cinco géneros: *Bensingtonia*, *Kurtzmanomyces*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* y *Sterigmatomyces*.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

➢ LEVADURAS HETEROBASIDIOMICETAS: ESTADO TELEOMÓRFICO

DIVISIÓN: *BASIDIOMYCOTA*

CLASE: *HETEROBASIDIOMICETOS*

ORDEN: *FILOBASIDIALES*

✓ Familia *Filobasidiaceae*: Con cinco géneros

- *Cystofilobasidium*
- *Filobasidiella*
- *Filobasidium*
- *Mrakia*
- *Xanthophyllomyces*

✓ Familia *Syzygosporaceae*: Incluye dos géneros

- *Christiansenia*
- *Syzygospora*

Dentro de la Familia *Filobasidiaceae* los géneros de interés para nosotros son *Filobasidiella* y *Filobasidium*. En ambos, la reproducción sexual es heterotálica y se produce por conjugación entre las células α y a. Carecen de basidiocarpos. Las basidiosporas en el Género *Filobasidiella* se expanden como largas cadenas uninucleadas, a partir de cuatro puntos del ápice de los basidios (Alexopoulos y Mims, 1985). En el Género *Filobasidium* las basidiosporas sésiles se producen en el apéndice terminal del basidio semejando pétalos que le dan apariencia de flor. En ambos géneros están presentes los *clamp connections*.

Los diferentes ciclos de vida de *Filobasidiella* y *Filobasidium*, quedan expuestos en las Figuras 2 y 3 (Kwon-Chung, 1998 A, B).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

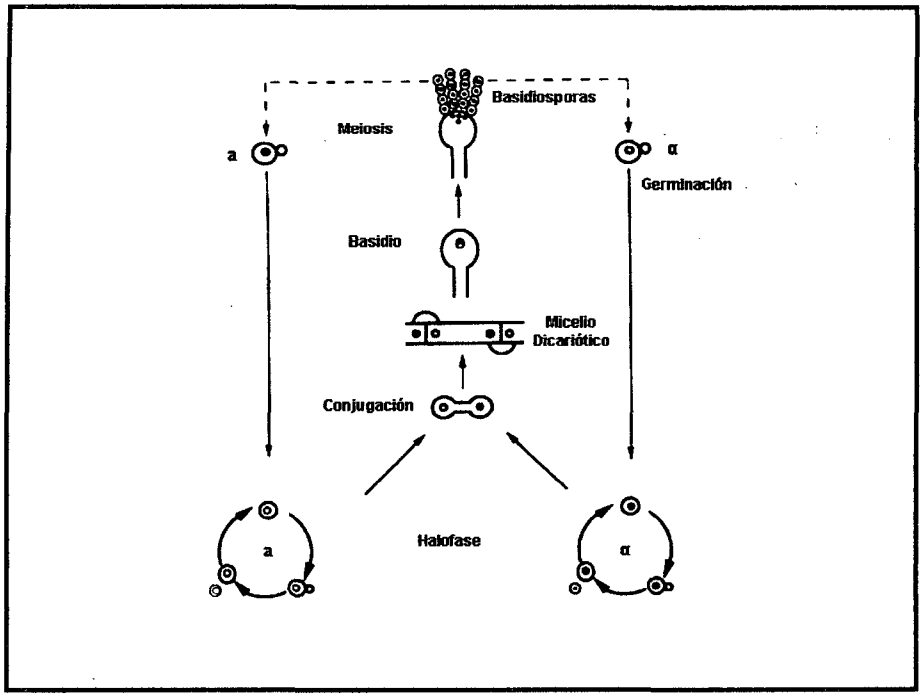


Figura 2.- Ciclo de vida de *Filobasidiella*

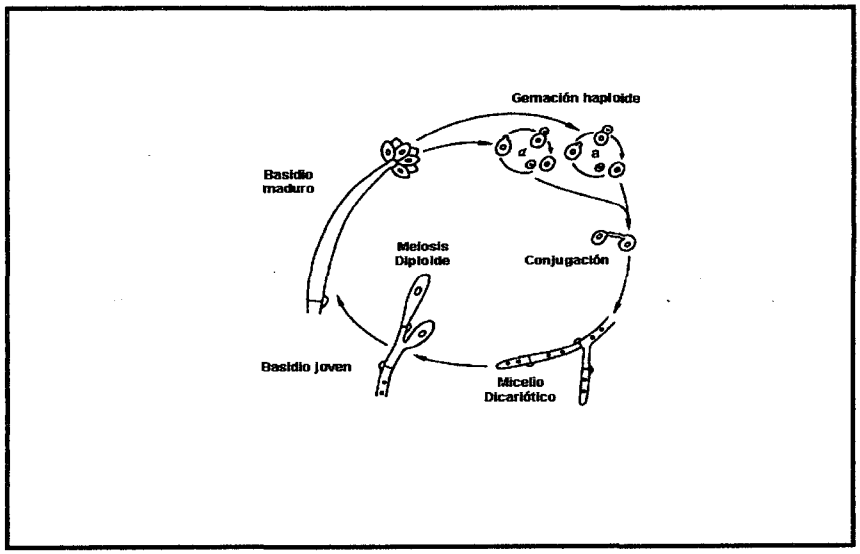


Figura 3.- Ciclo de vida de *Filobasidium*

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

2.2.2.2.- EL GÉNERO *CRYPTOCOCCUS*. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El Género *Cryptococcus* está constituido por distintas especies relacionadas entre sí, si bien la especie descrita en la mayoría de los casos como agente etiológico de criptococosis humana y animal es *C. neoformans*, aunque también se han documentado infecciones por otras especies de criptococos como el *Cryptococcus albidus* y *laurenttii* (Kamalam y cols., 1977; Riley y cols., 1992; Horowitz y cols., 1993). Recientemente, estas especies y *C. humicolus y C. curvatus* han sido aisladas en pacientes HIV positivos (Sugita y cols., 2000; Ikeda y cols., 2000 y 2002).

Cryptococcus neoformans ha recibido diferentes denominaciones a lo largo de la historia, no obstante, la denominación aceptada por los taxónomos actuales es la de *Cryptococcus neoformans* (Tabla 3).

Denominación recibida	Autor
Saccharomyces neoformans	Sanfelice (1894)
Cryptococcus hominis	Vuillemin (1901); Benham (1935)
Torula histolytica	Stoddard y Cutler (1916)
Cryptococcus neoformans	(Sanfelice) Vuillemin 1901

Tabla 3.- Denominaciones más relevantes a lo largo de la historia de *C. neoformans*

Actualmente, el número de especies aceptadas pertenecientes al Género *Cryptococcus* es de 34 (Kurtzman y Fell, 1998; Fell y Statzell-Tallman, 1998).

Cryptococcus aerius; (Saito) Nannizzi (1927).
Cryptococcus albidosimilis; Vishniac & Kurtzman (1992).
Cryptococcus albidus; (Saito) CE. Skinner (1947).
Cryptococcus amylolentus; (Van der Walt, DB. Scott & van der Klift) Golubev (1981).
Cryptococcus antarcticus; Vishniac & Kurtzman (1992).
Cryptococcus aquaticus; (Jones & Slooff) Rodrigues de Miranda & Weijman (1988)..
Cryptococcus ater; (Castellani ex Cooke) Phaff & Fell (Lodder 1970).
Cryptococcus bhutanensis; S. Goto & Sugiyama (1970).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Cryptococcus consortionis; Vishniac (1985).
Cryptococcus curvatus; (Diddens & Lodder) Golubev (1981).
Cryptococcus dimennae; Fell & Phaff (1967).
Cryptococcus feraegula; Saëz & Rodrigues de Miranda (1988).
Cryptococcus flavus; (Saito) Phaff & Fell (1970).
Cryptococcus friedmannii; Vishniac (1985).
Cryptococcus fuscescens; Golubev (1984).
Cryptococcus gastricus; Reiersöl & di Menna (1958).
Cryptococcus gilvescens; Chernov & Bab`eva (1988).
Cryptococcus heveanensis; (Groenewege) Baptist & Kurtzman (1976).
Cryptococcus huempii; (Ramírez & González) Roijmans, van Eijk & Yarrow (1989).
Cryptococcus humicolus; (Daszewska) Golubev (1981).
Cryptococcus hungaricus; (Zsolt) Phaff & Fell (1970).
Cryptococcus kuetzingii; Fell & Phaff (1967).
Cryptococcus laurentii; (Kufferath) CE. Skinner (1950), (cit. Vishniac, 2002).
Cryptococcus luteolus; (Saito) CE. Skinner (1950).
Cryptococcus macerans; (Frederiksen) Phaff & Fell (1970).
Cryptococcus magnus; (Lodder & Kreger- van Rij) Baptist & Kurtzman (1976).
Cryptococcus marinus; (van Uden & Zobell) Golubev (1981).
Cryptococcus neoformans; (Sanfelice) Vuillemin 1901.
Cryptococcus podzolicus; (Bab`eva & Reshetova) Golubev (1981), (cit. Takashima y cols., 2001).
Cryptococcus skinneri; Phaff & do Carmo- Sousa (1962).
Cryptococcus terreus; Di Menna (1954).
Cryptococcus uniguttulatus; (Zach) Phaff & Fell (1970).
Cryptococcus vishniacii; Vishniac & Hempfling (1979).
Cryptococcus yarrowii; A. Fonseca & van Uden (1991).

2.2.2.2.1.-CARACTERES MORFOLÓGICOS Y TINTORIALES DEL GÉNERO *CRYPTOCOCCUS*

Las especies englobadas dentro del Género *Cryptococcus* se caracterizan por presentar blastosporas esferoidales u ovoides y a veces alargadas. Aunque es muy poco común, pueden desarrollar hifas o pseudohifas (Fell y Statzell-Tallman, 1998). No producen artroconidias, aneloconidias ni clamidoconidias. La carencia de artroconidias los diferencia de las especies pertenecientes a los Géneros *Trichosporon* y *Geotrichum* que sí las producen, y el hecho de no formar frecuentemente hifas o pseudohifas los diferencia de *C. albicans* (Larone, 1995).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Estos caracteres así como las características morfológicas de la cápsula las diferencian de otras levaduras de importancia médica (Erke y Schneidau, 1973; Blackstock y Hall, 1982; Mitchell y Perfect, 1995).

Los criptococos se reproducen mediante gemación formando de una a dos células hijas conectadas a la célula madre por una base estrecha. Las yemas pueden separarse cuando son muy pequeñas produciendo una considerable variabilidad en el tamaño de dichas levaduras. Parte de la pared materna queda rota por la yema emergente. Excepcionalmente se observan gemaciones múltiples (Davis, 1984).

Poseen una estructura de pared celular multilaminar, compuesta por dos capas:

- Externa: Electrónicamente transparente
- Lamelar interna: Electrónicamente densa

La cápsula heteropolisacárida formada por D-xylosa, ácido glucurónico y D-manosa, es inmediatamente exterior a la capa transparente, y contiene partículas de 20 nm. Estas partículas, que no se han observado en levaduras no encapsuladas, se excretan a la cápsula cuando los criptococos se cultivan *in vivo* y se cree que intervienen en la formación y el transporte de polisacáridos capsulares (Davis, 1984).

De todas las especies de criptococos, *C. neoformans,* es el agente principalmente implicado en esta enfermedad. Microscópicamente, *Cryptococcus neoformans* es una levadura de morfología redondeada u ovalada de aproximadamente 3-7 µm de diámetro rodeada de una cápsula gruesa de naturaleza mucopolisacárida que varía en tamaño de 1-30 µm. Es considerada un importante factor de virulencia y se le atribuyen diversos efectos sobre la respuesta inmune, principalmente inhibición de la fagocitosis y el estímulo en la producción de linfocitos T supresores. El grosor de la cápsula puede llegar a ser 4 o 5 veces superior al de la levadura (Miró y cols., 1995; Argüero y cols., 1999; Nelson y Couto, 2000).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

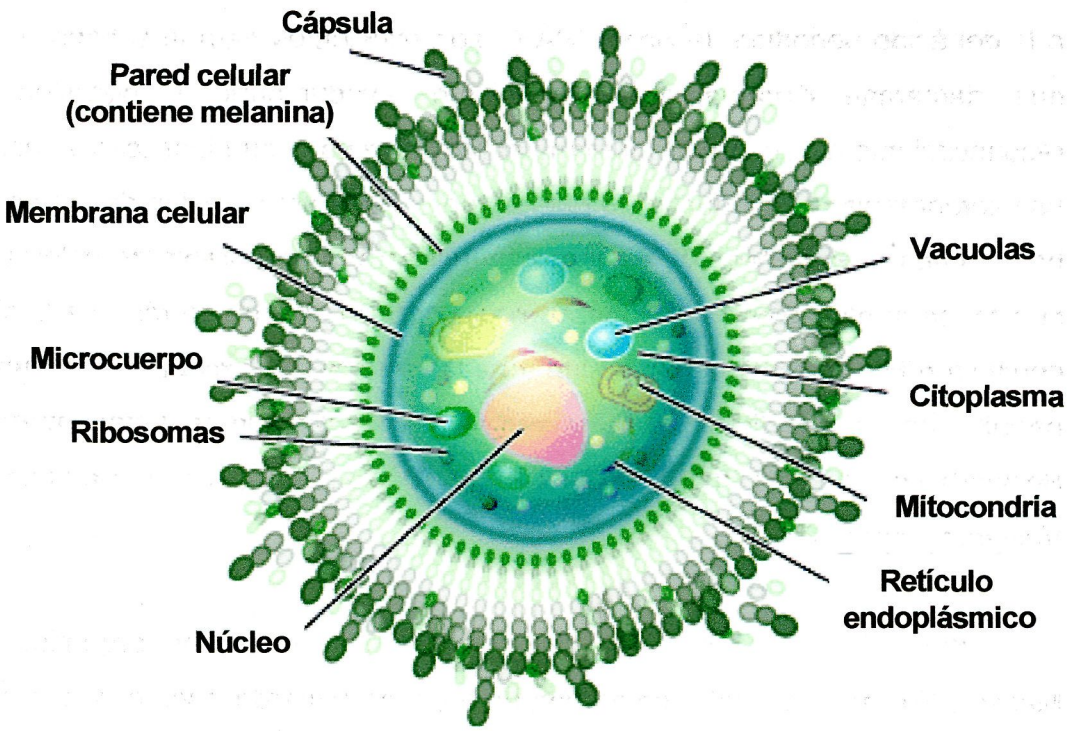


Figura 4.- Representación esquemática de una célula de *C. neoformans*. Obsérvese la melanina contenida en la pared celular.

Cryptococcus neoformans puede ser distinguido de otros hongos levaduriformes y de los artefactos mediante distintas tinciones. *Cryptococcus neoformans* se tiñe fuertemente por el método de Gram. La célula retiene el cristal violeta y su cápsula queda ligeramente teñida con safranina. Esto se observa especialmente en cultivos jóvenes (Euzeby, 1969; Davis, 1984). La tinción de mucicarmín de Mayer, colorea selectivamente la cápsula criptocócica de rojo a rosado, pero no tiñe otros hongos que tienen características morfológicas similares. Este colorante diferencia fácilmente a *C. neoformans* de *Histoplasma capsulatum* ya que éste último no posee el material capsular mucinoso que en el caso de *C. neoformans* se tiñe de rosa a rojo. En cortes histológicos, el microorganismo casi siempre es incoloro y difícil de ver con las tinciones de rutina de hematoxilina-eosina en la que la pared celular y en algunas ocasiones su contenido son visibles, pero la cápsula permanece sin teñirse dando el efecto de un halo claro alrededor de la célula.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Otras tinciones usadas en histopatología, como la de metenamina plata o la del ácido periódico de Schiff (PAS), son excelentes para la selección ya que demarcan claramente al organismo levaduriforme y permiten el reconocimiento de su tamaño y forma característicos, y su identificación como un microorganismo levaduriforme que se reproduce por formación de brotes de base angosta. Permiten visualizar la cápsula como una aureola no coloreada que rodea la blastospora redonda en gemación, intensamente roja. La tinción negativa o tinción de tinta china, tiñe toda la preparación excepto la cápsula y permite hacer un diagnóstico presuntivo de criptococosis (Jungerman y Schwartzman, 1977; Diamond, 1997; Puras y cols., 2000; Martín Mazuelos y Valverde Conde, 2001).

Kwon-Chung y cols. recomiendan en 1981 la tinción argéntica de Masson Fontana, que tiñe selectivamente de color pardo oscuro o negro la pared de la célula. Se utiliza como tinción específica para el diagnóstico histológico de criptococosis, y puede ser combinada con tinción capsular utilizando mucicarmín o azul alciano.

2.2.2.2.2.- DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES Y VARIEDADES

Ya por los años 50, Evans y Kessel, determinaron tres serotipos para las cepas de *Cryptococcus neoformans* en base a reacciones de aglutinación, precipitación y reacciones capsulares. Estos eran el A, B y C. En 1963, Tsuchiya y cols., analizaron varias especies de criptococos y definieron sus patrones antigénicos, sin embargo, no definieron completamente las relaciones antigénicas entre los serotipos de *C. neoformans* y otras especies de criptococos. En 1968, Wilson y cols. (cit., Ikeda y cols., 1982) añadieron un cuarto serotipo, el D.

Tradicionalmente y hasta hace poco tiempo, se reconocían dos variedades y cuatro serotipos: *C. neoformans* var. *neoformans* y *C. neoformans* var. *gattii*. Los serotipos A y D fueron incluidos en la variedad *neoformans*, mientras que los serotipos B y C fueron incluidos en la variedad *gattii* (Kwon-Chung, 1982 A). Sin embargo, además de las diferencias

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

fenotípicas existentes, los estudios moleculares realizados por Franzot y cols. en 1999 han detectado variaciones fenotípicas y genéticas significativas entre los serotipos A y D, hecho por el cual, han propuesto una nueva variedad denominada *C. neoformans* var. *grubii*.

Por lo tanto, la clasificación actual sería la siguiente: *C. neoformans* var. *grubii* (serotipo A); *C. neoformans* var. *neoformans* (serotipo D); *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C); y el serotipo híbrido AD relacionado con la variedad *neoformans* (Casadevall y Perfect, 1998). Queda así encuadrado dentro de tres variedades y cinco serotipos (A, D, A/D, B y C), aunque *C. neoformans* var. *grubii* no está completamente aceptada (Ordóñez y Castañeda, 2001).

Estas variedades y sus correspondientes serotipos varían en sus características morfológicas y bioquímicas. Estas variaciones quedan reflejadas en la Tabla 4:

Característica	*C. neoformans* var. *neoformans*	*C. neoformans* var. *gattii*	Referencia
Estado perfecto	*Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*	*Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora*	Kwon-Chung, 1975, 1976, 1982(C)
Cápsula	Si	Si	
Producción fenoloxidasa	Si	Si	
Asimilación malato	No	Si	Mitchell y Perfect, 1995
Susceptibilidad a la canavanina	Si	No	
Asimilación de glicina (% de cepas)	10-20	100	
Serotipos	A, D y AD	B y C	Bennett y cols., 1984; Casadevall y Perfect, 1998.
Mating type	a and α	a and α	Casadevall y Perfect, 1998; Kwon-Chung, 1975, 1976; Madrenys y cols., 1993.
CGB medio	No crece	Crece	Kwon-Chung, 1982(C)
GCP medio	No crece	Crece	Salkin y Hurd, 1982
CDBT medio	Crece (cambio color naranja)	Crece (cambio de color a azul verdoso)	Irokanulo y cols., 1994

Tabla 4.- Esquema de las principales características etio-epidemiológicas de *Cryptococcus neoformans*

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

2.2.2.2.3.- CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL GÉNERO *CRYPTOCOCCUS*

Bioquímicamente, los miembros del Género *Cryptococcus* son incapaces de fermentar los azúcares, pero asimilan el inositol y producen ureasa. Tienen metabolismo estrictamente oxidativo y utilizan varios hidratos de carbono. La utilización del inositol y la habitual ausencia de pigmentos carotenoides distinguen a este género de *Rhodotorula* spp. Ambos géneros pueden tener cápsulas, producir compuestos similares al almidón y son ureasa positivos (Lennette y cols., 1987).

La utilización de azúcares por las distintas especies de criptococos varía ampliamente de una cepa a otra. Todas las especies utilizan el D-glucuronato. Presentan Coenzima Q-9 y Q-10. Además de las diferencias existentes en cuanto a la forma de asimilar o no los azúcares por parte de las diferentes especies que constituyen este amplio género, la utilización del nitrato potásico (KNO_3) y la producción de fenoloxidasa son también criterios para su diferenciación (Larone, 1995; Fell y Statzell-Talman, 1998).

2.2.2.2.3.1.- TEST DE UREASA

La ureasa es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de la urea a amonio y carbamatos. Algunos microorganismos, como *C. neoformans*, son capaces de hidrolizar la urea mediante la actividad de esta enzima (Cox y cols., 2000). Todas las especies pertenecientes al Género *Cryptococcus* y *Rhodotorula* y algunas especies del género *Trichosporon* muestran esta reacción; en realidad todos los heterobasidiomicetos la muestran. Las especies del género *Candida* son ureasa negativas aunque cepas ocasionales de *C. krusei* son ureasa-positivas.

La actividad de esta enzima se puede detectar en el medio de Agar Urea de Christensen. El cambio del color ambarino del indicador rojo fenol del medio a rosado o rojo denota una reacción positiva debida a la

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

alcalinización del medio mediante la producción de amoniaco con la molécula dividida de urea (Canteros y cols., 1996; Kurtzman y Fell, 1998).

Generalmente, la gran mayoría de los aislamientos clínicos pertenecientes a *C. neoformans* son activos productores de ureasa (Cox y cols., 2000), aunque se han descrito cepas ureasa negativas capaces de producir incluso, cuadros de infección criptocócica diseminada en pacientes con SIDA (Ruane y cols., 1988; Li y cols., 1993 A; Bava y cols., 1993; Fortún, 1995).

En ensayos *in vitro*, se ha observado que cepas ureasa negativas conservan intactas otras propiedades de patogenicidad (crecimiento a 37ºC, producción de melanina y la talla de la cápsula) (Cox y cols., 2000).

La actividad ureasa de *C. neoformans* var. *gattii* es inhibida por el ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), sin embargo, la ureasa de *C. neoformans* var. *neoformans* es resistente al EDTA (Diamond, 1997).

2.2.2.2.3.2.- TESTS DE ASIMILACIÓN

Las pruebas que determinan la capacidad de una levadura para utilizar un hidrato de carbono como única fuente de carbono en un medio químicamente definido, son desde hace mucho tiempo un importante instrumento para la identificación final de éstas.

Las levaduras del Género *Cryptococcus* se caracterizan por no fermentar los azúcares, hidrolizar el almidón y asimilar el inositol como única fuente de carbono. Aunque no sea lo más habitual, se han descrito cepas de *Cryptococcus neoformans* incapaces de asimilar el inositol (Aeharn, 1998; Uno y cols., 2001), no obstante, aunque la mayoría de las especies englobadas en este género lo asimilen, existen varias que carecen de tal capacidad, tales como: *C. aquaticus*, *C. bhutanensis*, *C. consortionis*, *C. friedmannii*, *C. huempii* y *C. vishniacii* (Fell y Statzell-Tallman, 1998).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

C. neoformans es incapaz de asimilar la lactosa. La glucosa es asimilada pero no fermentada por el hongo. El dulcitol, el inositol, la maltosa, la galactosa y la sacarosa son asimiladas, pero la lactosa y el nitrato no lo son (Jennings y cols., 1968). El hecho de que no pueda asimilar el nitrógeno de los nitratos lo diferencia de *C. albidus* que sí lo asimila (Fell y Statzell-Tallman, 1998). Las diferencias entre las especies se basa en la asimilación de carbohidratos y KNO_3 tal como muestra la Tabla 5:

Especie	KNO_3	Ino	Sac	Lac	Mel	Cel	Raf	Gal
C.neoformans	-	+	+	-	-	+/w	+/w	+
C. uniguttulatus	-	+	+	-	-	-	+	v
C. laurentii	-	+	+	+	+	+	+	+
C.albidus	+	+	+	v	v	+	+	v
C.curvatus	-	+/w	n	+	-	+	+	+

Tabla 5.- Características de asimilación de las especies de *Cryptococcus* comúmmente patógenos (Kurtzman y Fell, 1998 y García Rodríguez y Picazo, 1998)
+/w.- positivo o débil; v: variable; n: no datos

C. neoformans puede adquirir nitrógeno de peptonas, urea y creatinina pero no es capaz de utilizar el de los nitratos ni el de la creatina (Davis, 1984). El hecho de que muchas cepas de *C. neoformans* pueden utilizar creatinina como fuente de nitrógeno, puede explicar parcialmente el crecimiento del microorganismo en heces de aves ricas en creatinina (Diamond, 1997). Además, *C. neoformans* var. *gattii* es menos tolerante que la variedad *neoformans* a altas concentraciones de creatinina (Baró y cols., 1998 A).

Además de los tests de asimilación que diferencian a las especies entre sí, existen pruebas que nos permiten separar las dos variedades existentes de *C. neoformans*. Los tests de asimilación de los ácidos L-málico, fumárico y succínico, permiten diferenciar los serotipos B y C de los serotipos A y D. En este sentido, Bennett y cols. (1978) establecen unas diferencias bioquímicas entre los serotipos de *C. neoformans*, basándose en

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

la más rápida asimilación del ácido málico por los serotipos B y C sobre los serotipos A y D.

C. neoformans var. *neoformans*, a diferencia de *C. neoformans* var. *gattii,* es sensible a la L-canavanina y a bajas concentraciones de cicloheximida; es incapaz de utilizar la glicina como única fuente de carbono y nitrógeno e incapaz de utilizar la D-prolina y el D-triptófano como fuentes nitrogenadas (De Melo y cols., 1993; Mitchell y Perfect, 1995; Sorrell, 2001). Por esta razón, sólo *C. neoformans* var. *gattii* crece sobre el medio CGB. La alcalinización del medio resulta del amonio liberado tras la degradación de la glicina produciéndose un color azul (Kurtzman y Fell, 1998).

La L-canavanina actúa como un inhibidor metabólico de aquellas enzimas que contienen L-arginina, altera sus estructuras terciarias y cuaternarias, y por consiguiente la actividad biológica de tales proteínas. De esta forma, la L-canavanina resulta tóxica para una gran variedad de microorganismos. Pero la resistencia de *C. neoformans* var. *gattii* se ha atribuido a la presencia de un sistema capaz de degradar la L-canavanina y convertirla en compuestos no tóxicos (Polacheck y Kwon-Chung, 1986; Fernández Andreu y cols., 1998).

Sin embargo, en 1998, Nakamura y cols. observaron que 2 cepas de *Cryptococcus neoformans* pertenecientes al serotipo A y una perteneciente al D, aisladas de heces de palomas, eran capaces de crecer en el medio CGB, de tal forma que muestran la resistencia de las tres cepas pertenecientes a la variedad *neoformans* en dicho medio.

2.2.2.2.3.3.- ACTIVIDAD FENOLOXIDASA Y PIGMENTACIÓN

La habilidad para sintetizar pigmentos de coloración marronácea-negruzca sobre medios que contengan compuestos difenólicos es una característica que diferencia a los aislamientos patógenos de *Cryptococcus neoformans* de los no patógenos y de otras especies de criptococos (Buchanan y Murphy, 1998; Canelo y Casquero, 2000).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Este pigmento, descrito por primera vez por Staib en 1962, es un compuesto similar a la melanina producido por cepas de *Cryptococcus neoformans* con actividad fenoloxidasa. En 1962 Staib describió la producción de melanina *in vitro* por parte de *C. neoformans* y asoció este fenómeno con la virulencia del microorganismo.

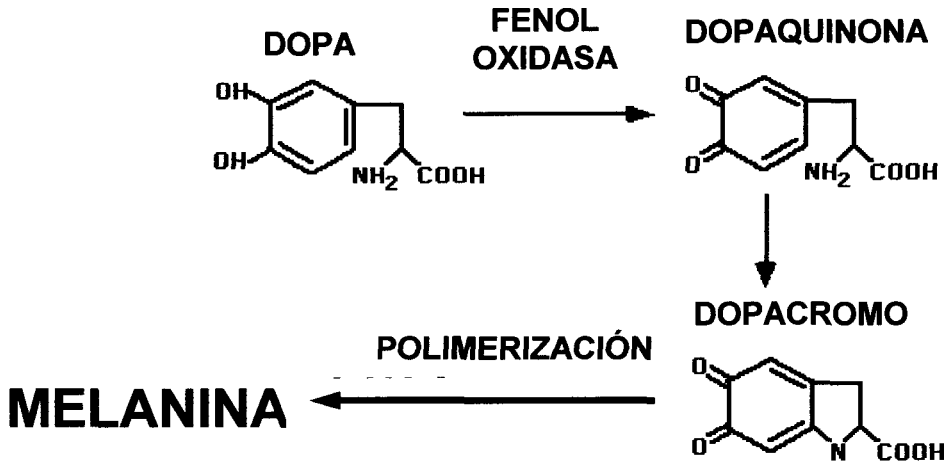


Figura 5.- Melanogénesis. Buchanan y Murphy, 1998

La producción de melanina a partir de L-Dopa es realizada por la enzima difenoloxidasa, que por oxidación convierte las catecolaminas (difenoles) tales como la 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) en dopaquinona, siendo este el paso limitante; puesto que presumiblemente los siguientes pasos en la vía, tales como el rearreglo de dopaquinona a dopacromo y finalmente la autopolimerización a melaninas, son espontáneas (Williamson, 1994). La melanina es un polímero que se deposita en la pared celular y que contribuye a la virulencia (Nosanchuk y Casadevall, 2003).

Mediante estudios con microscopía de transmisión electrónica se determinó que la melanina de *C. neoformans* parece estar concentrada en el lado interno de la pared celular, localización que le permitiría interactuar con sustancias del lado extracelular y evitar su penetración dentro de la levadura (Wang y cols., 1995).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

En el año 2002, Vidotto y cols. observaron que un aumento en la concentración de K^+ inhibe la actividad de la enzima fenoloxidasa tanto en las cepas de origen humano como en las de origen aviar. Sin embargo, los cationes Fe^{3+} y Cu^{2+} aumentan la actividad fenoloxidasa de *Cryptococcus neoformans.*

Esta enzima permite la producción de melanina a partir de los precursores de las catecolaminas, siendo inhibida en las células de los mamíferos por las concentraciones bajas de glucosa. Sin embargo, la fenoloxidasa de *C. neoformans* es dependiente del hierro, lo cual le permite ser activa en condiciones bajas de glucosa, siendo por tanto el encéfalo el marco ideal de actuación (Miró y cols., 1995).

Estudios recientes realizados por Ikeda y cols. (2002) confirman que no sólo *C. neoformans* produce fenoloxidasa, otras especies de criptococos tales como *C. albidus*, *C. laurentii* y *C. curvatus,* tienen potencial para expresar esta enzima y por lo tanto sintetizar melanina aunque la actividad es menor que la de *C. neoformans.*

2.2.2.2.3.4.- EL SISTEMA COENZIMA Q

Esta coenzima aparece generalmente en levaduras ureasa positivas con gran contenido de G+C (Davis, 1984). Estudios detallados de las coenzimas de benzoquinona (coenzima Q_n) se han usado como claves taxonómicas. El tipo de coenzima, se clasifica según el número de unidades de isopreno unidas al núcleo de benzoquinona (Yamada y Kondo, 1973; Fell y Statzell-Tallman, 1998; Kwon-Chung, 1998 A, B).

El tipo de coenzima Q predominante en el Género *Cryptococcus* es la Q_{10}, no obstante algunas especies contienen Q_9 (*C. dimennae*, *C. gilvescens*, *C. humicolus* y *C. uniguttulatus*) o Q_8 (*C. macerans*). *Candida* spp. suelen presentar Q_9 y algunas pocas Q_6, Q_7 y Q_8 (Fell y Statzell-Tallman, 1998).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

2.2.2.3.- FORMAS PERFECTAS DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Los hongos se reproducen mediante mecanismos sexuales y asexuales. Asexual es el proceso de reproducción que no implica la unión de dos células o individuos. Este tipo de reproducción tiene más importancia que la sexual para la propagación y supervivencia de la especie, ya que permite la producción de nuevos individuos en grandes cantidades, siendo un proceso que se repite constantemente en la vida de un individuo. La reproducción sexual, sin embargo, es el proceso de formación de nuevos individuos que implica la unión de dos células compatibles.

Según la compatibilidad de este cruzamiento, los hongos pueden ser homotálicos o heterotálicos. *Cryptococcus neoformans* se comporta como un hongo heterotálico (cada talo es sexualmente autoestéril y requiere otro talo compatible para reproducirse sexualmente).

En la naturaleza encontramos dos tipos de aislamientos: la variedad α y la variedad a; más del 95% de los aislamientos clínicos y ambientales corresponden a la variedad α, la cual tiene mayor virulencia para los ratones inoculados experimentalmente (Kwon-Chung y cols., 1992; Madrenys, 1993; Cox y cols., 2000).

El estado perfecto o teleomórfico de *Cryptococcus neoformans* se denomina *Filobasidiella neoformans*. *In vivo* y en el reservorio telúrico se encuentra en forma levaduriforme, sin embargo, la forma perfecta sólo se ha obtenido *in vitro* (Ellis y Pfeiffer, 1990 B; Levitz, 1991). En su forma sexual o perfecta, *Filobasidiella neoformans*, presenta hifas dicarióticas delgadas con conexiones en gancho (*clamp connections)* y basidios subglobosos localizados en el ápice de las hifas. Los basidios miden de 10 a 70 µm. de largo por 2.5 a 3.5 µm. de ancho; tienen 4 hileras de basidiosporas terminales sésiles y encadenadas, marcándose diferencias en la morfología de dichas basidiosporas (Ordóñez y Castañeda, 1992; Kwon-Chung 1998 A).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

- *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*: las basidiosporas pueden ser esféricas, oblongadas o cilíndricas y finamente rugosas.
- *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora:* produce basidiosporas lisas, con forma bacilar, con o sin curvatura.

Las cepas apropiadas de los serotipos A y D, que incluyen la gran mayoría de los aislamientos clínicos de *C. neoformans* var. *neoformans*, pueden ser apareadas para producir el estado perfecto o sexual, *Fillobasidiella neoformans* var. *neoformans*. Los serotipos B y C se clasifican como *C. neoformans* var. *gattii.* Las cepas con los serotipos B y C forman un estado perfecto distinto, denominado *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora*, aunque se ha demostrado que algunas cepas de los serotipos A y D pueden aparearse con B y C, pero con una tasa de supervivencia más baja (Kwon-Chung, 1975, 1976; Fernández Andreu y cols., 1998).

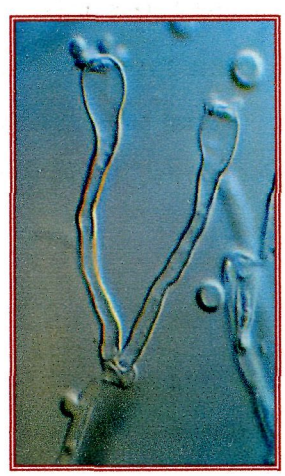


Figura 6.- *Filobasidiella neoformans* (W. Schell)

2.2.2.4.- RESISTENCIA A LOS AGENTES FÍSICOS Y QUÍMICOS

A.- AGENTES FÍSICOS

La temperatura óptima de crecimiento del Género *Cryptococcus* varía según la especie. *C. neoformans* crece a 37ºC mientras que la mayoría de las especies no patógenas pertenecientes a este género no lo hacen.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Saez en 1978 y Bohm en el año 1980, muestran la existencia de cepas de *C. neoformans* capaces de multiplicarse a 41 y a 43ºC e incluso la capacidad de sobrevivir durante días a 45-46ºC. No obstante la temperatura óptima de crecimiento para ambas variedades de *C. neoformans* es de 32ºC. Debido a esta causa y a que la variedad *gattii* crece más lentamente a 37ºC y por lo tanto es más sensible a esta temperatura que la variedad *neoformans*, su aislamiento primario se debe realizar a una temperatura comprendida entre los 30-35ºC (Baró y cols., 1998 A; Fell y Statzell-Tallman, 1998).

No obstante, algunas cepas de otras especies son capaces de tolerar la temperatura de 37ºC, tales como: *C. laurentii*, *C. albidus* y *C. terreus* (Lennette y cols., 1987; Fell y Statzell-Tallman, 1998). Por otra parte, Saez (1978), describe cepas de *C. luteolus* con crecimiento a 36ºC, de *C. uniguttulatus* a 37ºC y de *C. laurentii* a 38ºC. Por otro lado, *C. neoformans* resiste al menos 5 años a –18ºC (Hermoso de Mendoza, 1984 A). La exposición directa a la luz solar destruye al hongo o inhibe su crecimiento. Su permanencia en excretas de palomas a la sombra y desecadas, puede ser de hasta más de 2 años (Davis, 1984; Braude y cols., 1984; Rubio, 1998).

La humedad relativa disminuye la supervivencia de *C. neoformans*, pues acelera el fenómeno de la putrefacción con la consiguiente liberación de amoniaco, aumento del pH y de la temperatura, condiciones todas ellas disgenésicas para el desarrollo de *C. neoformans* (Ishaq y cols., 1968). También permite la proliferación en las heces de las amebas *Acanthamoeba polyphaga*, que fagocitan y destruyen al criptocococo.

Respecto al pH, *C. neoformans* es sensible a los pHs alcalinos, incluso en medios que contengan extractos de heces de palomo, el pH óptimo para su crecimiento está comprendido entre 6.2-6.9; sin embargo, la tolerancia a pH ácido es mucho mayor (Hermoso de Mendoza, 1984 A).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

B.- AGENTES QUÍMICOS

C. neoformans es sensible a la acción de los desinfectantes habituales. Es susceptible al hipoclorito sódico al 1% (lejía comercial al 20%), al yodo y yoduros, a compuestos fenólicos, glutaraldehido, formaldehídos etc. La limpieza repetida de los hábitats de las palomas a través de la aplicación de soluciones de cal hidratada diluida en agua (40g/l) más 1.5g/l de NaOH, puede reducir la cantidad de organismos en las áreas contaminadas. La solución debe aplicarse a una proporción de 1.36l/m^2 (Medleau y Barsanti, 1993; Nelson y Couto, 2000).

Las altas concentraciones de amonio en las excretas frescas tienen un poder inhibitorio sobre el crecimiento de los criptococos, a diferencia de lo que sucede cuando estas heces están secas. En este sustrato seco, desfavorable para la mayoría de los microorganismos nos podemos encontrar una gran cantidad de formas levaduriformes (Sorrell y Ellis, 1997). Aunque *C. neoformans* var. *gattii* pueda utilizar la creatinina, es menos tolerante que la variedad *neoformans* a altas concentraciones de ésta (Baró y cols, 1998 A; Sorrell, 2001).

2.2.2.5.- MEDIOS DE CULTIVO

Cryptococcus spp. se caracteriza por dar colonias que pueden ir desde un color blanco a crema sobre medios sólidos, no obstante, algunas cepas pueden producir pigmentación roja, amarilla o marronácea. *C. neoformans* es poco exigente y puede ser aislado en la mayoría de los medios de rutina tanto micológicos como bacteriológicos (Agar Glucosado de Sabouraud, Agar Extracto de malta, Agar Sangre, Agar Chocolate etc), produciendo colonias de 1 a 3 mm de diámetro en una semana (Kenneth, 1994; Mitchell y Perfect, 1995; Fell y Statzell-Tallman, 1998). A temperatura ambiente y a 37ºC en Agar Glucosado de Sabouraud, pueden desarrollar en 36-72 horas colonias mucoides, al principio blancas y de consistencia cremosa para irse tornando marronáceas a medida que envejecen. El tamaño de la cápsula y el tiempo de incubación van a determinar la aparición

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

de colonias más o menos mucoides (Jungerman y Schwartzman, 1977; García Rodríguez y Picazo, 1998). En Agar Extracto de malta, *C. neoformans* origina colonias redondas, de aspecto mucoso, de un color que varía de crema a amarillo-marrón (Payá, 2002). Su crecimiento se puede ver inhibido cuando al medio se le incorpora cicloheximida (actidiona), razón por la cual su primoaislamiento debería realizarse en medios sin esta sustancia (Diamond, 1997). *C. neoformans* var. *gattii* es resistente a una concentración de 1.6 μg/ml, concentración que inhibe el crecimiento de la variedad *neoformans* (Kurtzman y Fell, 1998; Sorrell, 2001).

El medio de Agar Semilla de Niger (*Guizotia abyssinica*), descrito por Staib en 1962 es uno de los medios más usados para la detección de *Cryptococcus neoformans.* Gracias a la enzima fenoloxidasa que produce esta especie levaduriforme y a los sustratos que posee dicho medio (difenoles, aminofenoles y diaminobencenos), el crecimiento de *C. neoformans*, se detecta a través del desarrollo de colonias color café o pardo sobre dicho agar. Este excelente medio diferencial permite el aislamiento primario y la separación inmediata e identificación presuntiva de *C. neoformans*, aún cuando se presenten colonias de otros hongos, incluso otras especies pertenecientes al Género *Cryptococcus* incapaces de producir dicha coloración. Fue modificado posteriormente por otros investigadores con la finalidad de hacerlo más selectivo o más definido químicamente.

Entre los más conocidos y usados se encuentran el medio de Shields y Ajello (1966) con creatinina y extracto de *Guizotia abyssinica*; el de Chaskes y Tyndall (1978) a base de DOPA, el de TOC (Tween-Oxgall-Cafeico) de Fleming y cols. (1977) que permite distinguir entre *C. neoformans* y *C. albicans* y el medio diferencial Agar semilla de girasol o medio de Pal, excelente para el estudio de materiales naturales (Pal y Baxter, 1985; Pal, 1997). La visualización del color marrón oscuro se observa en un período entre 1-5 días, no obstante esto va a depender del medio usado y del aislamiento, ya que algunas cepas pueden requerir incluso hasta 8 días para mostrar esta pigmentación característica sobre el

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Agar Semilla de niger (Kwon-Chung, 1998 A). Hermoso de Mendoza y cols. muestran en 1987, la eficacia del medio de TOC en el aislamiento y perfecta diferenciación de todas las cepas de *C. neoformans* con respecto a otras especies levaduriformes, en tan sólo 48 y 96 horas respectivamente.

Debido a que la identificación de las variedades de *C. neoformans* puede convertirse en una útil herramienta para conocer las posibles fuentes de infección, varios autores elaboraron una serie de medios para tal fin. Salkin y Hurd (1982), describen el uso del Agar Glicina-Cicloheximida-Rojo fenol (GCP) para la diferenciación de los cultivos de cepas de *C. neoformans* en sus dos variedades. Kwon-Chung y cols. (1982 A), propusieron un medio de cultivo que permitía la diferenciación de ambas variedades con alta especificidad; se basaba en la capacidad de la variedad *gattii* de resistir y crecer en presencia de L-canavanina y utilizar la glicina como una única fuente de carbono. Desde entonces, este medio de cultivo, conocido como CGB (Canavanina-Glicina-Azul bromotimol), ha sido empleado por diferentes autores para la diferenciación sencilla y específica de las 2 variedades (Kwon-Chung y cols., 1994; Speed y Dunt, 1995; Ellis y cols., 1996).

Kwon-Chung y cols. (1982 A) probaron en los medios CGB, GCP y CDB (Ceatinina-Dextrosa-Azul de bromotimol) un total de 213 cepas de *C. neoformans,* concluyendo que el medio CGB fue superior al GCP y CDB en el quinto día de incubación y el 100% de *C. neoformans* var. *neoformans* pudo diferenciarse de la variedad *gattii.*

El medio CGB emplea glicina como única fuente de carbono y nitrógeno; la sustancia que ayuda a la tipificación de ambas variedades es el sulfato de L-canavanina y el indicador de pH es el azul de bromotimol sódico. La diferenciación bioquímica de *C. neoformans* por variedades mediante el uso del medio CGB se debe a que de un 28 a 33% de las cepas serotipo A es sensible a concentraciones≤5mg/l de canavanina y el 100% del serotipo D es sensible a esta concentración. De los aislamientos del serotipo A resistentes a la canavanina, de un 10 a 20% son capaces de

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

asimilar la glicina; sin embargo, éstos no crecen cuando son cultivados sobre el medio que contiene ambos compuestos.

Solamente el 11% de los aislamientos pertenecientes al serotipo D utilizan la glicina, pero todos son sensibles a la canavanina; en cambio, el 100% de las cepas de *C. neoformans* var. *gattii* (serotipos B y C) resisten la canavanina hasta o excediendo los 960 mg/L y asimilan la glicina (concentración de canavanina en el medio CGB:30mg/l). Tras el metabolismo de este componente, se forma amonio, el cual alcaliniza el medio haciendo virar el indicador hacia un color azul cobalto (Canelo y cols., 1999).

2.2.3.- EPIDEMIOLOGÍA

2.2.3.1.- ESPECIES SENSIBLES Y RECEPTIVAS A *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* E IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA

Existe multitud de especies sensibles a esta enfermedad. Se han descrito casos afectando tanto al hombre como a los animales domésticos: gatos (Pal, 1991), perros (Corazza y cols., 1991; Acosta y cols., 1999), caballos (Riley y cols., 1992; Chandna y cols., 1992), cabras (Aller y cols., 1971; Hermoso de Mendoza y cols., 1991, 1994) ovejas, vacas (De Gracia Mira, 1959; Chapman y cols., 1990; Faggi y cols., 1993), etc. Las especies salvajes son también susceptibles de enfermar, tal como sucede con los koalas en Australia (Walker y cols., 1995; Malik y cols., 1995), hurones, delfines (Malik y cols., 2002), serpientes (McNamara y cols., 1994), entre otros.

Resultan especialmente sensibles al padecimiento de esta patología los animales y humanos que presentan inmunodepresión, observándose en el caso del hombre una mayor casuística en individuos afectados por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), receptores de trasplantes de órganos, afectos de linfomas y sarcoidosis entre otras patologías (Speed y Dunt, 1995; Abadi y cols., 1999). Asímismo, en éste último, ha sido

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

descrita afectando a individuos de todas las edades; no obstante, se presenta con mayor frecuencia en adultos jóvenes y personas de mediana edad, afectando de forma especial a individuos del sexo masculino (Rozembaum y Goncalves, 1994). Se han realizado estudios serológicos en individuos aparentemente sanos que demuestran la presencia de anticuerpos contra el polisacárido capsular de *C. neoformans* en un 5% y un 69%, en niños y adultos respectivamente. Quizás la causa de esto se deba a la menor exposición de los primeros a las fuentes ambientales (Casadevall y Perfect, 1998). El grado de exposición de la población en general es desconocido, ya que no existen pruebas intradérmicas desarrolladas para estudios de tamizaje; sin embargo, con la búsqueda de anticuerpos se ha encontrado muchos individuos saludables que presentan inmunoglobulina G específica contra el *Cryptococcus* (Pérez Cárdenas, 2003).

Kelley y Mosier, como Schwarz y Kauffman en 1977 y Glunder en 1989 opinaron que un alto grado de contaminación ambiental por *Cryptococcus neoformans*, podría convertirse en un peligro para la salud pública y más concretamente para las personas dedicadas al cuidado, cría y limpieza de las palomas y/o palomares, así como para aquellos que han de remover la tierra contaminada con heces de paloma. Al respecto, se han realizado estudios seroepidemiológicos en la especie humana y mientras que la enfermedad clínica no es común, la infección subclínica autolimitante es mucho más prevalente. Un 20% de la población adulta presenta anticuerpos contra los antígenos capsulares de *C. neoformans* (Malik y cols., 1997), sin embargo, ya Walter y Atchison en 1966 y Fink y cols. en 1968 (cit., Littman y Borok, 1968 y cit., Mitchell y Perfect, 1995), observaron que el nivel de anticuerpos en el suero de los criadores de palomas era significativamente mayor al presente en el grupo control.

Speed y Dunt en 1995, observaron una asociación entre el estado inmune usual del hospedador infectado y la variedad de *C. neoformans* implicada en el proceso. Todos los pacientes que tuvieron infección por *C. neoformans* var. *gattii* eran personas aparentemente sanas, de tal forma que dicha variedad muestra una marcada predilección por el huésped

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

inmunocompetente y el 90% de los infectados por *C. neoformans* var. *neoformans* estaban inmunodeprimidos. Estos mismos autores, señalan el verdadero carácter patógeno de *C. neoformans* var. *gattii*, más que como un patógeno oportunista.

Entre las especies domésticas anteriormente citadas, el gato y el perro resultan especialmente sensibles. Al contrario de lo que sucede en otras micosis sistémicas, la criptococosis en gatos se presenta con mayor casuística que en perros (Medleau y Barsanti, 1993).

En el gato, la edad, raza o sexo no actúan como factores predisponentes de enfermedad, si bien en la mayoría de los estudios realizados, han estado especialmente representados los gatos machos, de las razas siamés y abisinio y el límite de edad ha estado comprendido entre los 6 meses y los 16 años de edad (Medleau y Barsanti, 1993; Ramos Vara y cols., 1994; Davies y Troy, 1996; Gerds-Grogan y Dayrell-Hart, 1997; Nelson y Couto, 2000).

Algunas razas caninas, como el doberman pinscher, gran danés y cocker spaniel son más susceptibles al padecimiento de esta infección, siendo diagnosticada con mayor asiduidad en ejemplares de razas puras y en edades comprendidas entre 1 y 7 años (Malik y cols., 1995; Acosta y cols., 1999; Nelson y Couto, 2000; Larsson, 2000). No se ha podido poner de manifiesto que el sexo en esta especie animal actúe como factor predisponente.

Las personas y animales pueden tener la misma exposición ambiental al *C. neoformans*, pero la transferencia zoonótica es improbable a partir del contacto con los animales infectados (Nelson y Couto, 2000). No existen datos exactos de prevalencia de esta enfermedad en los animales de compañía pero Malik y cols. en 1997, basándose en su propia experiencia afirmaron que la prevalencia de la enfermedad en estos animales es comparable o mayor a la obtenida en los casos de humanos. Estos autores

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

han podido aislar al microorganismo de las fosas nasales de perros y gatos asintomáticos.

2.2.3.2.- ECOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN

Son muy diversos los sustratos de los cuales se ha podido aislar a *C. neoformans*. En 1951, Emmons lo aísla del suelo y en 1954, Clark y cols. lo aíslan de manzanas. En este mismo año, Emmons establece la asociación saprofita de *C. neoformans* con las excretas viejas de palomas. Estudios posteriores realizados por el propio Emmons y por otros investigadores muestran que las excretas viejas de palomas son la fuente conocida más abundante de dicho microorganismo. Además, el aislamiento de ésta y otras especies levaduriformes de muestras procedentes de palomas y otras aves de corral, patógenas para el hombre y los animales, nos demuestra que los excrementos de estas aves representan una fuente de infección importante en la salud pública (Mangiarotti y cols., 1993; Pollock, 2003). Gugnani y cols. (1976) estudian la prevalencia de *Cryptococcus neoformans* en excretas aviares en la India, obteniendo resultados interesantes ya que se aísla el hongo en heces de paloma desecadas (10.06%) pero no en las excretas frescas. Aislaron además a *C. tropicalis, C. albicans, C. guilliermondii y G. Candidum*. En 1975, Swinne-Desgain determina la presencia de *Cryptococcus neoformans* en un 45% de las muestras de heces de paloma analizadas y descubre la existencia de portadores en buche en un porcentaje altamente significativo (50%) en un estudio realizado en Bélgica. Además, aísla esta especie levaduriforme de otras fuentes tales como agua potable, ambiente y en un 19% de muestras recogidas de heces de pájaros canarios.

Las razones por las cuales los criptococos no compiten bien con otros microorganismos en el suelo son desconocidas, pero pueden estar involucrados mecanismos biológicos de control. *Acanthamoeba polyphaga*, una ameba de vida libre, puede fagocitar y matar hasta el 99% de *C. neoformans* en cultivos mixtos (Bunting y cols., 1979). La supervivencia de esta levadura en la tierra puede verse afectada por diversos factores

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

biológicos: amebas, bacterias de la tierra y ácaros o cochinillas entre otros, capaces de inhibir o destruir a estos hongos (Ruiz y cols., 1982; Rubio, 1998).

2.2.3.2.1.- RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LA PALOMA Y *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

En 1976, Swinne-Desgain realizó un estudio con 10 palomas a las que les suministró células levaduriformes vía oral. Previamente había comprobado que los animales estaban libres del microorganismo en buche y excretas. Pudo observar que un día después de la inoculación, la levadura se recuperó de las heces de 9 de las 10 palomas y que a los 22 días tras la ingestión todavía existía una muestra positiva. Asímismo, observó que las muestras de buche resultaron ser positivas durante un período de tiempo más largo ya que dos de las palomas todavía eran positivas en el día 86 postinoculación. Estos resultados y otros obtenidos previamente indican que la paloma puede portar a *C. neoformans* en su buche y que es posible que *Cryptococcus neoformans* sobreviva en el buche de las palomas y ocasionalmente pase a heces donde se multiplica.

Posteriormente, multitud de autores confirman el aislamiento de *C. neoformans* en buche y heces de palomas en diversos lugares del mundo: Khan y cols. en 1978, Refai y cols. en 1983, Hermoso de Mendoza en 1984 A, Yilmaz y cols. y Stenderup y cols. en 1989, Weber y Schäfer en 1991, Li y cols. (1993 B), Castañón Olivares y López Martínez (1994), Ordóñez y Castañeda (1994), Khosravi (1997), Pal en el año 1997, Yildiran y cols. (1998), Kielstein y cols. (2000 B) y Yimtubezenash y cols. (2001). No obstante, otros estudios sostienen que la paloma en sí actúa como un portador de *C. neoformans* más que como un reservorio (Khan y cols., 1978). Este mismo año Abou-Gabal y Atia confirman que la paloma no juega un papel biológico activo en la diseminación de *C. neoformans* en la naturaleza porque las condiciones existentes en el buche no favorecen la replicación de esta levadura. Éstos últimos, observaron el efecto inhibitorio de las bacterias presentes en el contenido intestinal de palomas sanas

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

(*Pseudomona aeruginosa, Bacillus subtilis, Staphylococcus albus, Streptococcus faecalis, Escherichia coli, Proteus mirabilis y Klebsiella aerogenes*), sobre el crecimiento de *C. neoformans.*

Es importante recalcar el papel que juega las heces de paloma como reservorio no sólo de *C. neoformans*, sino de otras especies levaduriformes implicadas directamente en la salud pública. Estudios realizados por Vidotto y Gallo en 1985 y Gallo y cols. en 1989, indican que la paloma es un vector importante de patógenos para el hombre y los animales domésticos, representando un serio problema higiénico sanitario. Estos autores demostraron que la carga fúngica presente en éstas era elevada, aislando: *Candida albicans, C. krusei, C. guillermondii, C. intermedia, C. lusitaniae, C. parapsilosis, C. pseudotropicalis, C. rugosa, C. tropicalis, C. humicola, C. lypolitica, C. lambica, C. zeylanoides, Cryptococcus albidus, C. laurentii, C. neoformans, C. terreus, Pichia membranaefaciens, Hansenula anomala, Geotrichum sp, Kloekera apiculata, Rhodotorula rubra, R. glutinis Saccharomyces cerevisiae, S. oleaginosus, S. telluris, Torulopsis candida, Torula glabrata, Trichosporon cutaneum, T. beigelii, T. capitatum* y *T. pullulans*, muchas de las cuales se consideran patógenas (Hoog y Guarro, 1995). Caicedo y cols. en 1996 encontraron diferencias significativas entre el aislamiento de *C. neoformans* y el sistema de nidación. Además, determinaron que un número mayor de 15 palomas influye significativamente en el aislamiento del hongo y que la probabilidad de encontrarlo es mayor cuando las excretas están acumuladas. Por la obtención de dichos resultados, subrayan la importancia de emprender campañas que eviten la acumulación de excrementos de palomas.

Con todo lo anteriormente expuesto, ha quedado reflejado que *C. neoformans,* especie patógena por excelencia dentro de dicho género, ha sido aislada de heces aviares, principalmente de palomas, evidenciando la relación ecológica existente entre el *C. neoformans* y las heces y/o buches de paloma. Sin embargo, referencias bibliográficas sobre el papel que juega la paloma y sus deyecciones como reservorios de otras especies de criptococos implicados también en esta patología son escasas.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Cryptococcus albidus, aunque no con tanta frecuencia como *C. neoformans,* se ha aislado de buches (Hermoso de Mendoza, 1984 A) y de heces de paloma (Jen, 1992; Maldonado y cols., 2001). En 1997, Colom y cols. en un estudio realizado en las ciudades de Alicante y Santa Pola en España, determinan la presencia de *Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus albidus* en excretas de palomas urbanas y *C. laurentii* de heces de palomas en cautiverio.

En Suecia, Mattsson y cols. (1999) aíslan a *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii, Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus uniguttulatus* de muestras de heces frescas y de cloacas de palomas salvajes, no habiendo aislado al patógeno por excelencia (*C. neoformans* var. *neoformans*) de ninguna de las muestras mencionadas, al igual que Kielstein y cols. (2000 A) que aíslan a *C. albidus* en un alto porcentaje de las muestras de excreta y sin embargo, no aislaron a *C. neoformans* de ninguna de ellas.

2.2.3.2.2.- *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

C. neoformans es un hongo de distribución cosmopolita y saprofito en la naturaleza y no muestra ningún área endémica definida (Diamond, 1997; Forbes y cols., 1998; Payá, 2002; Cano Rangel y cols., 2002). Como ya comentamos anteriormente, *C. neoformans* incluye dos variedades: *C. neoformans* var. *neoformans*, serotipos A, D y AD (teleomorfo *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*) y *C. neoformans* var. *gattii*, serotipos B y C (teleomorfo *F. neoformans* var. *bacillispora*) (Kwon-Chung, 1976). La primera tiene distribución geográfica mundial y la distribución de la segunda está restringida a regiones con clima tropical o subtropical (Ellis y Pfeifer, 1990 A), además presentan diferencias ecológicas y epidemiológicas (Bennett y cols., 1978; Kwon-Chung y Bennett, 1984; Ellis y Pfeifer, 1990 B).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Característica	*C. neoformans* var. *neoformans*	*C. neoformans* var. *gattii*	Referencia
Estado perfecto	*Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*	*Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora*	Kwon-Chung, 1975,1976,1982(C)
Ecología	Suelo y heces aviares	Eucaliptos	Xu y cols., 2000
Principal Distribución geográfica	Mundial (predominante en Noreste de Europa)	Zonas tropicales y subtropicales Sureste California, África, Australia y sureste asiático	Bennett y cols., 1984; Dromer y cols., 1996 (B) y Casadevall y Perfect, 1998

Tabla 6.- Principales diferencias ecológicas y epidemiológicas de las dos variedades de *C. neoformans*

2.2.3.2.2.1.- *Cryptococcus neoformans* variedad *neoformans*

C. neoformans var. *neoformans* tiene su hábitat en el suelo contaminado con material fecal de aves. Esta variedad tiene como principal vector y reservorio a la paloma urbana (*Columba livia*), aunque también se ha aislado de nidos de otros pájaros y de guano de otras aves: canarios, loros y periquitos (Criseo y cols. 1995; Sorrell y Ellis, 1997). Este hecho también ha sido puesto de manifiesto por Staib y Schulz-Dieterich en 1984 que analizaron excrementos procedentes de 142 especies de aves consiguiendo el aislamiento de *C. neoformans* en tan sólo 4 de todas las especies estudiadas: *Probosciger aterrimus* (cacatúa de las palmas), *Ara militaris* (guacamaya verde), *Psittacus erithacus* (loro gris africano) y *Podargus strigoides* (podargo castaño). En 1983, Wegener y Staib comunicaron la presencia de una paciente de 69 años, aficionada a las aves a la que se le diagnosticó postmortem una criptococosis que afectaba al SNC y sugirieron que el material fecal de un periquito (*Melopsittacus undulatus)* fuera la posible fuente de infección. No obstante, Mancianti y cols. (2002) analizaron 325 muestras de heces desecadas y frescas de aves pertenecientes a la familia de las psitácidas, no obteniendo el aislamiento de

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

C. neoformans en ninguna de ellas. Las especies aviares examinadas fueron entre otras: *Pionites melanocephalus* (perico calzoncito), *Psittacula eupatria* (cotorra alejandrina), *Psittacula krameri* (cotorra de Kramer), *Cacatua alba* (cacatúa blanca), *Cacatua tenuirostris* (cacatúa picofino), *Nestor notabilis* (kea), *Agapornis nigrigenis* (Inseparable de mejillas negras), *A. personatus* (inseparable cabecinegro), *A. pullarius* (inseparable carirrojo), *Aratinga solstitialis* (conuro del sol), *A. pertinax* (conuro de garganta bruna), *Melopsittacus undulatus* (periquito), *Amazona aestiva* (amazona de frente azul), *A. amazonica* (amazona de alas naranjas), *A. aumtumnalis* (amazona de frente roja), *A. xanthops* (amazona de cara amarilla) etc. Tokojima y cols. relacionaron en el año 2001 un caso de criptococosis humana de una señora aficionada a los pájaros y sugirieron el posible contagio a partir de las heces de un loro.

Mangiarotti y cols. (1993) lo aíslan de las excretas de gallinas enfermas.

Puede aislarse también, aunque con menor frecuencia de otras fuentes como: cáscaras y jugos de frutas, leche y sus derivados, suelo, madera y vegetales en estado de descomposición (Davis, 1984; Pal y Mehrotra, 1984; Sorrell y Ellis, 1997).

En un estudio realizado por Littman y Borok en 1968, se puede observar que la concentración de criptococos en el pico, buche, patas y muestras rectales es baja, por lo que afirman que es poco probable que la paloma sea la principal fuente de criptococos en la naturaleza.

La identificación de las variedades de *C. neoformans* puede convertirse en una herramienta útil para conocer las posibles fuentes de infección. El hábitat natural de *C. neoformans* var. *neoformans* desde hace muchos años ha estado asociado con palomares y otros lugares donde haya acumulación de excretas de aves. Sin embargo, recientemente se ha podido confirmar la presencia de esta variedad en huecos de troncos de árboles con evidente degradación de la lignina; ésto podría ampliar los conocimientos

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

actuales sobre la epidemiología de esta micosis (Lazera y cols., 1996 y 2000).

No suele aislarse en deyecciones recientes, pero sí en las acumuladas y secas existentes en palomares, aleros de edificios, áticos o balcones de casas abandonadas donde duermen las palomas. Su prevalencia en este hábitat urbano ecológicamente restrictivo, desecado, alcalino, rico en sales y nitrógeno es muy frecuente en nuestro medio cultural (Rubio, 1998). Se sugiere que la alta concentración de creatinina en dicho estiércol favorece el crecimiento de los criptococos; sin embargo, las heces de pichón brindan un ambiente alcalino, hiperosmolar, rico en muchos compuestos nitrogenados además de la creatinina (Medleau y Barsanti, 1993).

Las palomas con *C. neoformans* en su tracto intestinal pueden excretar el organismo durante varios meses sin desarrollar la enfermedad (Quin y cols., 2002).

Los criptococos pueden alcanzar un número de 5 $x10^7$ en heces de paloma y pueden recuperarse en gran cantidad en la acumulación de excrementos en sus nidos, altillos, cornisas, etc. A menudo es el microorganismo predominante en este medio alcalino hiperosmolar, con su rico contenido de creatinina y otros compuestos que contienen nitrógeno, pero puede desaparecer cuando los detritos de estas aves se mezclan con el suelo (Davis, 1984). Pocas veces se aísla de suelos orgánicamente enriquecidos (Emmons, 1960).

La alta concentración de esta levadura en este sustrato puede estar relacionada con su habilidad para asimilar la xantina, urea, ácido úrico y creatinina, compuestos abundantes en los excrementos de estas aves (Ruiz y cols., 1981). Su permanencia en este sustrato a la sombra, puede ser de hasta más de 2 años; pero la exposición directa al sol destruye al hongo o inhibe su crecimiento (Davis, 1984; Rubio, 1998). En este hábitat saprofito el polvo vehicula levaduras de sólo 1-2 micras de diámetro y acapsuladas, lo

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

que les permite alcanzar fácilmente el espacio alveolar al ser inhaladas (García Rodríguez y Picazo, 1998).

C. neoformans variedad *neoformans* está ampliamente distribuido por el globo terráqueo, habiendo sido aislado en: Bélgica (Swinne-Desgain, 1975), en la India (Gugnani y cols., 1976; Khan y cols., 1978), Egipto (Yimtubezenash y cols., 2001), Italia (Vidotto y Gallo., 1985; Gallo y cols., 1989), Turquía (Yilmaz y cols., 1989; Yildiran y cols., 1998), Dinamarca (Stenderup y cols., 1989), Alemania (Weber y Schäfer., 1991; Kielstein y cols., 2000 B), China (Li y cols., 1993 B), México (Castañón Olivares y López Martínez, 1994), Colombia (Ordóñez y Castañeda, 1994; Caicedo y cols., 1996), Irán (Khosravi, 1997) Nepal (Pal, 1997), Taiwán (Jen, 1992), Suecia (Mattsson y cols., 1999), Austria (Kielstein y cols., 2000 A).

En España ha sido aislado repetidamente en distintas provincias: Cádiz, Sevilla y León (Pérez Ramos, 1980); Córdoba (Hermoso de Mendoza, 1984 A y 1987); Santa Pola, Alicante (Colom y cols., 1997).

Existe un predominio importante del serotipo A en España y en el continente europeo en general. Sin embargo, es importante destacar que el serotipo D muestra una elevada incidencia con respecto a otras zonas del mundo (Dromer y cols., 1996 A; Casadevall y Perfect, 1998).

2.2.3.2.2.2.- *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii*

A diferencia de la variedad *neoformans*, la variedad *gattii* no se ha aislado de heces de aves, quizás por la menor tolerancia de ésta última a altos niveles de creatinina (Staib y Heissenhuber, 1989; Baró y cols., 1998 A).

El primer aislamiento ambiental se describió en 1990 (A) por Ellis y Pfeiffer en Australia quienes lo encontraron en muestras de corteza, hojas y restos vegetales depositados bajo la cúpula del *Eucalyptus camaldulensis* en floración, concluyendo que existe una asociación específica entre *C.*

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

neoformans var. *gattii* y *E. camaldulensis,* y que la dispersión de las partículas infectantes de esta variedad parece ocurrir al final de la primavera concordando con la floración del árbol.

Pfeiffer y Ellis en 1991, aislaron e identificaron *C. neoformans* var. *gattii* a partir de *E. camaldulensis* en los Estados Unidos; éste es el primer aislamiento ambiental reportado fuera de Australia y apoya la hipótesis de que el hongo ha sido exportado de Australia a otros países probablemente a través de semillas infectadas o por plantas jóvenes de *Eucalyptus* spp. Observaron que la incidencia de infecciones por *C. neoformans* var. *gattii* en pacientes con SIDA se incrementaba si éstos se exponían a partículas aerotransportadas durante el florecimiento de *E. camaldulensis.*

En 1992 consiguieron aislar a este criptococo de *Eucalyptus tereticornis*, el cual presenta una distribución global similar a la de *E. camaldulensis*, ambas especies son frecuentemente confundidas y sólo distinguibles por la forma y el tamaño del opérculo (Pfeifer y Ellis., 1992). Estudios posteriores han relacionado a esta variedad con otras especies de eucaliptos, como *Eucalyptus blakelyi*, *E. gomphocephala* y *E. rudis* (Ellis y Pfeiffer, 1994). Argüero y cols. (1996), lo aíslan en México del *E. tereticornis.*

Otros autores han mostrado la existencia de *C. neoformans* var. *gattii* de otros árboles tropicales, como *Moquilea tomentosa* (Lazera y cols., 1998) y *Guettarda* spp. (Cabral Passoni, 1999).

Los aislamientos de la variedad *gattii* en *E. tereticornis* y *E. camaldulensis* han sido caracterizados como serotipos B; el serotipo C nunca ha sido aislado de eucaliptos (Pfeifer y Ellis, 1992; Sorrell, 2001). Los aislamientos ambientales de *C. neoformans* var. *gattii* han estado casi siempre relacionados con los eucaliptos, no obstante, en Sudamérica, el serotipo B se ha podido poner de manifiesto en otras fuentes ambientales de tal forma que Gezuele y cols. (1993) lo aíslan a partir de un trozo de panal de avispas (*Polybia occidentales*) deshabitado en Uruguay. En Brasil, se consigue este aislamiento del guano de murciélago (Lazera y cols., 1993).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

El primer aislamiento ambiental en Colombia del serotipo C, ha sido encontrado en detritos de almendros (*Terminalia catappa*) (Callejas y cols., 1998). Huérfano y cols. (2001), infectan plántulas de almendros con *C. neoformans* var. *gattii* y evaluaron que la supervivencia de dicha variedad era superior a los tres meses.

En Europa, el aislamiento de *C. neoformans* var. *gattii* es casi excepcional. Entre los países en los que se ha podido aislar nos encontramos con Alemania, Italia y Portugal (Kohl y cols., 1985; Martins y cols., 1996; Montagna y cols., 1997) y más recientemente España (Baró y cols., 1998 A), distribuyéndose normalmente por zonas con climas tropicales y subtropicales: Australia, Brasil, Camboya, Hawaii, sur de California, México, Paraguay, Tailandia, Vietnam, Nepal y África central (Kwon-Chung y Bennett, 1984; Sorrell, 2001). Pfeiffer y Ellis en 1991 sugieren que la cuna de esta variedad se encuentra en Australia y que ha sido exportada a otros países a través de semillas infectadas o plantas jóvenes de *Eucalyptus* sp.

2.2.3.2.3.- LA PALOMA Y OTRAS AVES COMO PORTADORAS DE OTRAS ESPECIES DE CRIPTOCOCOS

C. laurentii ha sido aislado de excretas de diferentes especies aviares tales como lechuzas, martín pescador, loros y gallinas enfermas y sanas (Magiarotti y cols., 1993); éste último llega a la conclusión de que el confinamiento de estas aves puede ser una potencial fuente de contagio para el personal relacionado con la industria avícola que presente alterado su sistema inmune. Mattsson y cols. en 1999 y Rosario y cols. en 2002, lo aíslan de excretas y cloacas de palomas y Maldonado y cols. en el año 2001 lo aísla de excretas. Rosario y cols. (2002) consiguen también el aislamiento de esta especie de criptococo a partir de las muestras de buche.

Pocas son las referencias existentes sobre el aislamiento de otros criptococos patógenos (*C. albidus*, *C. laurentii*, *C. humicolus* y *C. curvatus*).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

C. uniguttulatus ha podido ponerse de manifiesto en excretas (Mattsson y cols., 1999; Maldonado y cols., 2001; Rosario y cols., 2002) y muestras de cloaca de paloma (Mattsson y cols., 1999; Rosario y cols., 2002). Estos últimos autores consiguen también el aislamiento de esta especie de criptococo a partir de las muestras de buche.

C. albidus ha sido aislado recientemente por Rosario y cols. en el año 2002 a partir de muestras de cloaca y por Jen (1992), Maldonado y cols. (2001) y Rosario y cols. (2002) de excrementos de palomas. Hermoso de Mendoza (1984 A) y Rosario y cols. (2002) aíslan de muestras de buche a dicha especie de criptococo.

2.2.3.2.4.- ESTUDIOS REALIZADOS EN ESPAÑA

La mayoría de los estudios realizados en España demuestran que *C. neoformans* var *neoformans* es con respecto a la variedad *gattii* el que con mayor frecuencia se aísla en nuestro país.

En 1980, Pérez Ramos aísla a partir de muestras de heces de palomas recolectadas en las provincias de Cádiz, Sevilla y León, un 27.58% de levaduras pertenecientes al Género *Cryptococcus*, aislando principalmente *C. neoformans* y en menor proporción *C. uniguttulatus* y *C. albidus*.

En Córdoba, según estudios realizados por Hermoso de Mendoza (1984 A), en muestras de buche analizadas, obtuvo una frecuencia de palomas portadoras de *C. neoformans* en buche del 8.2%, y la frecuencia media de infección por palomar del 36.8%, aislando también *C. albidus*.

En un estudio realizado en las ciudades de Alicante y Santa Pola (España) en 1997 por Colom y cols. se aísla *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. laurentii* y *C. albidus* de heces de palomas urbanas y *C. laurentii* de heces de palomas en cautiverio, asimismo aíslan éste último de flores de *Eucalyptus camaldulensis* .

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

En Barcelona, Baró y cols. (1998 B), detectan en muestras de polvo procedentes del domicilio de personas sanas, VIH positivas y pacientes afectados de SIDA con criptococosis *C. laurentii* y *C. albidus*. En este estudio no se puso de manifiesto la presencia de *C. neoformans* var. *neoformans*.

En España no se ha aislado a partir del medio ambiente, ni se ha descrito ningún caso de criptococosis humana producido por la variedad *gattii* (Colom y cols., 2001). Sin embargo, *C. neoformans* var. *gattii*, sí ha sido aislado como agente causal de enfermedad en el ganado caprino, lo cual demuestra que su distribución geográfica es más amplia que la supuesta inicialmente (Torres Rodríguez y cols., 1997; Baró y cols., 1998 A).

La demostración de que C. *neoformans var. gattii* existe en nuestro país y que es capaz de ocasionar infecciones graves en animales sin otras patologías previas se debe a estos últimos autores.

El estudio de la distribución de variedades y serotipos de aislamientos clínicos y ambientales en distintas zonas geográficas de España, corre a cargo de Baró y cols. en el año 1999. Observaron que la mayor parte de los aislamientos de origen humano y ambiental pertenecían al serotipo A y que los aislamientos obtenidos de cabras eran los únicos pertenecientes al serotipo B. No detectaron el serotipo C en ninguna de las muestras analizadas. Después del serotipo A, predominaron el D y AD respectivamente.

El origen geográfico y la distribución de los diferentes serotipos de origen clínico, se muestran en el siguiente mapa en el que se observa una distribución irregular del serotipo D con una mayor prevalencia en la zona este (Valencia) y central (Madrid) de España. La presencia de dichos serotipos fue ratificada en el año 2001 por Colom y cols.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

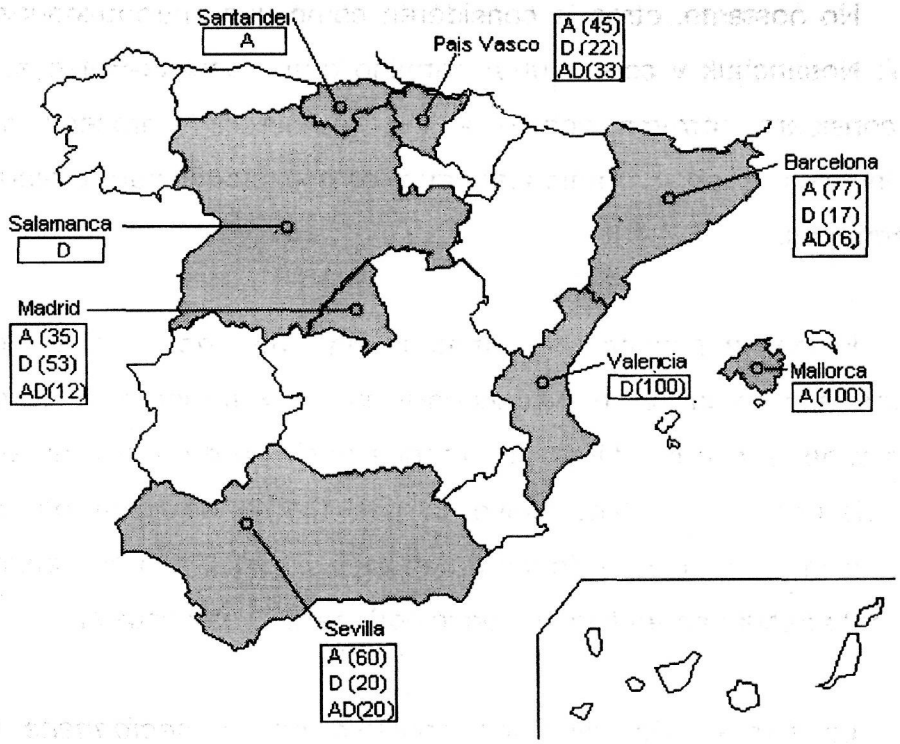


Figura 7.- Distribución de los serotipos de origen clínico aislados en España. Baró y cols., 1999

2.2.3.3.- CONTAGIO: FORMAS Y VÍAS DE CONTAGIO

La *criptococosis no es una enfermedad contagiosa*, no habiéndose documentado la transmisión de animales a personas y viceversa (Levitz, 1991). Tampoco ha sido posible demostrar la transmisión entre animales ni entre humanos (Braude y cols., 1984; Faggi y cols., 1993; Cabral Passoni, 1999). No obstante, sí se ha documentado el contagio a través de trasplantes de tejidos obtenidos de donantes con criptococosis activa. Así, Gottesdiener en 1989 y Levitz en 1991 han mostrado casos en individuos trasplantados: infección sistémica tras trasplante de riñón, endoftalmitis tras un trasplante corneano y un caso de criptococosis cutánea tras la inoculación intradérmica accidental de sangre de un paciente con SIDA y criptococosis.

La mayoría de los autores coinciden por lo tanto en no considerarla una zoonosis ya que consideran al suelo contaminado por heces aviares y no a las aves como el principal reservorio de dicha enfermedad.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

No obstante, otros la consideran como una antropozoonosis (Pham, 1997; Nosanchuk y cols., 2000), término que Blaschke-Hellmessen (2000) no considera correcto debido a que la infección procede de fuentes ambientales y no de animales que estén padeciendo directamente la enfermedad.

El descubrimiento de Emmons en 1955 de la existencia de *C. neoformans* como saprofito frecuente en el excremento de palomas a la intemperie, apoyó la validez de la teoría naciente de que la enfermedad se adquiría por inhalación del polvo cargado del hongo y que por lo tanto, la exposición del hombre y de los animales a las excretas de palomas podría explicar adecuadamente la epidemiología de la criptococosis.

La forma más usual de contagio de *C. neoformans* es la vía inhalatoria a partir de blastosporas desecadas dispersas en el medio ambiente o de basidiosporas, las cuales son lo suficientemente pequeñas (<3 μm) para ser depositadas en los alveolos pulmonares tras la inhalación (Sorrell y Ellis, 1997).

Wilson y Plunkett (1965), relatan que la criptococosis es casi siempre adquirida por la inhalación de esporas (células) del hongo junto con polvo. Maddy en el año 1967 señala que quizás la mayor parte de los casos de criptococosis resultan de la inhalación del hongo, el cual determina una lesión pulmonar que generalmente sana. Probablemente, esta sea la terminación de la mayoría de las infecciones, sin embargo, la diseminación al SNC puede ocurrir y las consecuencias son generalmente graves.

El intervalo de tiempo transcurrido entre la inhalación de *C. neoformans* y la expresión de la enfermedad es aún desconocido, aunque en algunos casos la manifestación clínica puede deberse a la reactivación de un foco latente más que a la exposición a una fuente saprofítica en la que esté presente el hongo (Cabral Passoni, 1999).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Newberry y cols. en 1967, mostraron que personas sanas que habían tenido contactos con palomas daban con mayor frecuencia positivas a la prueba intradérmica realizada con antígeno criptococócico con respecto a las que no habían tenido contacto previo.

En 1968, Atkinson y Bennett, demostraron la alta incidencia de reacciones cutáneas positivas a la criptococcina en los trabajadores de laboratorio que están con frecuencia expuestos a los aerosoles del microorganismo; sin embargo, nunca se han descrito casos de criptococosis pulmonar ni diseminada adquirida en el laboratorio.

Si bien es cierto que *C. neoformans* ha podido ser aislado de piel, mucosas e incluso heces de individuos sanos (Howard, 1973; Cabral Passoni, 1999), éste no se considera parte de la flora normal de humanos ni de animales (Duperval y cols., 1977). Cabral Passoni (1999) no apoya el concepto de una posible infección endógena.

Aunque la mayoría de los autores coincidan en considerar la vía inhalatoria como la principal vía de contagio, también se ha descrito el contagio por inoculación directa de *C. neoformans* a través de la piel dando lugar a criptococosis cutánea primaria (Bartralot-Soler y cols., 1995).

Hasta el momento, no ha sido descrito el contagio transplacentario (Castañón Olivares y cols., 2000). Asímismo, el contagio sexual de esta enfermedad nunca ha sido probado (La Rocco y Burgert, 1997).

Aunque Green y Bulmer (1979) han demostrado que un pequeño número de ratones podía infectarse por inoculación gastrointestinal, la ingestión de criptococos nunca había sido comunicada como puerta de entrada en infecciones humanas, ni siquiera después de la exposición a un gran número de criptococos en leche no pasteurizada de vacas con mastitis criptococócica. No obstante, Lynch y Naftolin (1987) describen el primer caso de infección oral por *Cryptococcus neoformans* en un paciente con SIDA.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Wagner y cols. (1968) informaron de un caso de meningoencefalitis canina por *Cryptococcus neoformans* en el cual la levadura alcanzó el SNC por extensión de otitis externa. Algunos autores coinciden en señalar que este tipo de invasión es posible; sin embargo, muchos consideran que el foco primario común está en los pulmones.

2.2.4.- PATOGENIA DE LA CRIPTOCOCOSIS

El desarrollo patogénico de esta enfermedad depende de distintos factores, principalmente del estado del sistema inmune y del desarrollo de patologías primarias que tienen como agentes etiológicos bacterias, virus y parásitos; y también predisponen a esta enfermedad el padecimiento de enfermedades metabólicas. La dosis infectiva es factor importante en el desarrollo patogénico, no obstante, en el caso de la criptococosis la dosis infectiva necesaria para contraer la infección es aún desconocida (García Salas y cols., 2003).

2.2.4.1.- DETERMINANTES DE LA ENFERMEDAD DEPENDIENTES DEL HOSPEDADOR

El papel que juegan los factores de inmunodepresión en la patogenia de la criptococosis es indudable, y ha sido reconocido tanto en medicina humana como veterinaria por muy diversos autores.

La mayoría de los casos de criptococosis humana han sido descritos en pacientes con alguna alteración en el sistema inmune, tomando especial relevancia en individuos afectos de SIDA. Esta última está considerada en la actualidad como el principal factor de riesgo para el desarrollo de la criptococosis. Por lo general, la variedad implicada en los individuos afectados por SIDA es la *neoformans*, sin embargo la variedad *gattii,* muestra una marcada predilección por el huésped inmunocompetente, por lo que ha sido señalado su carácter de verdadero patógeno más que de un patógeno oportunista (Speed y Dunt, 1995; Abadi y cols., 1999).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

El hecho de que la variedad *gattii* afecte con mayor frecuencia a los individuos inmunocompetentes no tiene una explicación clara. Se han considerado la virulencia de la var. *gattii* y la respuesta del hospedador. Se han estudiado los mecanismos de defensa, entre ellos el sistema del complemento y especialmente, la vía alterna: los neutrófilos, los monocitos y la inmunidad celular. En presencia de altas concentraciones séricas del polisacárido capsular del hongo, se activa la vía alterna del complemento, lo que conduce al depósito de opsoninas, facilitándose también la quimiotaxis de las células fagocíticas. Asímismo, los componentes de la cápsula ejercen propiedades inmunomoduladoras sobre el hospedador. La composición química y la estructura de los polisacáridos de la cápsula marcan las diferencias entre las dos variedades de *C. neoformans* y probablemente éstas estén implicadas en la capacidad de unión al complemento y los efectos variables sobre la migración de los polimorfonucleares. Sin embargo, las diferencias descritas, no explican completamente por qué las infecciones por *C. neoformans* var. *gattii* son tan raras en hospedadores inmunocomprometidos (Peachey y cols., 1998; Lizarazo y cols., 2000). Hay autores que plantean que estos pacientes en realidad no están sanos sino que también tienen trastornos inmunológicos, pero que sólo son detectados con la realización de investigaciones más profundas; otros investigadores han llegado a la conclusión de que existe alguna entidad inmunológica que no ha podido ser descubierta hasta la fecha y que propicia la infección por *C. neoformans* var. *gattii* (Casadevall y Perfect, 1998).

Se han informado muy pocos casos de SIDA asociados a criptococcosis causada por la var. *gattii*: en Zaire (Kapenda., 1987), Canadá (Germain y cols., 1988), Estados Unidos (Clancy y cols., 1990) y Brasil (Rozenbaum, 1990). En 1990 B, Ellis y Pfeiffer intentan explicar este hecho planteando la posibilidad de que los pacientes con SIDA quizás no estén tan expuestos a esta variedad por no estar en contacto con árboles del Género *Eucalyptus*.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

En general, no sólo las enfermedades sino también los tratamientos con sustancias que deterioran los mecanismos inmunes del hospedador predisponen a la infección diseminada por *C. neoformans*. Antes del surgimiento del SIDA los mayores factores de riesgo eran la terapia inmunosupresora relacionada con los trasplantes de órganos, pacientes con neoplasias malignas, particularmente los desórdenes linfoproliferativos (linfoma de Hodgkin), leucemias, enfermedades colágeno vasculares (principalmente el lupus eritematoso sistémico) y la sarcoidosis. Se describen otros de menor importancia como la diálisis peritoneal, la diabetes mellitus insulinodependiente, la cirrosis hepática, artritis reumatoide y el alcoholismo (Zuger y cols., 1986; Chuck y Sande, 1989; Leggiadro y cols., 1992; Miró y cols., 1997; Singh, 1997; Sanchetee, 1998; Casadevall y Perfect, 1998; Hajjeh y cols., 1999; Kariniemi, 1999; Husain y cols., 2001; Paterson y Singh, 2002).

Aunque estas enfermedades anteriormente citadas no han perdido valor en la actualidad, desde el año 1981, la enfermedad de riesgo más común es la producida por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hasta el punto de que entre estos pacientes la prevalencia de la criptococosis a escala mundial es de aproximadamente de un 5-10% y en algunos países de Africa Central (Africa Subsahariana) ésta puede llegar al 30% (Casadevall y Perfect, 1998).

Desde el año 1989, y de forma esporádica, han aparecido en la literatura médica casos de depleción de linfocitos T-CD4 sin relación alguna con otros estados de inmunosupresión anteriormente mencionados (Pankhurst y Peakman 1989; Gatenby, 1989). A este síndrome se le conoce como linfocitopenia T-CD4 idiopática y los pacientes portadores de este defecto están más predispuestos a desarrollar infecciones oportunistas. Recientemente, Núñez Fernández y cols. (1999), describen un caso de criptococosis encefálica diseminada en un paciente sin evidencia de infección por el VIH y con dicho síndrome.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

En el gato, la criptococosis es la micosis sistémica más frecuente. En esta especie, las enfermedades víricas juegan un papel importante en el desarrollo de la criptococosis, tal es el caso de infecciones por el virus de la leucemia felina y el de la inmunodeficiencia felina, enfermedades ambas que cursan con alteraciones en el sistema inmune (Ramos Vara y cols., 1994). El virus de la inmunodeficiencia felina tiene un tropismo específico por los linfocitos T (CD4 y CD8), lo cual trae como consecuencia una serie de desórdenes en el sistema inmunitario de carácter progresivo. Esto predispone a los animales infectados a un estado de inmunosupresión, causa esencial para el desarrollo de esta patología (Brown y cols., 1991; Bennet y Smith, 1992).

En la especie canina, las condiciones potencialmente inmunosupresoras se identifican en menos del 10% de los perros con criptococosis: administración de corticosteroides, ehrlichiosis, filariosis y neoplasias (Nelson y Couto, 2000).

2.2.4.2.- FACTORES DE PATOGENICIDAD DE *CRYPTOCOCCUS* NEOFORMANS Y RESPUESTA INMUNOLÓGICA DEL HUÉSPED

Los principales factores de virulencia reconocidos en *Cryptococcus neoformans* incluyen: la cápsula polisacárida, la producción de melanina y la capacidad de crecimiento a 37ºC. Su habilidad para crecer a temperaturas fisiológicas, contribuye a su supervivencia en el hospedador (Mitchell y Perfect, 1995).

La habilidad que posee *C. neoformans* para pasar desapercibido a las defensas del hospedador y causar enfermedad está estrechamente asociado con la producción y secreción del **polisacárido capsular**, el cual le confiere actividad antifagocítica (Rodrígues y cols., 1999), inhibe el proceso inflamatorio e inhibe la inmunidad tanto celular como humoral (Breen, 1982; Rodrígues y cols., 1999). Es conocido también que el glucuroxilomanano, compuesto principal de la cápsula, activa la vía alterna del complemento produciendo opsoninas que se depositan en la cápsula, lo cual puede llevar

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

a la fagocitosis, no obstante, hay sitios del organismo en los que el sistema del complemento no llega bien tales como el SNC y los bronquios y como consecuencia el hongo pasa desapercibido a esta vía alterna (Levitz, 1998).

Sin embargo, la cápsula no es un factor definitivo dentro de la virulencia del hongo, pues se han aislado especies de *Cryptococcus* deficientes en cápsula productoras de enfermedad. Además, en los pacientes con SIDA el tamaño de la cápsula es menor lo cual está relacionado con el alto poder de virulencia del hongo para producir la enfermedad en este grupo de pacientes; las levaduras con cápsulas grandes son más fácilmente destruidas por monocitos y macrófagos (Miller y Mitchell, 1991), aún cuando el grado de fagocitosis es inversamente proporcional al tamaño de la cápsula.

La **enzima difenil oxidasa** es otro factor de patogenicidad. Funciona como antioxidante, ya que protege e incrementa la supervivencia de la levadura dentro del huésped por medio de la producción de melanina, que actúa bloqueando los oxidantes liberados al fagolisosoma en el proceso de digestión en la fagocitosis (Polacheck y cols., 1982; Rhodes y cols., 1982; Wang y Casadevall, 1994 B; Casadevall y cols., 2000), además, la predilección del hongo por el SNC se debe a la utilización por parte del mismo de catecolaminas como substrato de esta enzima, lo cual produce consumo de epinefrina evitando que se activen también los mecanismos oxidativos dependientes de ella (Polacheck, 1990; Jacobson, 1994).

La importancia de la producción de melanina en la virulencia de *C. neoformans* ha sido demostrada por primera vez en el año 1982 por Kwon Chung y cols. (B), éstos relataron que las cepas carentes de melanina resultaron menos virulentas para el ratón que las que producían este sustrato.

La producción de pigmentos similares a la melanina pueden servir además para proteger al hongo de las radiaciones ionizantes y las células capaces de producir dicho pigmento son más resistentes y por lo tanto

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

tienen una mayor viabilidad que las no pigmentadas a los efectos fungicidas de los rayos UV (Wang y Casadevall, 1994 A; Hamilton y Gómez, 2002).

La habilidad de *C. neoformans* de sintetizar melanina a partir de la actividad fenoloxidasa (lacasa), está asociada con su virulencia, pero el papel específico de la melanina en la patogénesis de la infección no está del todo claro (Williamson, 1997; Doering y cols., 1999; Vidotto y cols., 2002).

La patogenicidad a nivel del SNC no sólo está relacionada con el uso de las catecolaminas sino que también hay uniones receptor-ligando presentes en las neuronas que son sensibles a la tripsina, y que pueden ser inhibidas por aminoazúcares o disacáridos, pero no por los carbohidratos que son componentes de la cápsula.

La utilización de macrófagos, aunque sólo sea en circunstancias extremas, ya que *C. neoformans* no es un parásito intracelular obligado, ha sido descrita por Levitz en el año 1998, notificando la posible reactivación de la criptococosis a partir de focos latentes presentes en el interior de los macrófagos.

El papel de la **ureasa** en la patogénesis de la criptococosis es aún desconocido. Existen estudios de patogénesis realizados con bacterias, donde esta enzima parece tener un papel en la alteración de la función inmunitaria del hospedador y también aumenta el pH microambiental en el lugar de la infección. Sin embargo, en la patogénesis de la criptococosis estas causas no juegan un papel significativo (Levitz y cols., 1999).

Otro factor claramente relacionado con la patogenicidad es el **manitol**, la producción local de manitol por el microorganismo puede contribuir al edema cerebral e inhibir la función fagocítica (Wong y cols., 1990). Datos recientes sugieren que la **fosfolipasa B** también puede actuar como factor de virulencia (Ghannoum, 2000). *C. neoformans* var. *gattii* produce esta enzima tanto *in vitro* como *in vivo,* invadiendo los tejidos. Recientemente, Sorrell (2001) ha confirmado que la producción de dicha

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

enzima también puede jugar un papel importante en la virulencia del serotipo A de esta especie levaduriforme.

La **manoproteína** producida por el hongo modula la respuesta inmune al inducir los linfocitos T supresores y linfocitos T ayudadores específicos en ratones (Hoy, 1989). También se han descrito **proteinasas** que contribuyen a la ruptura de los tejidos del huésped o de algunas proteínas humorales (Brueske, 1986; Chen y cols., 1996).

2.2.4.3.- ACCIÓN PATÓGENA EN LA ESPECIE HUMANA

La vía de infección habitual es la inhalatoria, y raramente por inoculación, de forma que la principal puerta de entrada es la respiratoria. La infección se adquiere por inhalación de blastosporas desecadas (< 3 µm) existentes en la naturaleza, aunque también se ha comprobado experimentalmente que la infección puede iniciarse inhalando basidiosporas (1 a 3 µm) (Ellis y Pfeiffer, 1990 B; Sukroongreung y cols., 1998).

En la mayor parte de los casos, la inhalación del hongo produce una infección pulmonar asintomática autolimitada, ya que cuando el criptococo llega a los alveolos pulmonares se desencadena una respuesta de la inmunidad celular o humoral del huésped, que en condiciones normales es suficiente para controlar la infección. Según los modelos experimentales, la resistencia a la infección parece depender de la activación de los macrófagos y neutrófilos por los linfocitos más sensibilizados, siendo además necesaria una buena respuesta humoral con anticuerpos opsonizantes. Debido a que los pacientes más susceptibles a la infección por este hongo presentan una alteración de la inmunidad celular o humoral, el microorganismo no es eliminado por los mecanismos de defensa apropiados cuando penetra en las vías respiratorias. Así, la infección progresa en el pulmón y se disemina por vía hematógena hacia otros órganos, siendo el SNC el principal foco en la diseminación a partir del pulmón, produciendo cuadros de meningitis o meningoencefalitis. Sin embargo, puede haber diseminación hematógena hacia otros órganos tales

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

como hígado, riñón, bazo, ganglios linfáticos y glándulas suprarrenales (Sabetta y Andriole, 1985; Banerjee y cols., 1997; Hirch y cols., 2001; Santamaría y Zubero, 2002; Garau y Palacio, 2002).

Otras localizaciones menos frecuentes son la miocárdica, gastrointestinal, hepática, esplénica, prostática, glándulas suprarrenales cutánea, ósea y articular (Torres Rodríguez, 1994; Cordero y cols., 1996; Jean y cols., 2002).

Se ha demostrado que la próstata puede ser un nicho ecológico de *C. neoformans* y constituir la causa de las recidivas de pacientes aparentemente tratados con éxito con anfotericina B (Larsen y cols., 1989; Bozzette y cols., 1991).

La localización cutánea debida al dermatotropismo de *C. neoformans* según Dromer y cols. (1996 A), es más frecuente cuando el agente etiológico implicado es la var. *grubii* y menos para la var. *neoformans*, no habiendo sido determinada para la variedad *gattii*.

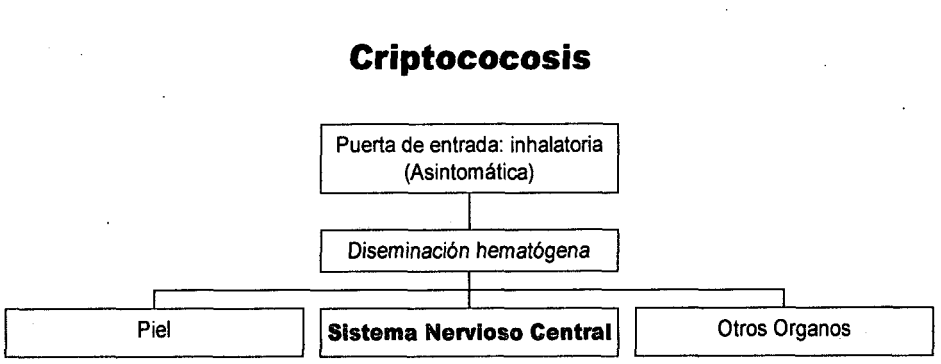


Figura 8.- Esquema patogénico de la criptococosis

Varios autores intentan dar una explicación de este tropismo del hongo por el SNC, como se detalla a continuación:

- Que el LCR es un buen medio de crecimiento para el microorganismo debido a la presencia de urea, ácido úrico y

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

creatinina y por no poseer los factores de inhibición presentes en sangre (McNamara y cols., 1994; López, 2002).

- Que el alto nivel de dopamina en el SNC puede promover la virulencia del criptococo al servir como un substrato para la producción de melanina por el microorganismo (Kwon-Chung y Rhodes, 1989).

- La ausencia en el líquido cefalorraquídeo (LCR), de los componentes de la vía alternativa del complemento, presentes en el suero que se unen a la cápsula de carbohidratos y facilitan la fagocitosis y la destrucción por las células polimorfonucleares (Taylor y cols., 2002; Ikeda y cols., 2002).

2.2.4.4.- ACCIÓN PATÓGENA ANIMAL

La mayoría de los autores coinciden en que la criptococosis animal se desarrolla prácticamente siguiendo el mismo esquema que la criptococosis humana. El criptococo entra por vía respiratoria y después de algún tiempo se disemina a tejidos, teniendo cierta predilección por el cerebro (Cano Rangel y cols., 2002).

En las aves, se supone que la alta temperatura corporal (42ºC) las protege de la infección e inhibe la multiplicación de dichos criptococos (Medleau y Barsanti, 1993; Mitchell y Perfect, 1995; Sorrell y Ellis, 1997; Nelson y Couto, 2000). La criptococosis aviar espontánea es bastante rara, no obstante, en 1965, Littman y cols. consiguen infectar palomos vía parenteral (inoculación intracerebral) y en 1968 y 1984 B, Weiland y cols. y Hermoso de Mendoza y cols. observaron casos de infección natural en estas aves.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Las palomas con *C. neoformans* en su tracto intestinal pueden excretar el organismo durante varios meses sin desarrollar la enfermedad (Quin y cols., 2002).

En la especie felina, normalmente el microorganismo coloniza el tracto respiratorio superior provocando una infección de la cavidad nasal y senos nasales y eventualmente los pulmones. Desde aquí, se puede diseminar hacia la piel, produciendo lesiones cutáneas granulomatosas y menos frecuentemente se disemina al SNC provocando meningoencefalitis y lesiones oculares (corioretinitis, desprendimiento de retina, neuritis óptica y uveitis anterior) (Ramos Vara y cols., 1994), mientras que en la especie canina, la afectación más frecuente es a nivel del SNC, ocular y en menor medida hay afectación cutánea.

2.2.5.- CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD

La criptococosis es una enfermedad polimorfa, no existiendo síntomas o signos específicos. La variabilidad en sus manifestaciones clínicas va asociada con el grado de inmunosupresión; por lo que pueden existir dificultades en el diagnóstico clínico, que conlleva a un retraso en el comienzo de un tratamiento adecuado, dependiendo su pronóstico de los factores anteriormente citados (Pérez Cárdenas, 2003).

Las manifestaciones clínicas presentadas por un determinado paciente van a depender fundamentalmente de tres factores:

- Las defensas del huésped, estado del sistema inmune
- La virulencia de la cepa infectante
- La dosis infectiva
- Estado general del individuo (padecimiento de enfermedades bacterianas y/o víricas, parasitosis, estado nutricional, etc.)

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

2.2.5.1.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA CRIPTOCOCOSIS HUMANA

La meningoencefalitis producida por *Cryptococcus neoformans*, representa la manifestación clínica más frecuente de la criptococosis, especialmente en el grupo de individuos HIV positivos (Mitchell y Perfect, 1995; Kwon-Chung y cols., 2000). *Cryptococcus neoformans,* agente etiológico de la criptococosis presenta dos variedades *(neoformans* y *gattii*), las cuales causan diferentes formas clínicas, específicas para la variedad.

Speed y Dunt observan en 1995 que las infecciones por la var. *gattii* son más insidiosas que las producidas por la var. *neoformans* y la duración promedio de los síntomas antes de la evaluación inicial fue más larga en los pacientes con var. *gattii* que en los pacientes con var. *neoformans.*

Además, el desarrollo de criptococomas en pulmón y cerebro está más asociado a la infección producida por la var. *gattii.* La diferencia en la presentación clínica se debe predominantemente al efecto de inmunodepresión subyacente en los pacientes infectados por *C. neoformans* var. *neoformans* (Sorrell, 2001).

Respecto a la localización pulmonar, en los pacientes no inmunodeprimidos la afectación puede progresar, regresar espontáneamente o permanecer estable durante largos períodos de tiempo, siendo raro que haya síntomas. Suele aparecer sola, aunque puede coexistir con otras manifestaciones extrapulmonares. En los pacientes inmunodeprimidos, la afectación puede ser desde asintomática a grave. Sólo el 5-25% de los enfermos de SIDA presenta tos y disnea, y en pocas ocasiones existe dolor pleural y alteraciones radiológicas. La mortalidad puede llegar al 42% en este tipo de paciente (Martín Mazuelos y Valverde Conde, 2001).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

2.2.5.1.1.-FORMA PULMONAR

La criptococosis pulmonar no presenta manifestaciones típicas y en la mayoría de los casos resulta asintomática y pueden remitir sin tratamiento (Kakeya y cols., 1998). Cuando aparecen síntomas, estos incluyen: tos con expectoración escasa y mucoide, fiebre moderada, dolor pleural, malestar general y pérdida de peso. Al examen físico se auscultan estertores.

2.2.5.1.2.-FORMAS DISEMINADAS

2.2.5.1.2.1.- AFECCIÓN DEL SNC: MANIFESTACIONES NERVIOSAS

El padecimiento de meningitis y meningoencefalitis por *C. neoformans* es apoyada por Wendisch y cols. en 1996, Abraham y cols. en 1997 y Karstaedt y cols. en el año 2002.

Aproximadamente un 10% de estos pacientes con meningitis criptocócica, desarrollan la enfermedad sin signos o síntomas clínicos (Banerjee y cols., 1997).

La hidrocefalia, complicación de la meningitis criptocócica, se presenta con mayor frecuencia en los individuos afectados por la variedad *gattii*, en los cuales las complicaciones encefálicas son más frecuentes (Mitchell y Perfect, 1995; Speed y Dunt, 1995). Esto se puede manifestar como un deterioro clínico temprano o tardío de hipertensión intracraneana o por una recrudescencia de las anomalías después de la mejoría inicial (Diamond, 1997).

2.2.5.1.2.2.- MANIFESTACIONES CUTÁNEAS

La afectación dermocutánea aparece en un 1-15% de los casos y salvo aquellas excepciones de inoculación traumática que pueden conducir a una criptococosis primaria, esta forma clínica es siempre secundaria a la

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

diseminación de *C. neoformans* a través de la sangre o linfa, por lo que algunos autores la han denominado "centinela de la diseminación".

Existen dos formas clínicas de las manifestaciones cutáneas, la forma diseminada y la forma localizada. En la forma diseminada, las lesiones son el resultado de una diseminación hematógena de *C. neoformans* a través de la sangre o linfa, mientras que la forma cutánea primaria en sí, se debe a la inoculación transcutánea del microorganismo. Ambas formas suelen acontecer en individuos inmunodeprimidos y el agente causal responsable es el *C. neoformans* var. *neoformans*. Las lesiones cutáneas producidas por *C. neoformans* var. *gattii* son raras, sin embargo se han descrito algunos casos (Severo y cols., 2001). En 1993, Mascaró describe un caso de un paciente con SIDA que desarrolló una infección diseminada a partir de una criptococosis cutánea primaria, de forma paralela al descenso de linfocitos CD4.

En 1985, Baes y Van Cutsem describieron un caso de criptococosis cutánea localizada como una masa de crecimiento rápido localizada en la mano de un criador de palomas afectado de asma. Dos años más tarde, Granier y cols. observaron el mismo cuadro en una mujer de 27 años de edad con tratamiento sistémico con esteroides y que desarrolló lesiones cutáneas progresivas. Goonetillete y cols. en 1995, describieron un caso de criptococosis cutánea primaria en un criador de palomas inmunocomprometido en Inglaterra y Micalizzi y cols., en 1997 citaron un caso en Italia de un criador de palomas en perfecto estado de salud e inmunitario, al que se le diagnosticó una lesión primaria cutánea por *Cryptococcus*. En Bélgica, Vandersmissen y cols. también diagnostican criptococosis cutánea en dos pacientes tratados con corticosteroides y sin SIDA en el año 1996.

2.2.5.1.2.3.- OTRAS MANIFESTACIONES

La afectación ósea es poco frecuente, y raramente se aprecia de forma aislada, sino en el curso de formas diseminadas. Algunos autores han

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

estimado que la frecuencia de afectación ósea en criptococosis diseminada se sitúa en torno al 10%. Los huesos mayormente afectados son los del cráneo, pelvis, costillas, epífisis de huesos largos o vértebras (Behrman y cols., 1990). La artritis criptocócica es por lo tanto, una entidad extremadamente rara y únicamente se han descrito casos aislados (Busse, 1894; Italiano y cols., 2001).

La criptococosis ocular es rara pero muy severa, ya que casi siempre conduce a la pérdida de la visión como consecuencia de una endoftalmitis. Pueden presentarse manifestaciones clínicas que expresen afectación de la retina, daño al nervio óptico (neuritis) y parálisis ocular (Mitchell y Perfect, 1995; Custis y cols., 1995; Park y cols., 1999). La pérdida de visión es uno de los principales problemas de la criptococosis ocasionada por la var. *gattii*, complicación que es infrecuente con la var. *neoformans*. En Papua, Nueva Guinea, se ha descrito que la pérdida total de la visión ocurre en 31% de los pacientes afectados con la var. *gattii*, mientras que ella sólo se presenta en 1,1% de pacientes con SIDA y criptococosis por var. *neoformans* (Lizarazo y cols., 2000).

La próstata siempre ha sido reconocida como un sitio de infección criptococócica, aunque usualmente no hay síntomas de prostatitis. En repetidas ocasiones, se han obtenido cultivos positivos de *C. neoformans* a partir de la orina y líquido seminal de pacientes con SIDA, después de haber concluido la terapia anticriptococócica, por lo que este órgano puede constituir un reservorio para este hongo, y ser hasta cierto punto responsable de la recidivas en este tipo de paciente (Mitchell y Perfect, 1995; Yip y cols., 1998). Este microorganismo ha llegado a causar úlceras en el pene y en la vulva, pero no ha sido reconocido como responsable de una enfermedad de transmisión sexual (La Rocco y Burgert, 1997).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

2.2.5.1.3.- CUADROS CLÍNICOS DESCRITOS EN MEDICINA HUMANA POR OTRAS ESPECIES DE CRIPTOCOCOS

C. laurentii ha sido descrito como agente causal de queratitis, infecciones pulmonares, fungemia e infecciones cutáneas en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes (Kamalam y cols., 1977; Sinnott y cols., 1989; Krcmery y cols., 1997; Ritterband y cols., 1998; Johnson y cols., 1998; Cheng y cols., 2001). *C. curvatus* ha sido aislado de pacientes con SIDA con mieloradiculitis (Dromer y cols., 1995). McCurdy y Morrow (2001), describieron un caso de ventriculitis en una mujer anciana cuyo agente causal es *C. uniguttulatus.*

En 1993, Chen y cols. reportaron un caso de criptococosis vaginal en una mujer de 72 años de edad. La citología presentó una marcada displasia, proveniente de una masa papilar, sin márgenes elevados ni capilares, localizada en la pared de la vagina. La paciente no presentó títulos de antígeno de *Cryptococcus* en suero o en líquido cefalorraquideo, razón por la cuál se cree que la lesión era primaria.

Desde el punto de vista epidemiológico es necesario tener presente las posibles implicaciones patógenas que pueden tener para el hombre las especies *C. albidus* y *C. uniguttulatus.* Estos organismos han sido considerados como saprofitos y no patógenos para el hombre, habiéndose aislado a partir de diverso material humano e incluso de la piel (Howard, 1973). Se han descrito casos de criptococosis pulmonar (Krumholz, 1972), criptococosis benignas atípicas (Wieser, 1973) e incluso meningitis (Da Cunha y Lusins, 1973) debidas todas ellas a *C. albidus*, lo cual obliga a considerar esta especie como potencialmente patógena.

Además del patógeno por excelencia (*Cryptococcus neoformans*), se ha podido aislar *C. albidus* de endocarditis de origen polimicrobiano (Banerjee y cols., 1997; Vázquez y cols., 2001).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

2.2.5.2.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA CRIPTOCOCOSIS EN ANIMALES DOMÉSTICOS

La criptococosis en animales domésticos es relativamente rara, no obstante la bibliografía cita casos esporádicos.

Por lo general, en el **gato**, los signos clínicos de criptococosis se localizan en cavidad nasal y/o en la piel y se trata de la enfermedad micótica sistémica más frecuente en el gato. Los signos más característicos incluyen: estornudos, estertores, descarga nasal crónica serosa, seropurulenta y hemorrágica unilateral o bilateral. Se puede observar deformidad acompañada de lisis de los huesos del tabique nasal y en un 70% de estos casos es visible una masa parecida a un pólipo o a una tumefacción subcutánea en el puente de la nariz.

Es posible que haya signos sistémicos como fiebre, adelgazamiento y anorexia. En los pocos casos de diseminación sistémica puede afectar a diversos órganos y provocar osteomielitis, insuficiencia renal, bronconeumonía y nódulos pulmonares con signos clínicos asociados. En ocasiones se aprecian úlceras o lesiones proliferativas en la cavidad oral junto con infecciones de vías respiratorias superiores, mientras que los signos respiratorios inferiores aparecen raras veces (Ramos Vara y cols., 1994).

Las lesiones cutáneas se caracterizan por pápulas, lesiones nodulares fluctuantes o firmes a la palpación cuyo diámetro varía de 1 a 10 mm. Las lesiones más grandes tienden a ulcerarse, formando una superficie descarnada con exudado seroso, observándose también linfadenomegalia periférica (Ackerman, 1988).

Los signos neurológicos son variables y dependen del sitio de la lesión e incluyen: depresión, cambios del temperamento, torneo, presión de la cabeza, ceguera, ataxia, pérdida aparente del olfato, paresia, parálisis y convulsiones si está afectado el SNC. Estos trastornos pueden ser

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

consecuencia directa de masas (granulomas) o meningoencefalitis. Los gatos que presentan signos nerviosos pueden presentar anormalidades oculares. Los signos oftálmicos más comunes son: pupilas dilatadas no reactivas y ceguera provocada por desprendimiento exudativo de retina, coriorretinitis granulomatosa, panoftalmitis o neuritis óptica. En algunos gatos se puede desarrollar uveítis anterior (Medleau y Barsanti, 1993).

En el caso del **perro** es una patología poco frecuente, describiéndose con menor casuística que en la especie felina. Se caracteriza clínicamente por cursar con formas diseminadas que terminan localizándose a nivel ocular y del SNC, dando signos oculares y neurológicos. Entre los signos nerviosos están: el síndrome vestibular, cabeza inclinada, nistagmo, parálisis facial, dolor en el cuello, convulsiones, alteraciones de la marcha, paresia, parapejía o tetraplejía. Las anormalidades oculares más comunes son: coriorretinitis granulomatosa exudativa y neuritis óptica acompañadas de midriasis y ceguera (Jergens y cols., 1986; Malik y cols., 1997). También se han observado casos de afección cutánea relacionados con la forma sistémica de la enfermedad. Estas lesiones ulcerosas afectan a nariz, lengua, encías, paladar duro, labios o matriz de las uñas (Medleau y Barsanti, 1993).

Ocasionalmente se han descrito casos de linfoadenomegalia (Malik, 1995), no obstante, en 1999, Acosta y cols. describen un caso de criptococosis canina, que se manifestó con un síndrome febril, vómitos y diarreas y linfadenitis bilateral en ganglios superficiales.

En **caballos**, es infrecuente y los signos clínicos incluyen granulomas nasales y sinusitis (Scott y cols., 1974), neumonía (Hilbert y cols., 1980), meningoencefalitis y aborto (Blanchard y Filkins, 1992). Los trastornos respiratorios en el caballo, se caracterizan por una inflamación obstructiva de los senos nasales. Es un proceso bastante raro, pero cuando ocurre, está localizada principalmente en las cavidades nasales y los pulmones de esta especie animal. Cuando afecta a los pulmones, su curso no muestra síntomas específicos, como ocurre con la mayoría de otras micosis

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

pulmonares. Tan sólo se observa una bronquitis leve, fiebre ligera y tos. La enfermedad está asociada a menudo a la tuberculosis. *C. neoformans* puede atacar también, aunque raramente a los intestinos, huesos y meninges (Van Cutsem y Rochette, 1993).

En el **ganado de leche** es poco común, presentándose algún caso esporádico de mastitis (De Gracia Mira, 1959), probablemente relacionados con tratamientos antibióticos y en el caso del ganado **ovino** y **caprino**, posiblemente en relación de infección a través de la piel. Por lo general, la criptococosis aparece en el ganado afectando a la ubre sin producir lesiones en SNC, signo característico de la afectación humana (Faggi y cols., 1993), no obstante, recientemente se han descrito casos en el ganado caprino de neumonía crónica caquectizante por *C. neoformans* var. *gattii* (Baró y cols., 1998 A).

Los trastornos de las ubres pueden tener como agentes etiológicos a distintos géneros de levaduras (*Candida*, *Cryptococcus*, *Torulopsis* o *Trichosporon*). Raramente aparece una infección por criptococos, pero puede causar mastitis grave, con importantes pérdidas económicas. Los síntomas clínicos varían desde una ligera inflamación de uno o más cuarterones a una inflamación grave y una dilatación de las glándulas mamarias afectadas. Es muy posible que la leche no muestre signos visibles de anomalía durante los primeros días después de que el animal haya contraído una infección por *Cryptococcus*, ya que en esta fase únicamente aparecen pequeños copos blancos en la leche. En las infecciones graves, sin embargo, se segrega un suero acuoso que contiene los copos. La leche es blanco grisácea, altamente viscosa y mucosa (Van Cutsem y Rochette, 1993).

Se ha visto compromiso de SNC en ciertas especies como: caballos, zorros, cerdo, hurones, entre otros (Faggi y cols., 1993) (Tabla 7).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

HOSPEDADOR	CONDICIÓN CLÍNICA
GATOS	Respiratorio, cutáneo, neural e infecciones oculares
PERROS	Enfermedad diseminada con signos neurológicos y oculares
GANADO	Mastitis, granulomas nasales
CABALLOS	Granulomas nasales, sinusitis, lesiones cutáneas, neumonía, meningoencefalitis y aborto

Tabla 7. - Cuadros clínicos más carcterísticos de las principales especies domésticas

Otras especies de criptococos se han visto implicadas aunque con baja casuística en patología veterinaria. *Cryptococcus laurentii*, se ha relacionado también como productor directo de enfermedad en aves, y más concretamente de un estornino bronceado verde, que exhibía pérdida de plumaje en la parte trasera y en el área del pico (Decostere y cols., 2003).

2.2.6.- LESIONES

Algunos autores han relacionado las características de la respuesta tisular con la patocronia de la infección criptococócica describiendo lesiones "gelatinosas" o "no reactivas" y lesiones "granulomatosas". Actualmente se piensa que la morfopatología de la lesión se relaciona con el estado de los mecanismos de defensa, tanto celulares como humorales.

El tipo granulomatoso (criptococoma o granuloma criptocócico), está caracterizado por la presencia de pocos organismos, cierta necrosis, y un infiltrado inflamatorio intenso formado por linfocitos, células mononucleares y células gigantes. En contraste, el tipo gelatinoso está caracterizado por la visualización de múltiples criptococos, asociado con poca o ninguna reacción inflamatoria (Radentz y Elewski, 1992).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

En la forma granulomatosa, existe una respuesta inflamatoria en la que participan células multinucleadas gigantes (con decenas de criptococos fagocitados), macrófagos (con o sin fagocitosis de elementos micóticos), linfocitos, células plasmáticas y leucocitos neutrófilos que típicamente son poco numerosos, ya que salvo en los abscesos, las lesiones no suelen ser supurativas.

En la forma gelatinosa, no existe respuesta inflamatoria acompañante y las lesiones son susceptibles de alcanzar un tamaño capaz de provocar un efecto de masa (Nielsen y Davis, 1988).

Las lesiones en el caso de la criptococosis pulmonar, pueden desarrollarse en cualquier parte del pulmón, y con frecuencia son bilaterales. Radiológicamente se traducen en lesiones pseudotumorales constituidas por masas o nódulos pulmonares únicos o múltiples con tumefacción hiliar, infiltrado parenquimatoso difuso, infiltrado peribronquial extenso y lesiones miliares difusas. Rara vez hay formación de cavernas (Inui y cols., 1998). También se han descrito neumonías segmentarias con derrame pleural y una forma pulmonar fulminante (Santamaría y Zubero, 1995).

Las principales alteraciones anatomopatológicas en el SNC se localizan en las meninges, sustancia gris cortical y núcleos basales. La respuesta tisular es extremadamente variable. En pacientes inmunodeprimidos, los microorganismos no inducen prácticamente reacción inflamatoria por lo que las masas gelatinosas de hongos crecen en las meninges o en pequeños quistes dentro de la sustancia gris como si fuera un medio de cultivo (Cordero y cols., 1996; Jean y cols., 2002).

La presencia de criptococomas pulmonares y cerebrales es más característica cuando la afectación es por la variedad *gattii* (Speed y Dunt, 1995).

Las manifestaciones cutáneas se caracterizan por su polimorfismo y se han descrito como nódulos subcutáneos (Manrique y cols., 1992), úlceras

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

(Schupbach y cols., 1976), celulitis (Gauder, 1987), púrpura palpable (Greene, 1978), úlceras parecidas a pioderma gangrenoso (Massa y Doyle, 1981), lesiones herpetiformes (Borton y Wintroub, 1984), lesiones semejantes a sarcoma de Kaposi (Blauvelt y Kerdel, 1992) y simulando a *molluscum contagiosum* (Concus y cols., 1988; Ricchi y cols., 1991), que es la manifestación clínica más frecuente, de un tamaño menor de 3 mm y ligeramente sobrelevadas, de localización en la extremidad cefálica, cuello y extremidades. Pueden presentar costra central, de aspecto varioliforme. Estas lesiones, en un contexto de fiebre y cuadro meníngeo, deben hacer pensar en una criptococosis (Durden y Elewski, 1994). En el caso de criptococosis cutánea primaria se observan lesiones de tipo nodular, tumoral o pseudoverrugosa, con posterior abscedación y ulceración, que suele localizarse en zonas descubiertas (brazos, piernas y cara) (Bartralot-Soler y cols., 1995).

2.2.7.- DIAGNÓSTICO

Basándonos en los signos y síntomas clínicos, así como en la recogida de datos epidemiológicos, podríamos presumir que nos encontramos ante un caso de criptococosis, no obstante, debido a la inespecificidad de sus síntomas (Pérez Cárdenas., 2003), ésta podría ser confundida con otras patologías, principalmente con la producida por *Coccidioides immitis* ya que ambas cursan con una meningoencefalitis de evolución crónica. También podría confundirse con la tuberculosis ya que en ambas existe el desarrollo de granulomas pulmonares (Cano Rangel y cols., 2002). Es por esta razón por lo que para realizar un diagnóstico certero de esta enfermedad hemos de recurrir a distintas pruebas laboratoriales en base al cultivo del hongo, que es la técnica de referencia que permite razonablemente establecer el diagnóstico (Figueroa, 1999; Matee y Matre, 2001).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

2.2.7.1.- FROTIS Y CULTIVO

A temperatura ambiente y a 37ºC en Agar Sabouraud glucosado, podemos observar en un período de 36-72 horas el desarrollo de colonias mucoides al principio blanquecinas, que se van tornando marronáceas con el paso del tiempo. El tamaño de la cápsula y el tiempo de incubación determina la cantidad de mucopolisacárido producido (García Rodríguez y Picazo, 1998).

C. neoformans crece en el medio de Sabouraud, pero sin cicloheximida (actidiona), ya que inhibe su crecimiento. Crece a 37 °C, pero lo hace más rápidamente a temperaturas menores, como 30 °C (Diamond, 1997). También puede crecer en cultivos de agar-sangre o agar-chocolate, pudiéndose obtener un cultivo positivo en 24-72 h (Bartralot Soler y cols., 1995).

El tiempo de crecimiento en muestras de LCR varía desde 24-48 horas hasta más de una semana, dependiendo de la densidad de microorganismos presentes en la muestra.

El hemocultivo es una buena técnica de diagnóstico en estos pacientes; el sistema de lisis-centrifugación es el más sensible y el más rápido en detectar crecimiento pero también son sensibles y rápidos los sistemas de hemocultivo con agitación y monitorización continua. El *C. neoformans* también se puede cultivar del sedimento urinario, especialmente tras masaje prostático, de muestras respiratorias y de material de biopsia (Berenguer, 1996).

2.2.7.2.- HALLAZGOS EN SANGRE Y LCR

En los pacientes sin SIDA, la concentración de glucosa en el LCR está disminuída en la mitad de los casos, los niveles de proteína suelen ser altos y es frecuente encontrar pleocitosis linfocitaria. No obstante, las alteraciones del LCR son menos notorias en los pacientes con SIDA, y en

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

estadios de deterioro importante de la inmunidad, éste puede ser normal (Diamond, 1995; Carrada Bravo, 2003).

El hongo puede también aislarse en sangre periférica, lo que ocurre hasta en el 50% de los casos (Kisha y cols., 1994; Simpson y Berger, 1997).

Las levaduras encapsuladas pueden visualizarse en el LCR con preparaciones de tinta china y resulta positivo con mayor frecuencia en los pacientes con SIDA (Karstaedt y cols., 2002).

2.2.7.3.- TINCIÓN NEGATIVA

La cápsula del hongo puede ponerse de manifiesto al mezclar la suspensión de levaduras con tinta china o nigrosina. Esta técnica es válida para el examen directo del LCR, sedimento de orina, lavado broncoalveolar, exudados de heridas e improntas de biopsias. La sensibilidad diagnóstica del examen directo del LCR con tinta china es muy alta en pacientes infectados por el VIH (Berenguer, 1996).

2.2.7.4.- DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

Histopatológicamente, *C. neoformans* tiene un diámetro mayor de 7 µm, pero la cápsula mucoide que le rodea puede estar por encima de 30 µm. Esta cápsula mucoide es una estructura característica en los tejidos. El microorganismo casi siempre es incoloro y difícil de observar tinciones rutinarias con hematoxilina y eosina (H-E). Las tinciones de metenamina plata o del ácido periódico de Schiff (PAS) demarcan claramente el microorganismo y permiten el reconocimiento de su tamaño y formas características y su identificación como un microorganismo levaduriforme que se reproduce por formación de brotes de base angosta. *C. neoformans* también puede ser distinguido de otros hongos levaduriformes y de los artefactos mediante la tinción de mucicarmín de Mayer, que colorea la cápsula criptocócica de rojo o rosado, pero no tiñe otros hongos que tienen características morfológicas similares. La cápsula puede también teñirse con

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

azul alcián. También puede utilizarse la tinción argéntica de Masson-Fontana para melanina como tinción específica para el diagnóstico histológico de criptococosis (Kwon-Chung y cols., 1981; Pérez y Carrasco, 2000). Con la tinción de Gram se muestra una cápsula de color rojo (Nelson y Couto, 2000).

2.2.7.5.- PRUEBAS DE DETECCIÓN DEL ANTÍGENO CAPSULAR. PRUEBA DE LÁTEX

Entre las técnicas basadas en la detección de componentes fúngicos, está la detección del antígeno capsular del *C. neoformans* por la técnica de aglutinación de partículas de látex, que es útil en las muestras de suero, LCR, orina e incluso en muestras respiratorias. Es una prueba que tiene alta sensibilidad y especificidad y está comercializada, pero hay que ser cautos en su interpretación. Se han descrito resultados falsos positivos debidos a la presencia de factor reumatoide, *Trychophyton beigelii*, *Capnocytophaga canimorsus*, y en el suero de enfermos con septicemia o neoplasias. Las placas donde se realiza la prueba deben estar libres de restos de desinfectantes y detergentes. También se conocen falsos negativos, a veces por el fenómeno de prozona, que se puede corregir diluyendo la muestra o tratándola con pronasa. La sensibilidad es superior al 90%, en los pacientes con SIDA es incluso mayor. Sin embargo, en este tipo de enfermos, se han descrito cepas de *C. neoformans* con poca cápsula en los que la concentración de antígeno puede ser anormalmente baja. La cuantificación del antígeno del *C. neoformans* es útil para controlar la evolución de la enfermedad, ya que el título desciende si la respuesta terapéutica es buena y aumenta días antes de que se produzca una recaída, especialmente en el LCR (Powderly y cols., 1994; Pontón, 2002; Cano Rangel y cols., 2002).

2.2.7.6.- TOMOGRAFÍA Y RESONANCIA MAGNÉTICA

El conglomerado de los hongos y el material gelatinoso que produce conforman lo que se conoce como pseudoquistes gelatinosos, pero que en efecto corresponden a los criptococomas que se ven en la TAC (Tomografía

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

axial computerizada) y en la RM (resonancia magnética) en los ganglios de la base, tálamo y mesencéfalo. Los criptococomas se ven en la RM como masas redondas e hipointensas (Provenzale y Jinkins, 1997).

2.2.7.7.- DIAGNÓSTICO MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Es una alternativa válida para el diagnóstico de las infecciones fúngicas, especialmente para aquellas cuyo diagnóstico es difícil con las técnicas convencionales. Estudios recientes muestran que la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica sensible y específica en muestras pulmonares y de LCR en medicina humana.

En veterinaria, en las últimas décadas la tecnología genético-molecular, también ha experimentado un espectacular crecimiento. La RAPD–PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction), consiste básicamente en la amplificación al azar de ADN polimórfico mediante el uso de cebadores de secuencia arbitraria y el uso de la PCR. Con esta técnica se ha podido diferenciar los diferentes serotipos de *C. neoformans* var. *neoformans* y *C. neoformans* var. *gattii*, así como distintas especies de candidas, procedentes de aislamientos de muestras clínicas y/o ambientales (Torres Rodríguez y cols., 1999; Sansinforiano y cols., 2001).

2.2.8.- TRATAMIENTO

El descubrimiento de la Anfotericina B (AFB), en 1956, proporcionó la primera quimioterapia con buenos resultados (Pitisuttithum y cols., 2001), no obstante, la mayor dificultad con el uso de AFB es su perfil de toxicidad. La afectación renal es la reacción adversa más frecuente tras el uso de este medicamento y se puede observar en el 80% de los casos que la utilizan; además esta reacción se incrementa con la terapia concurrente con otras drogas nefrotóxicas (Carlson y Condon, 1994).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Existen diversas combinaciones posibles en relación al tratamiento de esta enfermedad, no obstante, actualmente, el tratamiento de elección es la anfotericina B a dosis de 0.7-1 mg/kg/día durante 2 semanas o hasta alcanzar una dosis acumulada de 1 ó 2 g seguido de fluconazol 400 mg al día durante 6-8 semanas. El tratamiento combinado con 5-fluorocitosina no ha demostrado beneficio clínico añadido. No se ha demostrado que la combinación anfotericina B liposómica y anfotericina B complejo lipídico sea de mayor eficacia pero sí su menor nefrotoxicidad con respecto a la anfotericina B. Otra alternativa terapéutica es el tratamiento combinado de fluconazol y 5-fluorocitosina, donde se han observado tasas de curación elevadas (60-80%). El tratamiento de la criptococosis y la quimioprofilaxis secundaria son a menudo imposibles en los países en desarrollo o subdesarrollados debido al elevado costo y la escasa disponibilidad de los fármacos requeridos, y a la necesidad de tratamiento hospitalario y monitorización (Miller, 1999; Santamaría y Zubero, 2002).

Los pacientes infectados por *C. neoformans* var. *gattii* requieren tratamientos más prolongados pues son más resistentes a la terapia convencional. También necesitan más terapia intratecal, procedimientos quirúrgicos y/o resecciones pulmonares (Speed y Dunt, 1995). La mayor duración de la terapia para hospedadores no inmunosuprimidos con infecciones por var. *gattii* parece estar relacionada con una alta tasa de complicaciones, respuesta lenta y anormalidades clínicas persistentes (Casadevall y Perfect, 1998).

La curación completa de la criptococosis en un paciente infectado por el VIH es muy difícil, ya que a pesar de la curación clínica el criptococo persiste en el LCR, plasma o próstata, por lo que el objetivo en estos pacientes debe ser controlar la infección y mantener la profilaxis secundaria de por vida para evitar recidivas (Dismukes, 1993), pues la frecuencia de recurrencia llega al 70% (Iñigo García y cols., 1996). El itraconazol puede ser una alternativa aunque se considera que el fluconazol es más efectivo en la prevención de las recaídas.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Sin embargo, a partir de 1990 la frecuencia de esta enfermedad ha ido disminuyendo en Europa y América tras el advenimiento de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) y los tratamientos profilácticos diseñados para prevenir las infecciones fúngicas, de tal forma que la inmunosupresión originada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), necesaria para que *Cryptococcus neoformans* infecte, se retrasa indefinidamente (Kwon-Chung y cols., 2000; Manfredi, 2000; Quindós, 2002; Shelburne y Hamill, 2003). Al respecto, en nuestro país, la incidencia actual de esta enfermedad tras la introducción de estos tratamientos antirretrovirales ha disminuido desde 0.67 casos por millón de habitantes en 1998 a 0.35 casos por millón de habitantes en 1999 (Colom y cols., 2001).

En patología veterinaria, la respuesta al tratamiento de la criptococosis nasal, respiratoria y cutánea es buena, especialmente si se detecta en los estadíos iniciales de la enfermedad. Los gatos responden mal a la terapia cuando manifiestan síntomas nerviosos. Se recomienda el uso de imidazoles durante al menos 30 días. El itraconazol es el más efectivo y menos tóxico, el fluconazol también ha dado buenos resultados, no obstante, el inconveniente es el alto coste de ambos. Recientemente se ha ampliado el uso de la flucitosina y el de la anfotericina B. Cuando se administra esta última, debe valorarse la función renal dada su nefrotoxicidad y disminuir la dosificación si se observan signos de insuficiencia renal. Se debe administrar en infusiones lentas intravenosas respetando la dosis de 0.5-0.8 mg/Kg, de 2 a 3 veces por semana diluída en solución salina de dextrosa, a razón de 400 ml para gatos y 500 ml para los perros. La duración del tratamiento es de aproximadamente 4-6 semanas en el caso de los gatos y de 6 a 8 para los perros. El ketoconazol es menos caro que el itraconazol y el fluconazol, pero su principal problema es que no penetra en el SNC. Dentro de los efectos adversos que se pueden presentar por el uso del ketoconazol es la hepatotoxicidad que produce y la anorexia. En un principio se puede usar una combinación de anfotericina B y flucitosina o anfotericina B con ketoconazol para seguir posteriormente con la administración de ketoconazol sólo. Para evaluar la eficacia del tratamiento, se puede usar el test que

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

detecta el antígeno polisacárido capsular (Legendre y Berthelin, 1995; Hungerford y cols., 1998).

2.2.9.- PROFILAXIS

Prevenir la exposición a *Cryptococcus neoformans* es una utopía. Ya que no se puede evitar el contacto con el hongo, es aconsejable, sobre todo en los pacientes en riesgo, evitar los lugares potencialmente contaminados por el hongo, en particular aquellos con abundantes deyecciones de palomas, aunque ninguna evidencia clara sustenta esta recomendación. En los enfermos con un recuento de linfocitos CD4 <100/ml, la administración profiláctica de fluconazol disminuye la morbilidad de micosis sistémicas, entre ellas la criptococosis (Powderly y cols., 1995). Sin embargo, la aparición de resistencias, la escasa frecuencia de la criptococosis, los efectos adversos de la medicación y su utilidad en el tratamiento de otras micosis, hacen que no se recomiende rutinariamente la profilaxis primaria de la criptococosis (Iñigo García y cols., 1996).

Es recomendable que estos pacientes eviten el contacto con este tipo de ambientes y que nunca realicen personalmente la limpieza de palomares, gallineros o desvanes, para evitar la inhalación de este hongo (Blaschke-Hellmessen, 2000).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Material y Métodos

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES LEVADURIFORMES DE INTERÉS CLÍNICO AISLADAS MÁS FRECUENTEMENTE EN PALOMARES DE LA ISLA DE GRAN CANARIA.

3.1.1.- MUESTREO

La isla de Gran Canaria cuenta con una gran población colombófila. Sólo en esta isla, la población de palomas mensajeras existente a fecha 31 de Diciembre de 1.999 era de 59.359 animales, distribuidas en 17 sociedades colombófilas por los diferentes municipios de la isla, con una media de 42 palomares por club. El número total de palomares oficialmente reconocidos existentes en la isla de Gran Canaria es de 720. A continuación se detallan dichos datos en la Tabla 8.

CLUB COLOMBÓFILO	PALOMARES	PALOMAS
LA PALOMA MENSAJERA	72	5.149
ALAS DEL NUBLO	71	5.521
CIUDAD ALTA	33	3.062
FONDO GUANARTEME	68	5.879
ARUCAS	27	2.250
NOROESTE	35	3.010
LAS PALMAS	25	2.318
GRUPO GRAN CANARIA	79	7.814
VICT. MENS. COLORADAS	18	1.439
SAN JOSE	103	7.838
DORAMAS	37	3.771
REAL DE GRAN CANARIA	50	3.666
RECREATIVO LA PAZ	33	2.058
LA LUZ	23	1.517
UNIÓN DEL RISCO	15	1.131
ANSITE	11	888
GUAYADEQUE	20	2.048
TOTALES	720	59.359

Tabla 8.- Nº de palomares y palomas existentes en cada uno de los clubes colombófilos de la isla de Gran Canaria

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Para poder realizar los estudios estadísticos oportunos, necesitábamos conocer un censo fiable de palomas controladas existentes en la isla de Gran Canaria. En España, todas las palomas mensajeras dependen del Ministerio de Defensa, que tiene censadas a todas las palomas, tanto militares como de competición. El Ejército Español tiene su propio servicio colombófilo dotado de palomares en diversas provincias, componiendo las llamadas líneas militares de colombofilia. Por esta razón y debido a la urgencia de comenzar el presente estudio, acudimos a esta fuente de información para obtener un censo de palomas y de palomares totalmente fiable. Concretamente nos fue facilitado por el Batallón de Transmisiones de Servicios Especiales (El Pardo, Madrid). Posteriormente, estos datos fueron corroborados por la Real Federación Española de Colombofilia.

Canarias es una de las Comunidades Autónomas con mayor número de palomas mensajeras de España. El censo de palomas y palomares en nuestra Comunidad Autónoma se distribuye tal como indica la Tabla 9. Gran Canaria ocupa el segundo puesto dentro de la colombofilia de nuestra Comunidad Autónoma.

ISLA	PALOMARES	PALOMAS	CLUB
TENERIFE	950	82.476	25
LA PALMA	145	9.734	3
LA GOMERA	67	4.721	2
GRAN CANARIA	720	59.359	17
FUERTEVENTURA	89	7.442	2
LANZAROTE	99	6.785	3
EL HIERRO	0	0	0
TOTAL	2.070	170.517	52

Tabla 9.- Número de palomares y de palomas existentes en cada una de las Islas Canarias, así como el número de clubes colombófilos con los que cuenta cada una de ellas.

Para establecer el tamaño de la muestra del presente estudio, se realizó un muestreo probabilístico en el que la selección de la muestra fue realizada mediante un proceso aleatorio a dos niveles, conocido como muestreo

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

multiestadío, lo que permite que cada grupo (palomar) y cada unidad del grupo (paloma), tenga la misma probabilidad de ser seleccionado, y por tanto nos evitará que exista un sesgo de selección. Se trabajó a partir de los 17 clubes colombófilos reconocidos oficialmente en la isla de Gran Canaria, que engloba un total de 720 palomares. Para estimar la prevalencia de la infección en palomares con una cota de error máximo del 10% y para una probabilidad del 95% hemos tomado una muestra de 86 palomares. En el diseño inicial de la muestra, para estimar la prevalencia de la infección en palomas (buche y cloaca), con un error máximo del 6% para una probabilidad del 95%, debían tomarse 3 palomas por palomar. No obstante, durante el muestro fue posible aumentar el tamaño muestral tomando de 3 a 5 palomas en cada palomar, contabilizándose finalmente un tamaño muestral de 331 palomas, lo que nos permite estimar la prevalencia de la infección en la población de palomas con un error máximo del 5.4% con una probabilidad del 95%. De cada paloma se obtuvo una muestra de buche y otra de cloaca. La distribución por clubes del presente estudio ha sido realizada tal como se expone a continuación:

- Club colombófilo La Paloma Mensajera con un total de 72 palomares: se han muestreado 9 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 27.
- Club colombófilo Alas del Nublo con un total de 71 palomares: se han muestreado 9 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 27.
- Club colombófilo Ciudad Alta con un total de 33 palomares: se han muestreado 9 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 27.
- Club colombófilo Fondo Guanarteme con un total de 68 palomares: se han muestreado 5 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 15.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

- Club colombófilo Arucas con un total de 27 palomares: se han muestreado 3 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 9.
- Club colombófilo Noroeste con un total de 35 palomares: se han muestreado 4 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 12.
- Club colombófilo Las Palmas con un total de 25 palomares: se han muestreado 10 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 30.
- Club colombófilo Grupo Gran Canaria con un total de 79 palomares: se han muestreado 5 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 15.
- Club colombófilo Victorias Mensajeras con un total de 18 palomares: se ha muestreado 1 palomar, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 3.
- Club colombófilo San José con un total de 103 palomares: se han muestreado 12 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 36.
- Club colombófilo Doramas con un total de 37 palomares: se han muestreado 5 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 15.
- Club colombófilo Guayadeque con un total de 20 palomares: se han muestreado 2 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 6.
- Club colombófilo Real de Gran Canaria con un total de 50 palomares: se han muestreado 6 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 18.
- Club colombófilo Recreativo de La Paz con un total de 33 palomares: No se ha muestreado.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

- Club colombófilo La Luz con un total de 23 palomares: se han muestreado 3 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 9.
- Club colombófilo Unión del Risco con un total de 15 palomares: se ha muestreado 1 palomar, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 3.
- Club colombófilo Ansite con un total de 11 palomares: se han muestreado 2 palomares, el tamaño muestral mínimo requerido de palomas según el estudio estadístico ha sido de 6.

El número de muestras recogidas en los diferentes palomares queda reflejado en la Tabla 10. Para completar el estudio, hemos analizado muestras de excrementos que se recogieron en localizaciones elegidas al azar en el interior de los palomares y que posteriormente fueron homogeneizadas de forma conjunta como muestra representativa de un solo palomar (Tabla 10).

CLUB COLOMBÓFILO	Nº MUESTRAS DE BUCHE	Nº DE MUESTRAS DE CLOACA	Nº DE MUESTRAS DE HECES	Nº PALOMARES MUESTREADOS
LA PALOMA MENSAJERA	32	32	32	9
ALAS DEL NUBLO	36	36	15	9
CIUDAD ALTA	26	26	26	9
FONDO	20	20	11	5
GUANARTEME				
ARUCAS	12	12	3	3
NOROESTE	16	16	7	4
C. LAS PALMAS	39	39	10	10
GRUPO GRAN CANARIA	26	26	9	5
VICTORIAS MENSAJERAS	4	4	1	1
SAN JOSE	40	40	19	12
DORAMAS	20	20	17	5
GUAYADEQUE	12	12	4	2
REAL DE GRAN CANARIA	22	22	6	6
RECREATIVO DE LA PAZ	0	0	0	0
LA LUZ	11	11	3	3
UNION DEL RISCO	5	5	2	1
ANSITE	10	10	9	2
TOTAL	331	331	174	86

Tabla 10.- Nº total de muestras de buche, heces y cloaca recogidas por club, así como el nº total de palomares muestreados.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

En la Figura 9 queda reflejada la distribución de los palomares muestreados por municipios.

Figura 9.- Distribución por municipios de los de palomares muestreados en la isla de Gran Canaria

De los 86 palomares, 67 estaban localizados en el municipio de Las Palmas de Gran Canaria. En él, se concentra la mayor parte de la actividad colombófila de la isla. Los 19 palomares restantes se localizaron en el resto de municipios. Los nueve distritos con los que cuenta el municipio de Las Palmas de Gran Canaria han sido agrupados en 4 zonas debido a su proximidad geográfica y similitud climática; estas zonas han sido denominadas 1, 2, 3 y 4 tal y como se observa en la Figura 10:

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

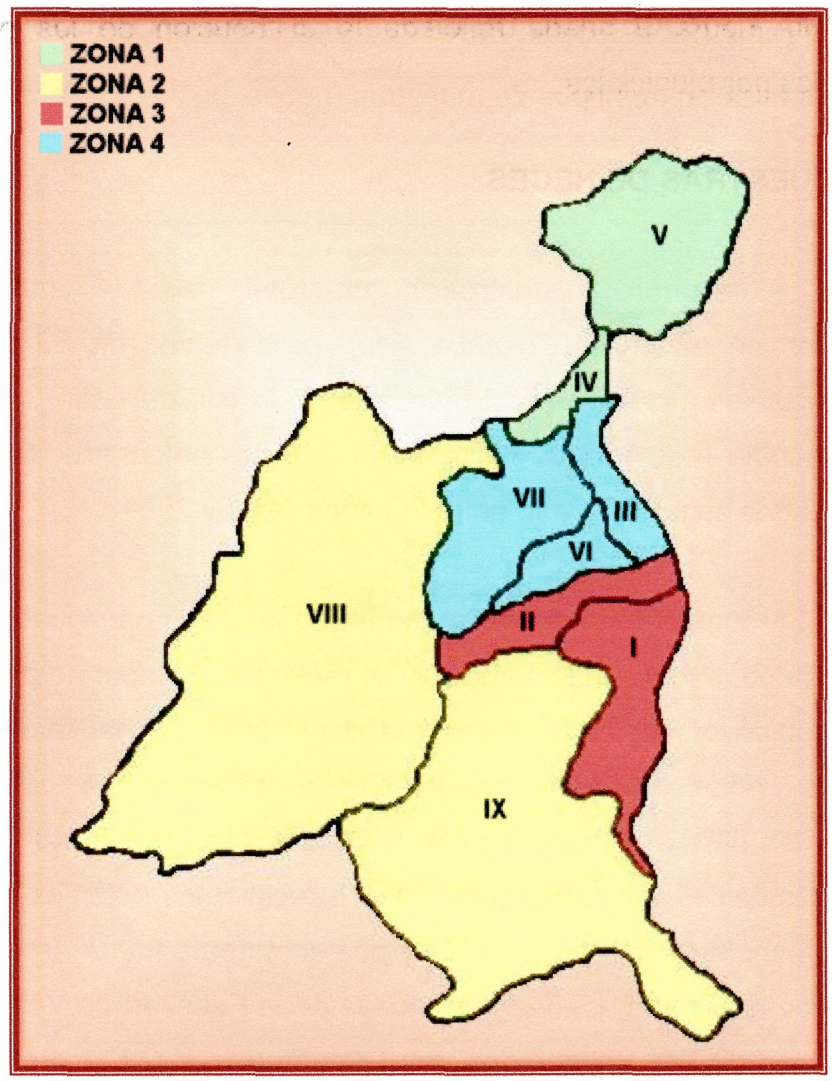


Figura 10.- Plano de los diferentes distritos de la ciudad de Las Palmas de Gran Canaria.

Dicha distribución queda reflejada en la Tabla 11.

ZONAS	LOCALIZACIÓN	Nº DE PALOMARES MUESTREADOS	DISTRITOS
1	Santa Catalina-Isleta	17	IV+V
2	Tamaraceite-Tafira	16	VIII+IX
3	Vegueta-Triana	21	I+II
4	Arenales-Schamann-Escaleritas	13	III+VI+VII

Tabla 11.- Palomares muestreados en las diferentes zonas que agrupan los distintos distritos del municipio de Las Palmas de Gran Canaria

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

3.1.2.- TOMA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS EN PALOMARES

Se analizaron tres tipos de muestras (heces, buche y cloaca).

3.1.2.1.- MUESTRAS DE HECES

Se recolectaron y analizaron un total de 174 muestras de excrementos de palomas (*Columba livia*), procedentes de 83 de los 86 palomares totales incluidos en el muestreo de la isla de Gran Canaria. No pudimos recoger muestras de excretas en 3 de los palomares. La recogida de las muestras se llevó a cabo entre los años 1999 y 2001.

En la recogida de muestras se preferían las heces antiguas y secas o moderadamente secas, desechándose las recientes. El lugar de predilección para la recogida lo constituía, en cada caso, el interior del habitáculo del ave, donde los rayos solares no incidiesen directamente. Las heces seleccionadas para el estudio, fueron recogidas con la ayuda de espátulas de madera estériles y fueron contenidas en recipientes estériles tal y como describen Mangiarotti y cols. en 1993 y posteriormente fueron transportadas al laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (U.L.P.G.C.), procesándose en un plazo máximo de 8 horas. El peso de cada muestra, no superaba los 20-30 gr. Todo el material colectado se mantuvo en condiciones de refrigeración hasta su procesado en el laboratorio.

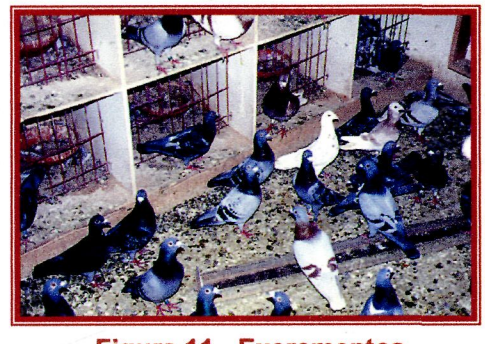


Figura 11.- Excrementos acumulados en un palomar

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Las excretas se sembraron empleando diluciones (10^{-2}-10^{-3}), de 2 gramos de heces en 10 cc de suero fisiológico estéril. La primera dilución (10^{-2}) del suero fisiológico contenía además una concentración de cloranfenicol de 0.2 mgr/ml (Laboratorios Sigma) y se dejaba decantar durante 30 minutos, antes del inicio de la segunda y tercera dilución. Las dos últimas diluciones de cada muestra, se sembraron empleando cuatro medios de cultivo diferentes. Tras agitación, se sembró una cantidad de 0.2 ml de cada una de las dos suspensiones en la superficie de cuatro medios de cultivo por duplicado: Agar Glucosado de Sabouraud (Cultimed) con cloranfenicol (50 mg/ml) o sin la adición de cloranfenicol, Agar Malta (Cultimed) y Agar de Staib (Agar *Guizotia abyssinica*-Creatinina o Agar semilla de Niger) (Ver Apdo. 3.4).

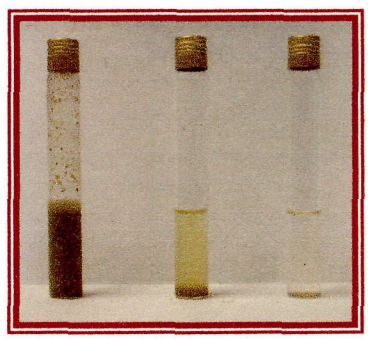


Figura 12.- Heces en solución salina estéril

3.1.2.2.- MUESTRAS DE BUCHE

En nuestro estudio, se analizaron un total de 331 muestras de buche, procedentes de 82 de los 86 palomares totales incluidos en el muestreo de la isla de Gran Canaria. La recogida de las muestras se llevó a cabo entre los años 1999 y 2001. Cuatro colombófilos no nos permitieron analizar muestras de buche de sus palomas.

Las muestras de buche se obtuvieron *in vivo* y fueron recogidas con hisopos de algodón estériles, entubados que llevaban incorporados un

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

medio de transporte para su mejor conservación (Eurotubo®, Rubi). El hisopo fue introducido vía oral hasta el buche del ave, frotándose contra la mucosa y posteriormente fue introducido en el tubo que porta el medio de transporte, manteniéndose en refrigeración hasta el momento de su procesado en el laboratorio.

Figura 13.- Recogida de muestra de buche

Una vez en el laboratorio, las muestras se sembraron en los mismos medios de cultivo utilizados para la siembra de las heces (Ver Apdo 3.1.2.1) por duplicado. Posteriormente, las placas se observaron diariamente hasta observar crecimiento levaduriforme durante un periodo de 3 a 7 días.

3.1.2.3.- MUESTRAS DE CLOACA

Se analizaron un total de 331 muestras de cloaca, procedentes de 82 de los 86 palomares totales incluidos en el muestreo de la isla de Gran Canaria; en este caso, 4 colombófilos no nos permitieron tomar muestras de las cloacas de sus palomas. La recogida de las muestras se llevó a cabo entre los años 1999 y 2001. Se trataba de las mismas palomas utilizadas en la recogida de muestras de buche.

Las muestras fueron tomadas con la ayuda de hisopos de algodón estériles, entubados con un medio de transporte (Eurotubo®, Rubi), los cuales fueron introducidos en la cloaca del animal (Mattsson y cols., 1999),

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

previa limpieza de la zona. Se gira el hisopo, poniéndolo en contacto con la mucosa intestinal o cloacal. Posteriormente, las muestras fueron conservadas en refrigeración hasta su procesado en el laboratorio.

Figura 14.- Recogida de muestra de cloaca

Una vez en el laboratorio, las muestras se sembraron en los mismos medios utilizados para la siembra de las heces (Ver Apdo 3.1.2.1) por duplicado. Posteriormente las placas se fueron observando diariamente hasta observar crecimiento levaduriforme durante un periodo de 3 a 7 días.

3.2.- DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES LEVADURIFORMES AISLADAS MÁS FRECUENTEMENTE DE LAS PLAZAS PÚBLICAS DE LA ISLA DE GRAN CANARIA CON UNA POBLACIÓN SIGNIFICATIVA DE PALOMAS Y/O TÓRTOLAS

3.2.1.- MUESTREO

Para nuestro estudio hemos realizado un muestreo de conveniencia basándonos en los municipios cuyo clima fuera el más adecuado para el desarrollo y viabilidad en condiciones ambientales de *Cryptococcus* spp. (género levaduriforme en el que se centra nuestro estudio), así como la presencia de palomas y/o tórtolas en sus plazas públicas. Por lo tanto, teniendo presente estas características, hemos centrado nuestro estudio en la zona centro-norte de la isla de Gran Canaria y en el municipio de Telde, considerando este último de interés, por ser tras el municipio de Las Palmas

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

de Gran Canaria, el que mayor población colombófila presenta en la isla, adecuándose también su clima para el posible desarrollo de estas especies levaduriformes. Los municipios que han entrado a formar parte del presente estudio son los siguientes: Agaete, Arucas, Firgas, Gáldar, Moya, Las Palmas de Gran Canaria, Santa Mª de Guía, Telde y Teror. No obstante, el municipio de Moya, aún encontrándose en la zona de estudio no pudo ser muestreado por carecer de plazas públicas con una población mínima de palomas o tórtolas.

Para la realización del presente estudio muestreamos un total de 17 plazas públicas distribuidas por los distintos municipios anteriormente nombrados: 9 en el municipio de Las Palmas de Gran Canaria, 2 en Telde, 1 en Arucas, 1 en Firgas, 1 en Teror, 1 en Agaete, 1 en Guía y 1 en Gáldar (Figura 15).

Figura 15.- Plano de los diferentes municipios de la isla de Gran Canaria. Nº de plazas públicas muestreadas en los diferentes

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

3.2.2.- TOMA Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS EN PLAZAS PÚBLICAS

3.2.2.1.- MUESTRAS DE HECES

Se recolectaron y analizaron un total de 17 muestras de excretas de palomas (*Columba livia*) y/o tórtolas (*Streptopelia turtur*) de 17 plazas públicas de la isla de Gran Canaria. La recogida de las muestras se llevó a cabo exactamente igual que en el caso descrito en el apartado 3.1.2.1, teniendo en cuenta que en este caso se seleccionaron las excretas que estaban situadas en zonas umbrías.

3.3.- ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS CEPAS OBTENIDAS EN 3.1 Y 3.2.

Se procedió a estudiar todas las muestras recogidas para el desarrollo del trabajo (excretas de palomas de plazas y palomares, y muestras de buche y cloaca de palomas existentes en los palomares). En todos los casos, estas muestras se obtuvieron con las máximas condiciones de asepsia, en recipientes estériles, y fueron conservadas en refrigeración hasta su procesamiento.

3.3.1.- AISLAMIENTO

Tras la siembra en los diferentes medios de cultivo (Ver Apdo 3.1.2.1), la incubación se realizó a 30°C y 37ºC. Diariamente, se realizó un control del crecimiento de las placas. Aquellas en las que no se observó crecimiento durante el mes y medio siguiente a la fecha de la siembra, se consideraron negativos.

Las colonias levaduriformes se estudiaron observando en primer lugar su morfología microscópica, utilizando para ello la tinción de Gram (Carter, 1969) para observar la forma, tamaño y tipo de gemación. Posteriormente fueron identificadas mediante el uso del sistema comercial API 20 C AUX

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

(BioMérieux, Madrid, España). La galería API 20 C AUX, se compone de 20 cúpulas con sustratos deshidratados que permiten realizar 19 tests de asimilación. Los sustratos a los que se enfrentaron las cepas problemas, son los siguientes: Glucosa, Glicerol, 2-Ceto-D-Gluconato, L-Arabinosa, D-Xylosa, Adonitol, Xylitol, Galactosa, Inositol, Sorbitol, α-Metil-D-Glucósido, N-Acetil-D-Glucosamina, Celobiosa, Lactosa, Maltosa, Sacarosa, Trehalosa, Melezitosa y Rafinosa. La inoculación de dicha galería se realizó según protocolo y la interpretación y lectura de los resultados mediante el Programa informático APILAB Plus V3.3.3.

Asimismo, todas las cepas fueron sembradas en el medio de Agar Harina de maíz (Oxoid) al que le fue adicionado Tween 80 a una concentración final de 0.02% para reducir la tensión superficial y aumentar la formación de pseudohifas y blastoconidias. La inoculación se realizó según la técnica de Dalmau descrita por Koneman y cols. (1999).

Las cepas identificadas como *Cryptococcus neoformans* se sometieron a las siguientes pruebas de identificación y biotipificación:

- Identificación morfológica (Tinta china)
- Capacidad de crecimiento a 37ºC
- Identificación de *Cryptococcus neoformans* por métodos enzimáticos
  - Detección de ureasa
  - Actividad fenoloxidasa
  - Asimilación del nitrógeno del nitrato potásico
- Test de resistencia a la actidiona o cicloheximida (GCP)
- Siembra en Canavanina Glicina Azul de bromotimol (CGB)
- Producción de amiloides en medio de Aschner (Hermoso de Mendoza., 1984 A)
- Pruebas de termotolerancia

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Las cepas identificadas como *C. albicans* fueron confirmadas mediante la utilización del medio de cultivo conocido como Candida ID (Biomérieux).

3.3.2.- IDENTIFICACIÓN

Para la identificación de las cepas hemos empleado los siguientes criterios:

- **Identificación morfológica**

Las distintas cepas de criptococos fueron sometidas a una tinción de tinta china (Carter, 1969), intentando evidenciar la cápsula de *C. neoformans*, como un halo claro y bien delimitado, de 2 a 10 µm, que rodea completamente a la célula fúngica, la cual destaca por la refringencia de su pared. Para esta tinción, llevamos un asa de las levaduras a una gota de agua destilada con tinta china en un portaobjeto. La experiencia indica la cantidad de tinta china que debe usarse. Cubrimos con un cubreobjeto y examinamos la preparación. La presencia de formas redondas rodeadas de un halo grande y transparente, indican la presencia de *C. neoformans*.

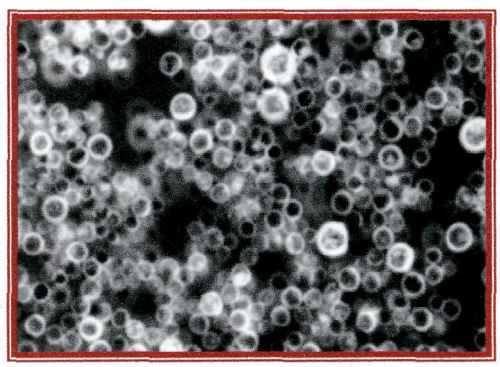


Figura 16.- Cápsulas de *Cryptococcus neoformas*. Tinta china

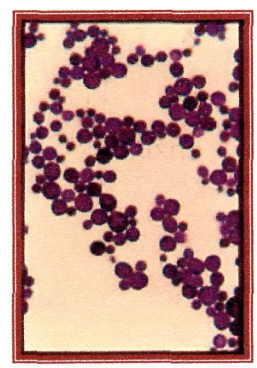


Figura 17.- Tinción de Gram. *Cryptococcus neoformans*

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

❖ **Capacidad de crecimiento a 37ºC**

La capacidad de crecimiento a 37ºC se demuestra a través del aislamiento de las cepas a dicha temperatura tras su incubación en la estufa durante 24-48 horas.

Figura 18.- *Cryptococcus neoformans* en Sabouraud con cloranfenicol

❖ **Identificación de *Cryptococcus neoformans* por métodos enzimáticos**

▪ **Detección de ureasa**

A todas las cepas identificadas como *C. neoformans* y *Cryptococcus* spp. se les realizó la prueba de la ureasa. Para ello, usamos el medio de agar urea de Christensen. Las cepas ureasa positivas hacen virar en pocos días el indicador de pH, adquiriendo el medio de cultivo un color rojizo. Se efectúa la siembra a partir de un crecimiento de 48 horas de Agar Glucosado de Sabouraud transfiriendo con un asa estéril una parte de la colonia levaduriforme purificada al Agar Urea de Christensen. Se incuba a una temperatura de 25ºC durante 48 horas. Se consideraron positivas aquellas placas que mostraron una coloración rosa-rojo en dicho tiempo. Usamos la cepa 1001 de *C. albicans* de la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) como control negativo.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

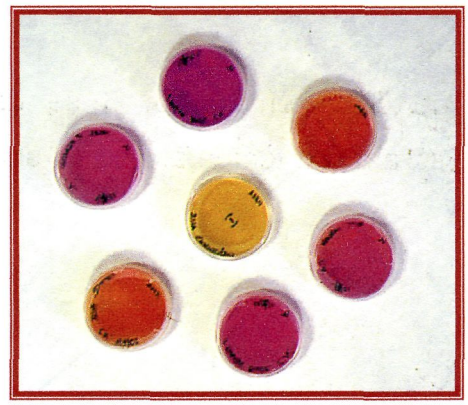


Figura 19.- Prueba de la ureasa

- **Actividad fenoloxidasa**

Los cultivos en medio Agar *Guizotia* se observaron diariamente en busca de colonias capaces de producir pigmento castaño, criterio inicial en la identificación (Staib y cols., 1987).

El desarrollo de una pigmentación marrón oscura alrededor del crecimiento es característico de *Cryptococcus neoformans*. Podemos observar dicha capacidad sobre el medio de Agar *Guizotia abyssinica* en las Figuras 20 y 21.

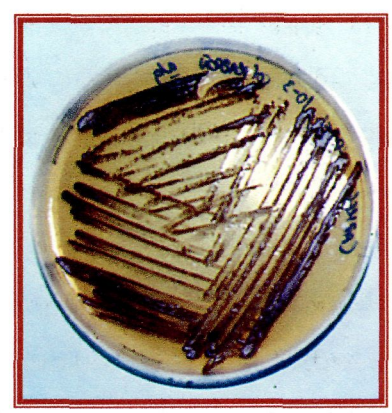


Figura 20 y 21.- *Cryptococcus neoformans* en Agar *Guizotia abyssinica*

Se empleó como control positivo la cepa de referencia de *C. neoformans* var. *neoformans* (CECT 1078) y como control negativo la cepa CECT 1001 de *C. albicans*.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

- **Asimilación del nitrógeno del nitrato potásico**

Sembramos en la superficie del medio inclinado con asa de siembra a partir de una suspensión de turbidez equivalente al 2 de Mc Farland todas aquellas cepas obtenidas en nuestro estudio y que fueron identificadas como *C. neoformans* y *Cryptococcus* spp. Usamos cultivos de 48 horas en Agar Glucosado de Sabouraud e incubamos a 30ºC para posteriormente leer a las 96 horas. Todas las cepas que asimilaron el nitrato crecieron en dicho medio. Como control positivo se empleó *C. albidus* CECT 1072 y como control negativo *C. neoformans* CECT 1078.

❖ **Test de resistencia a la actidiona o cicloheximida (GCP)**

Evaluamos la resistencia o no a la cicloheximida de todas las cepas identificadas como *C. neoformans* sobre el medio GCP (glicina cicloheximida rojo de fenol) de Salkin y Hurd (1982). Para ello, sembramos en dicho medio a partir de una suspensión con una turbidez equivalente al número 2 de la escala de Mc Farland de cultivos de 48 horas en Agar glucosado de Sabouraud. Incubamos a 25ºC, de 5 a 7 días.

La variedad *gatti* tolera el nivel de cicloheximida incorporado en este medio y crece utilizando la glicina como fuente de carbono. Esta decarboxilación alcaliniza el medio virando a rojo. Sin embargo, la variedad *neoformans* no tolera la cicloheximida y por lo tanto no crece ni altera el medio. Se empleó como control negativo una cepa de referencia de *C. neoformans* var. *neoformans* (CECT 1078) y como control positivo una cepa de referencia de *C. neoformans* var. *gattii* cedida por el Dr. Miguel Hermoso de Mendoza Salcedo (Facultad de Veterinaria de la UEX, Cáceres).

❖ **Siembra en Canavanina Glicina Azul de bromotimol (CGB)**

Con la finalidad de determinar la variedad a la que pertenecen todos los aislamientos identificados como *C. neoformans*, realizamos la siembra de todas las cepas identificadas como tales sobre el medio CGB, el cual fue preparado tal y como describen Kwon-Chung y cols. en 1982. Sembramos en estría a partir de suspensiones preparadas equivalentes al 2 de la escala

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

de Mc Farland, de cultivos de 48 horas en Agar Glucosado de Sabouraud. Tras la siembra, incubamos a 25ºC, de 5 a 7 días.

La prueba se considerará positiva si se produce un cambio de color de amarillo (pH 5,8) a azul intenso (pH > 7,0) en el periodo de tiempo previamente descrito. Se empleó como control negativo una cepa de referencia de *C. neoformans* var. *neoformans* (CECT 1078) y como control positivo una cepa de referencia de *C. neoformans* var. *gattii*.

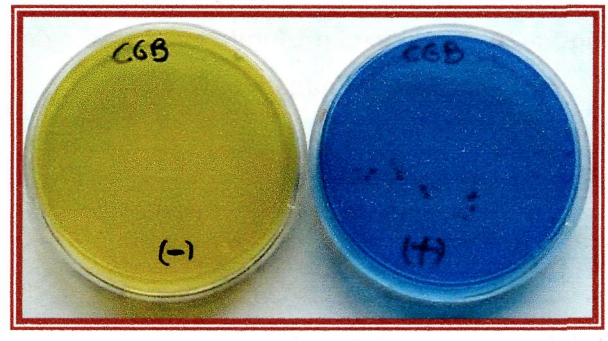


Figura 22.- Medio de canavanina glicina azul de bromotimol

C. neoformans var. gattii tolera la L-canavanina hasta concentraciones de 960 mcg/ml, y por lo tanto puede crecer utilizando la glicina como fuente de carbono, lo que alcaliniza el medio, virando a azul cobalto. Sin embargo, la variedad *neoformans* es sensible a la L-canavanina y es incapaz de utilizar la glicina como única fuente de carbono y por lo tanto ni crece ni produce alteraciones en dicho medio (Hermoso de Mendoza, 1984; Mitchell y Perfect, 1995).

❖ Producción de amiloides en medio de Aschner

Sembramos con asa de siembra, a partir de cultivos de 48 horas en Agar Glucosado de Sabouraud, en medio de Aschner e incubamos a 30ºC durante un periodo de 14 días. Todas las levaduras del Género *Cryptococcus*, producen sustancias análogas al almidón en menos de 14 días. Pasado dicho tiempo, adicionamos unas gotas de lugol al medio, de tal forma que la presencia de compuestos análogos al almidón, tiñen el medio de un color azul profundo (Hermoso y cols., 1984 A). Como control negativo empleamos la cepa CECT 1001 de *C. albicans*.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

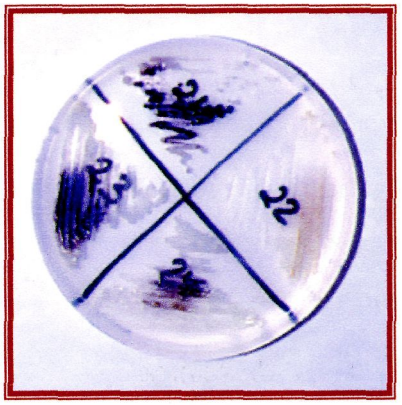


Figura 23.- Color azul profundo en el medio de Aschner.
Control negativo: *C. albicans*

❖ **Pruebas de termotolerancia**

La tolerancia térmica se realizó a las distintas especies de criptococos y se determinó mediante la exposición de los cultivos obtenidos a 37, 39 y 42ºC durante 48 horas, en un ambiente húmedo. Para ello, usamos el medio Glucosado de Sabouraud (Cultimed) en tubo inclinado, sembrando con un asa una suspensión previamente preparada equivalente al 2 de la escala de Mc Farland. Se cuantificó el crecimiento por turbidimetría (escala de Mc Farland) de una suspensión del cultivo en 10 ml de agua destilada estéril. Una turbidez igual o superior a 2 se consideró como crecimiento, una turbidez de 1 significó la supervivencia de la levadura y la ausencia de turbidez determinó efectos letales para la misma.

3.4.- Medios de cultivo

3.4.1.- AGAR DE STAIB (*Guizotia abyssinica* o Agar semillas de Niger)

Medio utilizado para aislar *Cryptococcus neoformans* por ser la única especie del Género que al metabolizar la *Guizotia abyssinica* (negrilla), produce melanina originando un color marrón oscuro. El cloranfenicol adicionado al medio lo convierte en un medio selectivo. Se utilizó la variante, propuesta por Swinne- Desgain en 1975, al medio original de Shields y Ajello en 1966 con los siguientes componentes:

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

- Glucosa (PANREAC)	20 g
- Creatinina (SIGMA)	1 g
- KH_2PO_4 (MERCK)	1 g
- Mg SO_4 (MERCK)	0.5 g
- Cloranfenicol (SIGMA)	1 g
- Difenilo (SIGMA)	1 g
- Agar (PANREAC)	15 g
- Extracto acuoso de *Guizotia abyssinica*	1000 g

La elaboración del medio se prepara como se describe a continuación: Molemos 50 gramos de semilla de negrilla (comprada en un establecimiento especializado en alimentación de aves), a la cual le añadimos 1.000 ml de agua destilada (Figura 24). Se somete a ebullición durante 20 minutos y a continuación colamos y filtramos para eliminar los residuos más groseros. Se reconstituye el volumen perdido hasta el original con agua destilada. Tras esto, ajustamos el pH hasta un valor de 6.0 y se añaden el resto de componentes a excepción del difenilo. Disolvemos por ebullición y esterilizamos a 110º C durante 15 minutos. El difenilo es insoluble en el agua y por lo tanto lo debemos disolver en 5 ml de alcohol etílico para añadirlo al medio fundido. Este paso lo debemos realizar previo a la esterilización. Una vez hecho, debemos conservarlo en condiciones de refrigeración (4ºC).

Figura 24.- Semilla de Niger en agitación

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

3.4.2.- NITRATO POTÁSICO

Se empleó el método descrito por Van Breuseghem en 1966.

- Bacto Yeast Carbon Base (DIFCO)	11.7 g
- NO_3K (MERCK)	1 g
- Bacto Agar (DIFCO)	20 g
- Agua destilada	1000 ml

Se funde por ebullición y se reparte 5 ml por tubo. Esterilizamos a 120ºC durante 15 minutos y posteriormente dejamos enfriar en posición inclinada.

3.4.3.- MEDIO GCP (GLICINA CICLOHEXIMIDA ROJO DE FENOL)

La composición del medio es la descrita por Salkin y Hurd en 1982.

SOLUCIÓN A:

- Glicina (SIGMA)	10 g
- Cicloheximida (SIGMA)	1,6 mg
- Yeast Nitrogen Base (DIFCO)	6 g
- Agua destilada	200 ml

Disolver, ajustar pH a 5,6 y esterilizar por filtración (MILLIPORE 0,45 μm).

SOLUCIÓN B:

- Rojo Fenol, sol. 0,5 % (PANREAC)	30 ml
- Bacto Agar (DIFCO)	20 g
- Agua destilada	70 ml

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Disolver por ebullición y esterilizar a 120ºC durante 15 minutos. Para preparar el medio completo, licuar la fase sólida B, manteniendo su temperatura a 45ºC, y añadir la solución A. Mezclar y verter en placas de Petri, a 10 ml por placa.

3.4.4.- MEDIO CGB (CANAVANINA-GLICINA-AZUL DE BROMOTIMOL)

La composición del medio es la descrita por Kwon-Chung y cols. (1982).

SOLUCIÓN A:

- L-Canavanina sulfato (SIGMA)	30 mg
- Glicina (SIGMA)	10 mg
- KH_2PO_4 (MERCK)	1 g
- Mg SO_4 (SIGMA)	1 g
- Tiamina HCl (SIGMA)	1 mg
- Agua destilada	100 ml

Disolvemos y ajustamos el pH a 5.6, para posteriormente esterilizar por filtración (MILLIPORE, 0.45 μm).

SOLUCIÓN B:

- Azul de bromotimol (PANREAC)	0.4 g
- Na OH (PANREAC) Solución 0.01 N	64 ml
- H_2O destilada	36 ml

A continuación, disolvemos 20 gramos de agar y 20 ml de la solución B en 880 ml de agua destilada y esterilizamos 15 minutos a 121ºC. Se deja enfriar a 45ºC y añadimos 100 ml de la solución A. Se mezcla todo bien y luego vertemos en placas de Petri.

Un test positivo en el medio CGB indica un cambio del pH de 5.8 ± 0.1 (amarillo verdoso) hasta al menos 7.0 (azul cobalto).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

3.4.5.- MEDIO DE ASCHNER

Se elabora tal y como describe Hermoso de Mendoza (1984 A). La composición es la siguiente:

- D(+) Glucosa (PANREAC)	10 g
- $SO_4(NH_4)_2$ (SIGMA)	1 g
- SO_4 Mg. $7H_2O$ (SIGMA)	0.5 g
- PO_4 H_2K (SIGMA)	1g
- Tiamina (SIGMA)	100 mcg
- Bacto Agar (DIFCO)	25 g
- Agua destilada	1.000 ml

El pH se ajusta a 4.5 con Cl H diluido, disolvemos por ebullición y servimos en placas de Petri. La esterilización se efectúa a 120ºC durante 15 minutos.

3.4.6.- AGAR UREA DE CHRISTENSEN

Composición:

- Peptona (PANREAC)	1 g
- Glucosa (PANREAC)	1 g
- ClNa (PANREAC)	5 g
- PO_4 KH_2 (MERCK)	2 g
- Rojo fenol (PANREAC)	12 mg
- Bacto Agar (DIFCO)	20 g
- Agua destilada	900 ml

Esterilizar los 900 ml de agar a 121ºC durante 15 minutos. Se añaden 100 ml de solución de urea (20% en agua, esterilizamos por filtración) a los 900 ml del medio enfriado a 50ºC. Dispensar en placas y dejar que se solidifique. El pH final debe ser 6.8 ± 0.2 (Pemán y cols., 2001).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

3.4.7.- CANDIDA ID (BIOMÉRIEUX, ESPAÑA)

Medio selectivo y cromogénico que ha sido utilizado para el aislamiento de levaduras e identificación inmediata de *C. albicans*. Permite el cultivo y el aislamiento de levaduras, la identificación de *C. albicans* y la orientación en la identificación sobre otras especies de levaduras.

El color azul que caracteriza las colonias de *Candida albicans* está ligado a la hidrólisis específica de un substrato cromogénico de hexosaminidasa en presencia de un inductor de la enzima. Una segunda actividad enzimática (sin interferencia con la actividad hexosaminidasa) permite diferenciar mejor los cultivos mixtos y orientar sobre la identificación de otras especies de candidas (Tabla 12). Las colonias que hidrolizan este substrato se pigmentan en rosa. La inhibición de la flora bacteriana se obtiene por adición de una mezcla selectiva no dada a conocer por Laboratorios BioMérieux. La lectura se realiza después de 24 a 48 horas de incubación. A las 24 horas, en caso de ausencia de crecimiento o en caso de presencia de colonias blancas, reincubar hasta 48 horas.

	Candida albicans	*C. tropicalis* *C. lusitaniae* *C. guilliermondii* *C. kefyr*	Otras levaduras
Coloración de las colonias	Azul pálido o azul oscuro	Rosa*	Blanco crema
Tamaño de las colonias	0.25 a 3 mm	0.25 a 3 mm	0.25 a 3 mm

Tabla 12.- Características cromogénicas de *Candida* spp. coloración después de 48 horas

La coloración de *C. guilliermondii* aparece normalmente después de 72 horas. La identificación de *C. albicans* con este medio es sencilla. Las colonias son redondeadas, ligeramente convexas, lisas, de borde neto y de color azul

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

(pálido u oscuro en función del tiempo de incubación). Esta coloración no difunde al medio.

Las colonias de *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* y *C. kefyr* se colorean de color rosa después de 48 horas. Ciertas especies como: *C. famata*, *C. humicola* y *Cryptococcus neoformans*, pueden en algunos casos dar colonias rosas más o menos intensas. Las colonias de otras especies de levaduras son de color blanco-crema y se realizará una identificación bioquímica en caso necesario.

Figura 25.- *Candida albicans* en Agar Glucosado de Sabouraud (izquierda) y en Candida ID (derecha).

3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.5.1.- VALORACIÓN ESTADÍSTICA DE LAS CEPAS DE *CRYPTOCOCCUS* SPP OBTENIDAS DE BUCHE, HECES Y CLOACA EN PALOMARES.

Las distintas cepas de *Cryptococcus* spp y *C. albicans* obtenidas de los estudios realizados en plazas públicas y palomares fueron procesadas utilizando dos programas estadísticos: SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 11.0 para Windows y el programa R (versión 1.8.0). Todos los datos fueron analizados bajo la supervisión del Dr. Angelo

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Santana del Pino, Profesor Titular de la U.L.P.G.C. en el área de Estadística e Investigación Operativa.

Se buscaron relaciones epidemiológicas utilizando diferentes parámetros. Para ello, realizamos un contraste de asociación utilizando el análisis estadístico del test de probabilidades exacto de Fisher para determinar la presencia-ausencia de *C. neoformans*, *C. uniguttulatus*, *C. laurentii*, *C. albidus* y *Candida albicans* en buche-cloaca. También se utilizó este método para evaluar la asociación entre la presencia-ausencia de levaduras en las heces depositadas en cada palomar y la presencia-ausencia de esas mismas levaduras en los buches y cloacas de la palomas que habitan en ese palomar.

Comparamos los aislamientos de las distintas especies de criptococos en heces clasificando los palomares como positivos o negativos a los mismos y relacionándolos posteriormente con la presencia o ausencia de palomas infectadas en buche y/o cloaca utilizando el test exacto de Fisher.

Hemos utilizado el método estadístico de la Chi cuadrado (χ^2) de Pearson para determinar la existencia de diferencias significativas entre las zonas en las que hemos englobado los distritos del municipio de Las Palmas de Gran Canaria.

3.5.2.- AUXANOTIPOS DE ORIGEN HUMANO Y ANIMAL

Por la importancia de *Cryptococcus neoformans* en la salud pública, hemos querido determinar la posible similitud de los auxanotipos de cepas de *C. neoformans* aisladas de enfermos humanos con las obtenidas en nuestro estudio, todas de origen animal.

Con el objeto de recolectar cepas pertenecientes al Género *Cryptococcus* aisladas en patología humana, nos hemos puesto en contacto con el personal sanitario del laboratorio de Microbiología del Hospital Doctor Negrín de Las Palmas de Gran Canaria. Hemos recolectado un total de 9

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

cepas pertenecientes a *Cryptococcus neoformans* de pacientes con SIDA cuyos aislamientos fueron obtenidos en el periodo comprendido entre los años 1995-1999. No poseían datos ni cepas de otras especies de criptococos tales como *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus uniguttulatus* ni *Cryptococcus laurentii.*

Hemos aplicado la prueba de la Chi cuadrado de Pearson para determinar si existían o no diferencias significativas en la asimilación de los distintos azúcares entre los aislamientos de origen animal y humano.

3.6.- ESTUDIO DE PREVALENCIA Y FRECUENCIA MEDIA DE INFECCIÓN

Realizamos el estudio de la prevalencia en los palomares tomando como dato para dicho estudio la presencia de cada una de las distintas especies levaduriformes presentes en cada palomar de la isla de Gran Canaria independientemente de la muestra (heces, buche y cloaca) de la cual haya sido aislada. Para lo cual hemos utilizado una prevalencia esperada del 50%, aunque realmente este valor es muy superior a la prevalencia realmente esperada, pero al no existir datos previos a nuestro estudio nos vemos obligados a trabajar con una muestra grande.

Hemos calculado la prevalencia (P), según M. Thrusfield (1990), la cual mide la cantidad de infección presente durante un periodo de tiempo determinado, sin distinguir los casos nuevos de los antiguos. Es una proporción que representa la probabilidad de que cada grupo (palomar), tenga una infección específica en un momento dado.

$$P_{palomares} = \frac{\text{Número de palomares infectados en un período de tiempo concreto}}{\text{Número de palomares en riesgo durante ese mismo periodo de tiempo}}$$

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Asimismo, hemos determinado la frecuencia media (F_M) de infección (por distintas especies de criptococos y *C. albicans*) en heces, buches y cloacas, tanto por palomas como por palomar.

$$F_{M\ cloaca} = \frac{\text{Número de palomas infectadas en un período de tiempo concreto}}{\text{Número de palomas en riesgo durante ese mismo periodo de tiempo}}$$

$$F_{M\ buche} = \frac{\text{Número de palomas infectadas en un período de tiempo concreto}}{\text{Número de palomas en riesgo durante ese mismo periodo de tiempo}}$$

También hemos querido calcular el índice de contaminación por las distintas especies levaduriformes aisladas en las plazas de la zona centro-norte de la isla, si bien somos conscientes que nuestro muestreo en este caso es de conveniencia y que sus datos no pueden extrapolarse, siendo válidos únicamente en nuestro trabajo.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Resultados

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4. RESULTADOS

4.1.- RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

4.1.1.- RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DE LAS CEPAS DE *C. NEOFORMANS* DE ORIGEN AVIAR Y DE ORIGEN HUMANO, *CRYPTOCOCCUS* SPP. Y *CANDIDA ALBICANS*

Pruebas comunes a *Cryptococcus* spp:

Termotolerancia, detección de ureasa, actividad feniloxidasa, asimilación del nitrógeno del nitrato potásico y producción de amiloides en medio de Aschner.

Todas las cepas identificadas como *C. neoformans*, independientemente de su origen, crecieron a 37ºC y a 39ºC mostrando todas ellas una turbidez superior al 2 de Mc Farland, pero tan sólo un 10% de las mismas fueron capaces de crecer a 42ºC. Un 30% sobrevivió al ser expuestas a dicha temperatura.

Un 70% de las cepas de *C. albidus* fueron capaces de crecer a 37ºC y de éstas, un 45% sobrevivió a 39ºC.

Respecto a la termotolerancia de *C. laurentii* no se consiguió crecimiento ni supervivencia a 37ºC. Los mismos resultados fueron obtenidos para *C. uniguttulatus*.

Todas hidrolizaron la urea en menos de 48 horas, pero hemos observado que las identificadas como *C. neoformans* lo hacían con mayor intensidad y rapidez que el resto de criptococos. Además, sólo las cepas identificadas como *C. neoformans*, produjeron pigmentación color café en agar *Guizotia abyssinica*.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

El 100% de las cepas identificadas como *C. albidus* asimilaron el NO_3K (nitrato potásico) en 96 horas, mientras que las cepas identificadas como *C. neoformans*, *C. laurentii* y *C. uniguttulatus* no lo hicieron.

C. neoformans, *C. laurentii*, *C. uniguttulatus* y *C. albidus* produjeron sustancias análogas al almidón en menos de 2 semanas.

Pruebas comunes a *Cryptococcus neoformans*:

Test de resistencia a la actidiona o cicloheximida (GCP) y siembra en Canavanina Glicina Azul de bromotimol (CGB).

Ninguna cepa fue capaz de crecer ni de producir cambio de coloración sobre estos dos medios, correspondiendo dichos aislamientos a *C. neoformans* var. *neoformans* o *C. neoformans* var. *grubii*, o sea, serotipos D o A respectivamente.

Asimilación de azúcares.

Aunque hemos aplicado la prueba de la χ^2 para determinar si existían o no diferencias significativas en la asimilación de los distintos azúcares entre los aislamientos de *C. neoformans* de origen aviar y humano, estos resultados van a ser meramente descriptivos, pues el número de cepas humanas incluídas en el estudio ha sido muy inferior (debido a que el hospital Dr. Negrín de Las Palmas de Gran Canaria no disponía de más casos diagnosticados) al número de cepas de *C. neoformans* obtenidas en el presente trabajo, de origen aviar (97 cepas aisladas en palomares frente a 2 cepas aisladas en plazas públicas y a 9 aislamientos de origen humano).

El comportamiento de las 108 cepas identificadas como *C. neoformans* fue variable frente a 9 de los 19 azúcares evaluados utilizando el API 20 C AUX: glicerol, L-arabinosa, D-xilosa, adonitol, xilitol, inositol, celobiosa, trehalosa y rafinosa.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Sin embargo, el comportamiento de las cepas al resto de azúcares fue constante, de tal forma que el 100% asimiló glucosa, 2-ceto-D-gluconato, galactosa, sorbitol, α-metil-D-glucósido, N-acetil-D-glucosamina, maltosa, sacarosa y melezitosa. Ninguna de las 108 cepas fue capaz de asimilar la lactosa y ninguna produjo hifas o pseudohifas.

La Tabla 13 muestra los diferentes patrones de asimilación de azúcares de las 108 cepas identificadas como *C. neoformans.*

AZÚCAR ESTUDIADO	% DE ASIMILACIÓN N= 108 cepas	% DE NO ASIMILACIÓN N= 108 cepas
Glucosa	100	0
2-Ceto-D-Gluconato	100	0
Galactosa	100	0
Sorbitol	100	0
α-Metil-D-Glucósido	100	0
N-Acetil-D-Glucosamina	100	0
Maltosa	100	0
Sacarosa	100	0
Melezitosa	100	0
Lactosa	0	100
D-Xylosa	99.1	0.9
Inositol	99.1	0.9
Rafinosa	99.1	0.9
Trehalosa	95.4	4.6
Adonitol	67.6	32.4
Celobiosa	56.5	43.5
L-Arabinosa	4.6	95.4
Glicerol	2.8	97.2
Xylitol	0.9	99.1

Tabla 13.- Patrón de asimilación de azúcares de las 108 cepas totales identificadas como *C. neoformans*

Dependiendo de la asimilación o no de los azúcares, hemos obtenido diferentes perfiles los cuales hemos numerado del 1 al 14, basándonos en si las cepas utilizan o no el azúcar en cuestión para los cuales obtuvimos variabilidad, es decir, en orden serían los azúcares que a continuación se detallan: glicerol, L- arabinosa, D-xilosa, adonitol, xilitol, inositol, celobiosa,

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

trehalosa y rafinosa. Hemos asignado el valor cero cuando no asimilan el azúcar y el valor 1 cuando lo asimilan.

En la Tabla 14, se reflejan las posibles combinaciones obtenidas y el porcentaje de aparición de cada uno de ellos.

PERFILES POSIBLES	COMBINACIÓN									Frecuencia	Porcentaje
	Gly	*Ara*	*Xyl*	*Ado*	*Xlt*	*Ino*	*Cel*	*Tre*	*Raf*		
1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0.9
2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0.9
3	0	0	1	0	0	1	0	0	1	4	3.7
4	0	0	1	0	0	1	0	1	1	20	18.5
5	0	0	1	0	0	1	1	1	1	7	6.5
6	0	0	1	1	0	1	0	1	1	16	14.8
7	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0.9
8	0	0	1	1	0	1	1	1	1	49	45.4
9	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0.9
10	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0.9
11	0	1	1	1	0	1	0	1	1	2	1.9
12	0	1	1	1	0	1	1	1	1	2	1.9
13	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0.9
14	1	0	1	1	0	1	0	1	1	2	1.9
					Total					108	100.0

Tabla 14.- Perfiles posibles de asimilación de azúcares de las 108 cepas identificadas como *C. neoformans*, frecuencia y porcentaje de aislamiento

Si desglosamos estos resultados según la procedencia de las 108 cepas totales, los porcentajes de aislamiento son los que se muestran en la última columna de la Tabla 15. En la misma tabla podemos observar los porcentajes relativos según la procedencia de las cepas (humano o aviar).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Observamos que el perfil más frecuentemente encontrado (perfil 8), es el mismo para las cepas de origen humano y para las de origen aviar (Tabla 15 y Figura 26). No se obtuvo esta combinación en las dos cepas de *C. neoformans* obtenidas de las plazas públicas.

PERFILES	COMBINACIONES	PROCEDENCIA		% sobre el Total de cepas
		Humanos	Palomas	
1	000001111		1(1%)	1 (0.9%)
2	001000001		1(1%)	1(0.9%)
3	001001001		4(4.0%)	4 (3.7%)
4	001001011		20(20.2%)	20(18.5%)
5	001001111		7(7.1%)	7(6.5%)
6	001101011	1(11.1%)	15(15.2%)	16(14.8%)
7	001101110	1(11.1%)		1(0.9%)
8	**001101111**	**6(66.7%)**	**43(43.4%)**	**49(45.9%)**
9	001111111	1(11.1%)		1(0.9%)
10	011001011		1(1%)	1(0.9%)
11	011101011		2(2%)	2(1.9%)
12	011101111		2(2%)	2(1.9%)
13	101001011		1(1%)	1(0.9%)
14	101101011		2(2%)	2(1.9%)
	Total	9 100%	99 100%	108 100%

Tabla 15.- Número de cepas y porcentajes de aislamiento de los diferentes perfiles obtenidos según origen de éstas

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

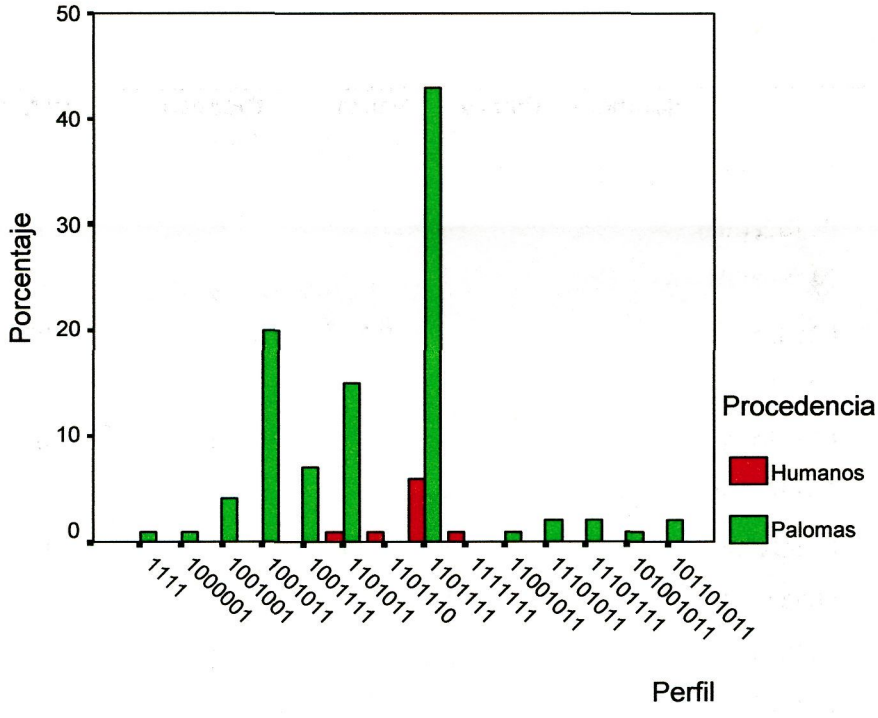


Figura 26.- Representación de los porcentajes de aparición de los diferentes perfiles según su procedencia

El **glicerol** fue utilizado por tres de las cepas aisladas en palomares, mientras que las cepas de parques públicos y las de origen humano no lo asimilaron. La **L- arabinosa** fue asimilada por 5 cepas también procedentes de palomares. La **D-Xylosa** fue asimilada por todas las cepas a excepción de una procedente de plazas públicas. El **adonitol** fue utilizado por todas las cepas de origen humano, por 64 de las cepas aisladas en palomares y por ninguna de las dos cepas aisladas en las plazas públicas. El **xylitol** no fue asimilado por ninguna de las cepas a excepción de una de las aisladas en humanos. 107 cepas asimilaron el **inositol** y una procedente de un palomar no lo asimiló. Algo similar sucede en el caso de la **rafinosa**, en la que todas las cepas estudiadas la asimilaron a excepción de una cepa de origen humano. La **celobiosa** fue utilizada por 61 cepas y no fue asimilada por 47. De las 61 cepas que lo asimilaron, 50 procedían de aislamientos realizados en palomares, 9 de origen humano y 2 de plazas públicas.

Las cepas de origen humano y de parques públicos asimilaron la **trehalosa.** Sin embargo, 5 cepas procedentes de los palomares no lo hicieron. Los datos anteriormente citados quedan expuestos en la Tabla 16.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

PERFILES	COMBINACIONES	HUMANO	PLAZAS	PALOMARES			TOTAL
		Humanos	**Plazas**	**Heces Palomas**	**Cloacas Palomas**	**Buches Palomas**	
1	000001111		1				1
2	001000001					1	1
3	001001001			4			4
4	001001011			10		10	20
5	001001111		1	5	1		7
6	001101011	1		11	1	3	16
7	001101110	1					1
8	001101111	6		24	2	17	49
9	001111111	1					1
10	011001011				1		1
11	011101011			2			2
12	011101111			1		1	2
13	101001011				1		1
14	101101011			2			2
	Total	9	2	59	6	32	108

Tabla 16.- Combinaciones obtenidas en las cepas aisladas de humanos, plazas y palomares

Resultados microbiológicos de *Candida albicans*:

Crecimiento a 37ºC, formación de pseudohifas y crecimiento en Candida ID.

Todas las cepas crecieron a 37ºC, produjeron pigmentación turquesa sin difusión al medio en el medio de Candida ID, y al examen microscópico, en todas las cepas, observamos la formación de pseudohifas.

En el presente estudio se muestran los resultados obtenidos por palomares, por palomas (buche y cloaca) y por muestras de excretas recolectadas.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.- RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MUESTREO DE "PALOMARES"

4.2.1.- RESULTADOS PRELIMINARES

Nuestro estudio va encaminado a conocer el porcentaje de aislamiento de especies levaduriformes directamente implicadas en la salud pública tales como *Cryptococcus* spp. y *Candida albicans*. No obstante, hemos considerado interesante dar a conocer la existencia de otras especies de levaduras con menor impacto en la salud pública pero que son aisladas frecuentemente en buche, cloaca o heces de palomas. Debido a la magnitud de este estudio y el tiempo que requeriría el profundizar en cada una de las especies levaduriformes aisladas, nos hemos visto obligados a profundizar únicamente en *Cryptococcus* spp. y *Candida albicans*, pensando que el resto de las especies podrían ser analizadas en estudios posteriores.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, en el presente estudio, se han aislado un total de 18 especies levaduriformes diferentes pertenecientes a 5 géneros distintos (*Cryptococcus, Candida, Saccharomyces, Trichosporon, Rhodotorula*) y una cepa de un alga unicelular perteneciente al Género *Prototheca*.

Además de *Cryptococcus neoformans*, levadura más relevante en nuestro estudio, se aisló una gran variedad de hongos levaduriformes tales como: *Cryptococcus uniguttulatus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Candida lusitaniae*, *Candida rugosa*, *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida zeylanoides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon mucoides*, *Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorula mucilaginosa*. Algunas de éstas han sido aisladas en buche, cloaca y heces, otras sólo en buche y heces, otras en buche y cloaca y otras sólo en buche, sólo en cloaca o sólo en heces. Estos datos quedan reflejados en la Tabla 17.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

AISLAMIENTOS	HECES	BUCHE	CLOACA
C. neoformans	+	+	+
C. uniguttulatus	+	+	+
C. laurentii	+	+	+
C. albidus	+	+	+
C. albicans	+	+	+
C. guilliermondii	+	+	+
C. famata	+	+	+
S. cerevisiae	+	+	+
T. asahii	+	+	+
C. rugosa	+	+	-
C. pelliculosa	+	+	-
T. mucoides	+	+	-
R. glutinis	+	+	-
R. mucilaginosa	+	+	-
C. lusitaniae	+	-	-
C. parapsilosis	+	-	-
C. kefyr	-	+	+
C. zeylanoides	-	+	-
P. wickerhamii	-	+	-
Total	16 spp	17 spp	10 spp

Tabla 17.- Aislamiento en heces, buche y cloaca.

De los 86 palomares pertenecientes a los diferentes municipios de la isla de Gran Canaria, hemos de considerar una serie de datos perdidos y otros válidos, de tal forma que en el muestreo realizado hemos tomado como datos válidos 82 palomares muestreados de buche, 82 de cloaca y 83 de heces. Los datos perdidos son considerados como tales debido a la falta de cooperación de algunos colombófilos en el momento de la toma de las muestras. Estos datos quedan detallados en la Tabla 18.

PALOMARES	BUCHE	CLOACA	HECES
VÁLIDOS	**82**	**82**	**83**
PERDIDOS	4	4	3
PALOMARES TOTALES	86	86	86
Nº DE MUESTRAS ANALIZADAS	331	331	174

Tabla 18.- Número total de palomares muestreados para cada una de las muestras analizadas en este estudio

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Los datos anteriormente citados han sido procesados estadísticamente con los programas SPSS y el programa R con el fin de obtener los porcentajes de aislamiento de las levaduras aisladas en buche, cloaca y heces.

De las 18 especies aisladas, 16 se aislaron de muestras de heces, 17 de buche y 10 de cloaca, observando que la mayor variabilidad en cuanto a especies aisladas lo ofrecieron las muestras de buche (Figura 27).

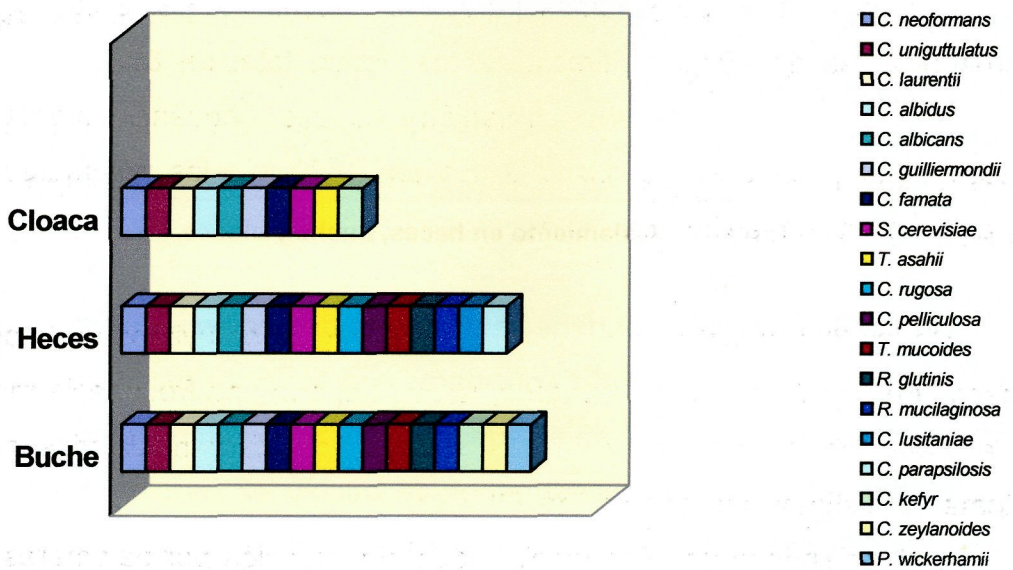


Figura 27.- Aislamientos obtenidos en buche, cloaca y heces

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.2.- PRESENCIA DE LEVADURAS DEL GÉNERO *CRYPTOCOCCUS* EN MUESTRAS DE HECES, BUCHE Y CLOACA DE PALOMARES

4.2.2.1.- AISLAMIENTO DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Esta especie levaduriforme se aisló en 97 ocasiones (32 en muestras de buche, 6 en cloaca y 59 en muestras de excrementos), sobre un total de 331 muestras de buche, 331 de cloaca y 174 de excrementos analizados en nuestro estudio.

De las 331 muestras de **BUCHE** procesadas en nuestro muestreo, se aislaron un total de 32 cepas de *Cryptococcus neoformans*, lo que supone una frecuencia media de palomas portadoras de un 9.66%. Estas cepas fueron aisladas de 19 palomares distintos de un total de 82 (palomares válidos en muestreo de buche), obteniéndose una frecuencia media de infección por palomares del 23.17%. En un 76.8% de los palomares no logramos identificar a *C. neoformans*.

De las 331 muestras de **CLOACA** procesadas, obtuvimos un total de 6 cepas de *Cryptococcus neoformans*, lo que supone una frecuencia media de palomas portadoras de un 1.81%. Estas cepas fueron aisladas de 5 palomares distintos de un total de 82 (palomares válidos en muestreo de cloaca), obteniéndose una frecuencia media de infección por palomares del 6.09%. En un 93.9% de los palomares no se detectó el microorganismo en esta localización.

La mayor tasa de aislamiento se obtuvo en las muestras de **HECES** analizadas. De las 174 muestras totales recogidas, 59 resultaron positivas (33.9%) al aislamiento de *C. neoformans*. Estas cepas fueron aisladas de 46 palomares diferentes de un total de 83 muestreados (palomares válidos en muestreo de heces) obteniéndose una frecuencia media de infección por palomares del 55.42% mientras que un 44.6% de los palomares muestreados dieron resultado negativo al aislamiento de *C. neoformans*.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.2.2.- AISLAMIENTO DE *CRYPTOCOCCUS UNIGUTTULATUS*

De las 331 muestras de **BUCHE** procesadas en el estudio, se aislaron un total de 24 cepas de *Cryptococcus uniguttulatus*, lo que representa una frecuencia media de palomas portadoras del 7.25%. Estas cepas fueron aisladas de 19 palomares diferentes del total de 82, obteniéndose una frecuencia media de infección por *C. uniguttulatus* en palomares del 23.17%.

De las 331 muestras de **CLOACA** procesadas, se aislaron un total de 11 cepas de *Cryptococcus uniguttulatus*, lo que supone una frecuencia media de portadores del 3.32%. Estas cepas fueron aisladas de 10 palomares de los 82 muestreados, representando una frecuencia media de infección por *C. uniguttulatus* en palomares del 12.19%.

De las 174 muestras de **HECES** totales recogidas, 9 resultaron positivas (5.17%). Estas cepas fueron aisladas de 9 palomares diferentes del total de 83 muestreados, obteniéndose una frecuencia media de infección por palomares del 10.84%.

4.2.2.3.- AISLAMIENTO DE *CRYPTOCOCCUS LAURENTII*

De las 331 muestras de **BUCHE** procesadas en el estudio, se aislaron un total de 2 cepas de *Cryptococcus laurentii*, representando una frecuencia media de palomas portadoras del 0.60%. Estas cepas fueron aisladas de 2 palomares diferentes de un total de 82, obteniéndose una frecuencia media de infección por palomares del 2.43%.

De las 331 muestras de **CLOACA** procesadas, se aislaron un total de 7 cepas de *Cryptococcus laurentii*, lo que supone una frecuencia media de palomas portadoras de un 2.11%. Estas cepas fueron aisladas de 6 palomares distintos de un total de 82, obteniéndose una frecuencia media de infección por *C. laurentii* en palomares del 7.31%.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Se aisló en 8 de las 174 muestras de **HECES** totales (4.59%) y la frecuencia media de infección por palomares fue del 6.02%.

4.2.2.4.- AISLAMIENTO DE *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS*

De las 331 muestras de **BUCHE** procesadas en el estudio, se aislaron un total de 23 cepas de *Cryptococcus albidus*, lo que supone una frecuencia media de palomas portadoras de un 6.94%. Estas cepas fueron aisladas de 17 palomares distintos de un total de 82, obteniéndose una frecuencia media de infección por *C. albidus* en los palomares muestreados del 20.7%.

De las 331 muestras de **CLOACA** procesadas, se aislaron un total de 3 cepas de *Cryptococcus albidus,* lo que supone una frecuencia media de palomas portadoras de un 0.90%. Estas cepas fueron aisladas de 3 palomares distintos de un total de 82, obteniéndose una frecuencia media de infección por *C. albidus* en los palomares muestreados del 3.65%.

De las 174 muestras de **HECES** totales recogidas, 6 resultaron positivas (3.44%). Estas cepas fueron aisladas de 6 palomares diferentes de un total de 83 muestreados, obteniéndose una frecuencia media de infección por *C. albidus* en los palomares muestreados del 7.22%.

Los resultados anteriormente citados quedan encuadrados en las Tablas 19 y 20 y en las Figuras 28 y 29.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

ESPECIE LEVADURIFORME	% AISLAMIENTO BUCHE n=82	% AISLAMIENTO CLOACA n=82	% AISLAMIENTO HECES n=83
C. neoformans	23.17	6.09	55.42
C. uniguttulatus	23.17	12.19	10.84
C. laurentii	2.43	7.31	6.02
C. albidus	20.7	3.65	7.22

Tabla 19.- Porcentaje de palomares positivos a *Cryptococcus* spp. n= Nº de palomares analizados

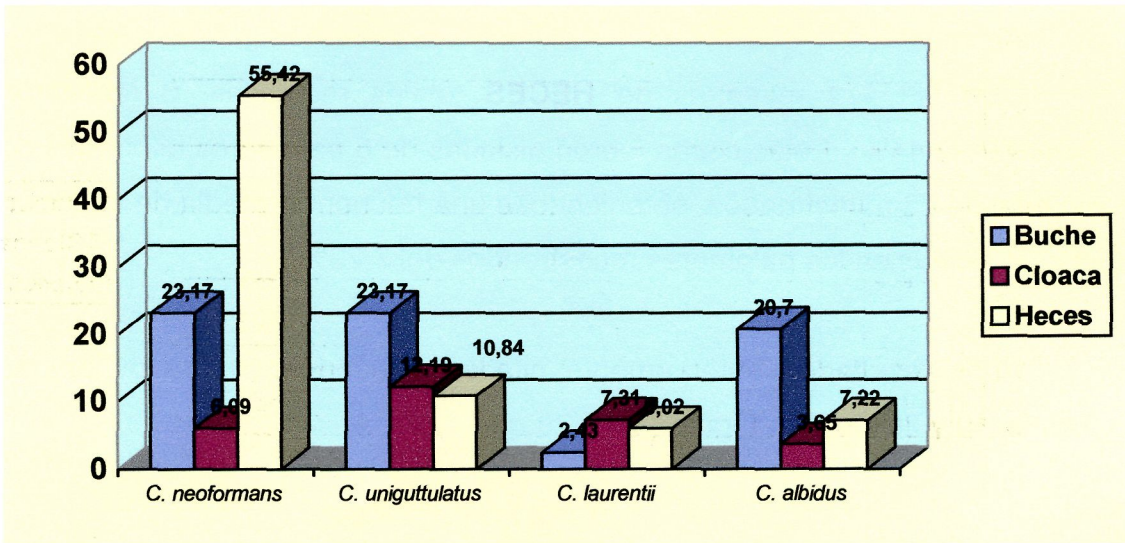


Figura 28.- Porcentaje de palomares positivos a *Cryptococcus* spp.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

ESPECIE LEVADURIFORME	% AISLAMIENTO BUCHE n=331	% AISLAMIENTO CLOACA n=331	% AISLAMIENTO HECES n=174
C. neoformans	9.66	1.81	33.9
C. uniguttulatus	7.25	3.32	5.17
C. laurentii	0.60	2.11	4.59
C. albidus	6.94	0.90	3.44

Tabla 20.- Porcentaje de aislamientos positivos a *Cryptococcus* spp por palomas y por muestras de heces analizadas. n= Nº total de palomas y de muestras de heces analizadas

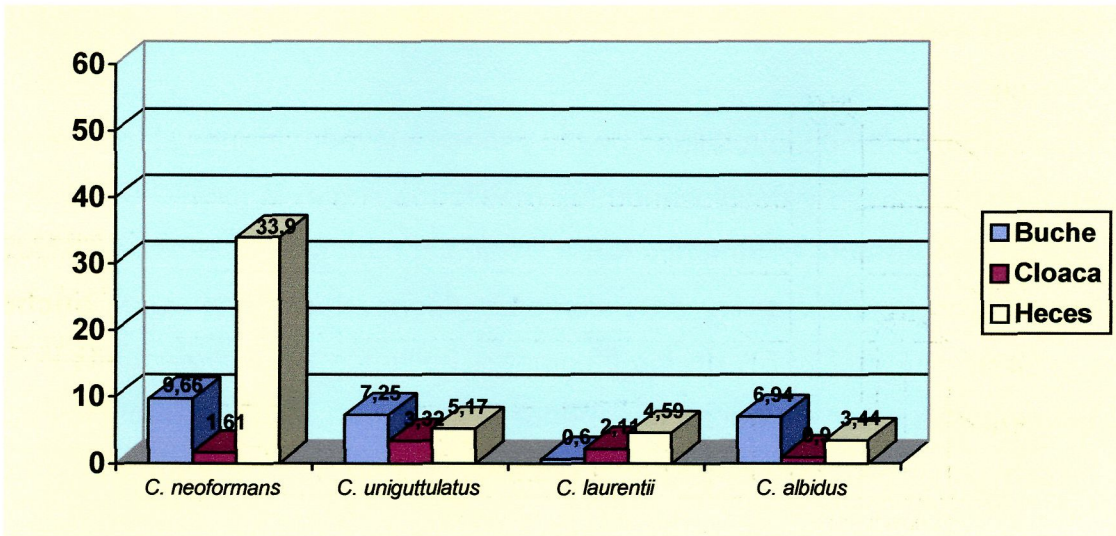


Figura 29.- Porcentaje de aislamientos positivos a *Cryptococcus* spp por palomas y del total de las muestras de heces analizadas.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.3.- EVALUACIÓN TOTAL DE LEVADURAS AISLADAS EN PALOMARES

C. neoformans, *C. uniguttulatus*, *C. laurentii* y *C. albidus* han estado presentes en los palomares de la isla de Gran Canaria, en las tres localizaciones tomadas en consideración en el presente estudio (buche, cloaca y excretas).

Mediante el uso del sistema API 20 C AUX no se logró identificar con certeza a un grupo de levaduras cuyas lecturas dejaron a las mismas encuadradas de forma incierta: *Candida guilliermondii* o *famata*, *Candida famata* o *guilliermondii*, *Candida* spp. y *Trichosporon* spp. Teniendo en cuenta que nuestro estudio iba encaminado principalmente como comentábamos en el apartado de resultados preliminares a *Cryptococcus* spp. y *Candida albicans*, hemos considerado oportuno dejarlas tal y como refleja la lectura obtenida por el API 20 C AUX (BioMérieux).

Considerando la totalidad de las especies levaduriformes identificadas en nuestro estudio y desglosando los resultados según la localización en la que se han aislado, obtenemos que *Candida* spp.ha sido la especie aislada con mayor frecuencia en los palomares donde muestreamos el **buche** (28.04%). En un 23.17% de los palomares hallamos a *C. neoformans* y *C. uniguttulatus* y con un porcentaje menor a *C. albidus* (20.7%). El criptococo aislado con menor frecuencia fue el *C. laurentii* (2.43%).

La levadura aislada con mayor frecuencia con respecto a las muestras de **cloaca** fue la *C. guilliermondii o famata* con un 17.07%. En esta localización, los criptococos aislados con mayor frecuencia fueron el *C. uniguttulatus* y el *C. laurentii* con un 12.19% y 7.31%, respectivamente.

Teniendo en consideración las muestras recolectadas de **heces**, debemos hacer mención especial a *C. neoformans*, el cual destaca sobre el resto de las levaduras obtenidas en el estudio por haberse aislado en las

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

muestras recolectadas de heces con un porcentaje mayor del 50 % en los palomares muestreados en la isla de Gran Canaria.

Otro dato que nos parece importante mencionar es el aislamiento de *Candida albicans* en un porcentaje elevado en los tres puntos de toma de muestra. Los porcentajes de ésta, y del resto de especies levaduriformes no comentadas anteriormente quedan expuestos en la Tabla 21 y Figura 30.

AISLAMIENTOS	BUCHE N=82 (%)	LEVADURA	CLOACA N=82 (%)	LEVADURA	HECES N=83 (%)
Candida spp	28.04	*C. guilliermondii o famata*	17.07	*C. neoformans*	55.42
C. neoformans	23.17	*C. uniguttulatus*	12.19	*C. guilliermondii o famata*	32.53
C. uniguttulatus	23.17	*Candida* spp	10.97	*Candida* spp	21.68
C. guilliermondii o famata	21.95	*C. laurentii*	7.31	*C. albicans*	15.66
C. albidus	20.7	*C. neoformans*	6.09	*T. asahii*	9.63
C. albicans	13.41	*C. famata*	4.87	*C. albidus*	7.22
C. famata	4.87	*C. albidus*	3.65	*C. famata*	7.22
C. kefyr	3.65	*C. albicans*	3.65	*C. guilliermondii*	7.22
S. cerevisiae	3.65	*S. cerevisiae*	2.43	*R. mucilaginosa*	7.22
T. asahii	3.65	*C. famata o guilliermondii*	1.21	*C. laurentii*	6.02
R. mucilaginosa	3.65	*C. guilliermondii*	1.21	*Trichosporon spp*	6.02
C. laurentii	2.43	*C. kefyr*	1.21	*C. uniguttulatus*	5.17
C. guilliermondii	2.43	*T. asahii*	1.21	*C. famata o guilliermondii*	2.40
Trichosporon spp	2.43	*C. lusitaniae*	0	*S. cerevisiae*	1.20
C. pelliculosa	2.43	*C. rugosa*	0	*C. lusitaniae*	1.20
C. famata o guilliermondii	1.21	*C. parapsilosis*	0	*C. rugosa*	1.20
C. rugosa	1.21	*C. pelliculosa*	0	*C. parapsilosis*	1.20
C. zeylanoides	1.21	*C. zeylanoides*	0	*C. pelliculosa*	1.20
T. mucoides	1.21	*Trichosporon spp*	0	*T. mucoides*	1.20
R. glutinis	1.21	*T. mucoides*	0	*R. glutinis*	1.20
P. wickerhamii	1.21	*R. glutinis*	0	*C. zeylanoides*	0
C. parapsilosis	0	*R. mucilaginosa*	0	*C. kefyr*	0
C. lusitaniae	0	*P. wickerhamii*	0	*P. wickerhamii*	0

Tabla 21.- Porcentaje de palomares positivos a las distintas especies de levaduras según su procedencia: buche, cloaca y heces. N= nº total de palomares válidos

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

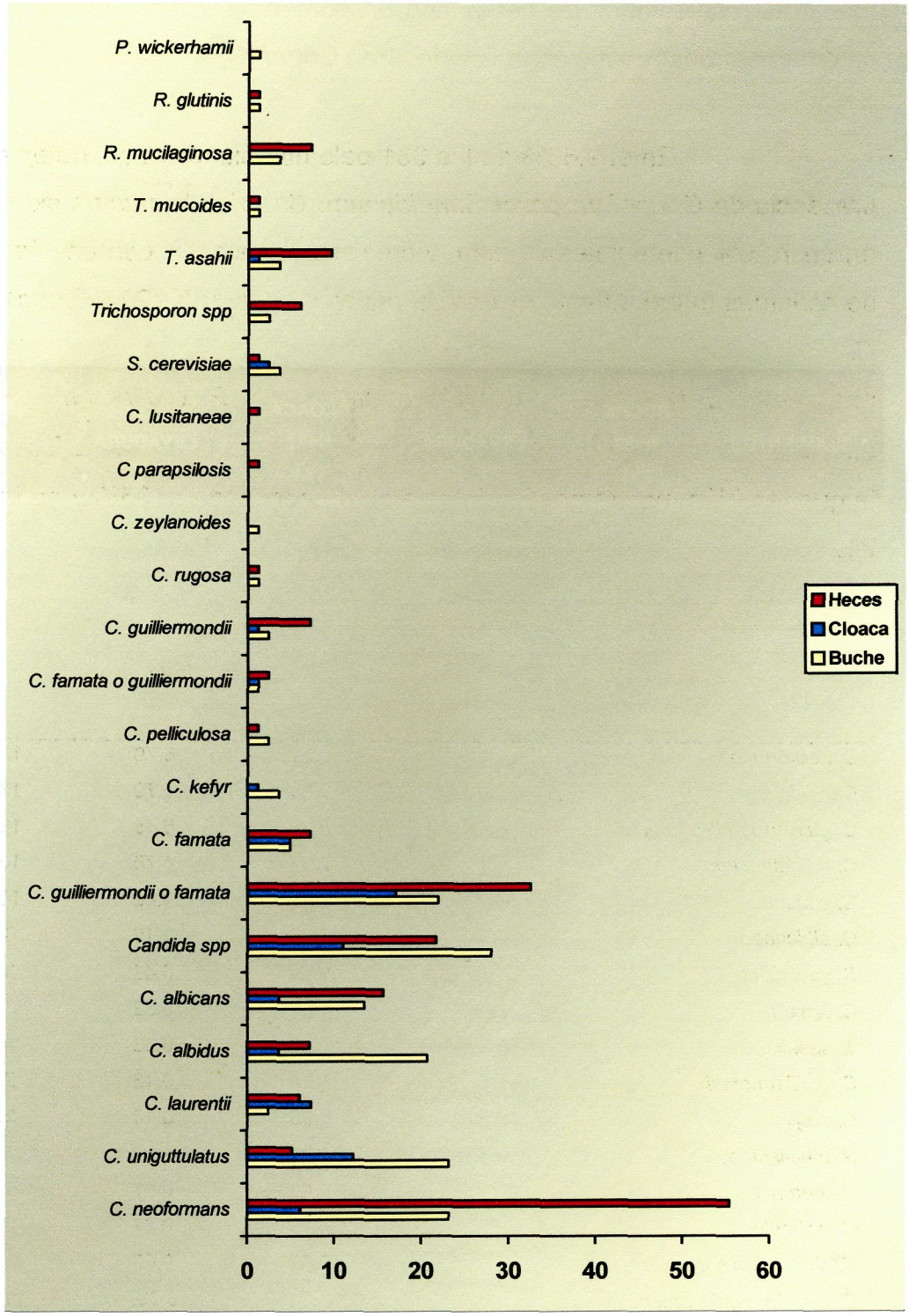


Figura 30.- Porcentaje de palomares positivos a las distintas especies de levaduras según su procedencia: buche, cloaca y heces.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.4.- FRECUENCIA DE PALOMAS PORTADORAS EN BUCHE Y EN CLOACA DE LAS DISTINTAS ESPECIES LEVADURIFORMES AISLADAS EN EL ESTUDIO

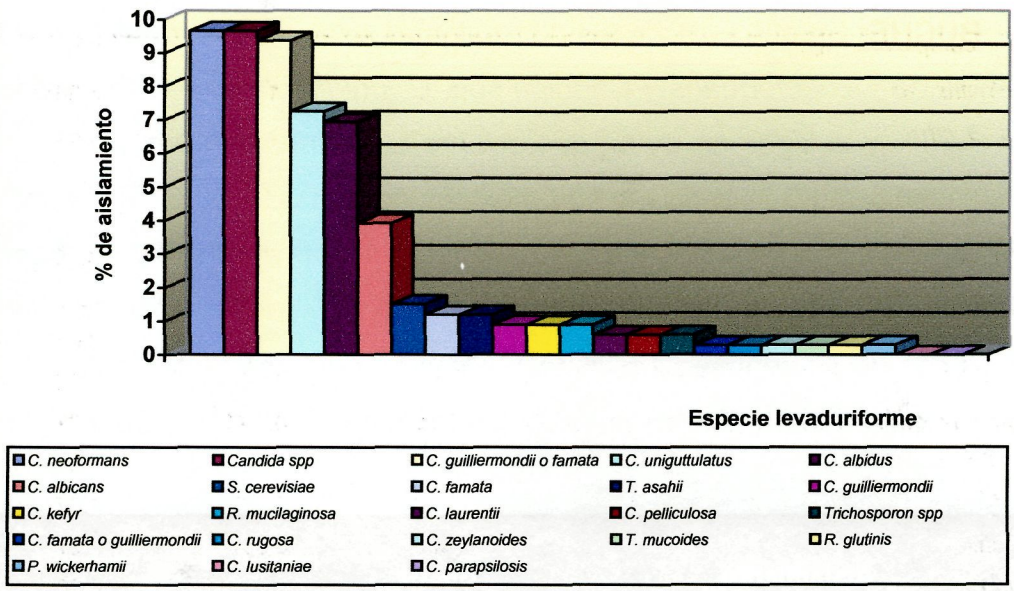
BUCHE: En el 9.66% de las 331 palomas examinadas, detectamos la presencia de *C. neoformans* y *Candida* spp. *C. uniguttulatus* ha sido aislado en un 7.25% y le sigue en orden decreciente *C. albidus* con una frecuencia de aislamiento del 6.94% y *Candida albicans* con un 3.92%. *C. lusitaniae* y *C. parapsilosis* no se detectaron en ninguna de las muestras de buche analizadas. El resto de especies levaduriformes y *P. wickerhamii* han sido aislados con un porcentaje ≤1.51% tal y como exponemos en la Tabla 22 en la que también mostramos los intervalos de confianza al 95% y en la Figura 31.

Aislamiento	Buche N=331 (%)	Intervalo de confianza 95% Límite inferior	Intervalo de confianza 95% Límite superior
C. neoformans	**9.66**	6.70	13.37
Candida spp	**9.66**	6.70	13.37
C. guilliermondii o famata	**9.36**	6.45	13.02
C. uniguttulatus	**7.25**	4.70	10.59
C. albidus	**6.94**	4.45	10.24
C. albicans	**3.92**	2.10	6.62
S. cerevisiae	**1.51**	0.49	3.48
C. famata	**1.20**	0.32	3.06
T. asahii	**1.20**	0.32	3.06
C. guilliermondii	**0.90**	0.18	2.62
C. kefyr	**0.90**	0.18	2.62
R. mucilaginosa	**0.90**	0.18	2.62
C. laurentii	**0.60**	0.07	2.16
C. pelliculosa	**0.60**	0.07	2.16
Trichosporon spp	**0.60**	0.07	2.16
C. famata o guilliermondii	**0.30**	0.007	1.67
C. rugosa	**0.30**	0.007	1.67
C. zeylanoides	**0.30**	0.007	1.67
T. mucoides	**0.30**	0.007	1.67
R. glutinis	**0.30**	0.007	1.67
P. wickerhamii	**0.30**	0.007	1.67
C. lusitaniae	**0**	0	0.90
C. parapsilosis	**0**	0	0.90

Tabla 22.- Porcentaje de palomas positivas a las diferentes especies levaduriformes en buche.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Figura 31.- Porcentaje de palomas positivas (buche) a cada especie levaduriforme



CLOACA: En esta localización hemos aislado un número inferior de especies levaduriformes. Hemos determinado la presencia de levaduras de importancia patógena para el ser humano y para los animales tales como *C. guilliermondii o famata*, *C. uniguttulatus* y *C. laurentii*, especies aisladas con mayor frecuencia en esta localización. En la Tabla 23 y Figura 32 se detallan los porcentajes de aislamientos de las diferentes especies levaduriformes obtenidos en nuestro estudio.

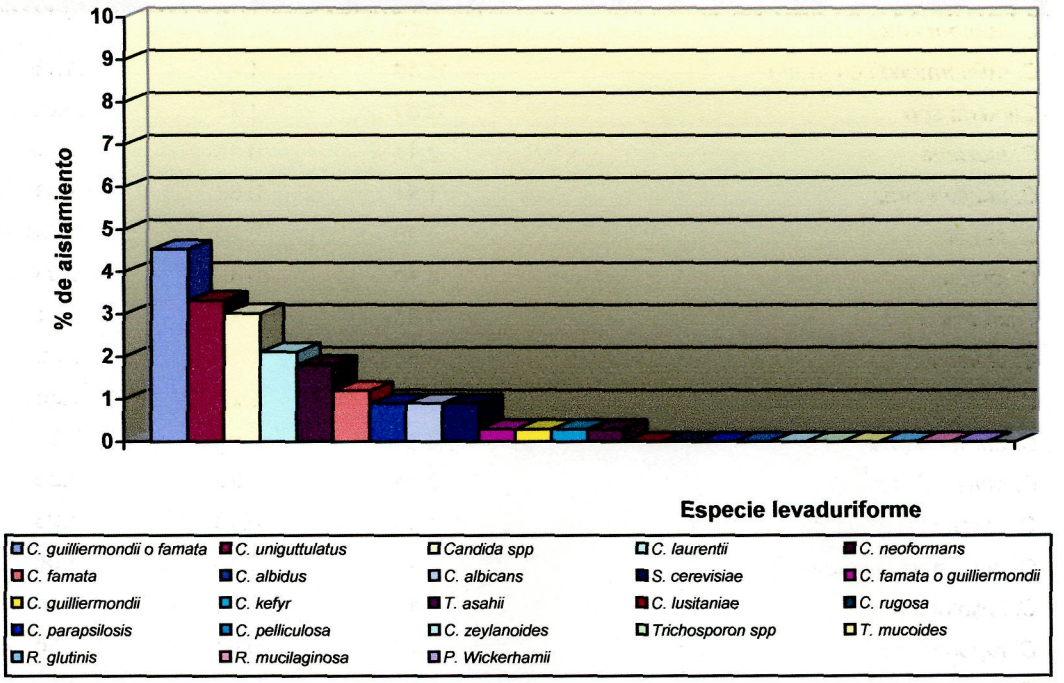
© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Aislamiento	Cloaca N=331 (%)	Intervalo de confianza 95% Límite inferior	Intervalo de confianza 95% Límite superior
C. guilliermondii o famata	**4.53**	2.55	7.36
C. uniguttulatus	**3.32**	1.67	5.86
Candida spp	**3.02**	1.45	5.48
C. laurentii	**2.11**	0.85	4.30
C. neoformans	**1.81**	0.66	3.90
C. famata	**1.20**	0.32	3.06
C. albidus	**0.90**	0.18	2.62
C. albicans	**0.90**	0.18	2.62
S. cerevisiae	**0.90**	0.18	2.62
C. famata o guilliermondii	**0.30**	0.007	1.67
C. guilliermondii	**0.30**	0.007	1.67
C. kefyr	**0.30**	0.007	1.67
T. asahii	**0.30**	0.007	1.67
C. lusitaniae	**0**	0	0.90
C. rugosa	**0**	0	0.90
C. parapsilosis	**0**	0	0.90
C. pelliculosa	**0**	0	0.90
C. zeylanoides	**0**	0	0.90
Trichosporon spp	**0**	0	0.90
T. mucoides	**0**	0	0.90
R. glutinis	**0**	0	0.90
R. mucilaginosa	**0**	0	0.90
P. wickerhamii	**0**	0	0.90

Tabla 23.- Porcentaje de palomas positivas a las diferentes especies levaduriformes en cloaca.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Figura 32.- Porcentaje de palomas positivas (cloaca) a cada especie levaduriforme



4.2.5.- FRECUENCIA DE AISLAMIENTO EN MUESTRAS DE EXCRETAS

HECES:

En términos globales, considerando la totalidad de las muestras de heces de palomas estudiadas (174), *C. neoformans* estuvo presente en un elevado porcentaje de las mismas (33.9%). *C. kefyr*, *C. zeylanoides* y *P. wickerhamii* no se aislaron en ninguna de las muestras y los porcentajes de aislamiento del resto de especies levaduriformes quedan expuestos en la Tabla 24 y Figura 33.

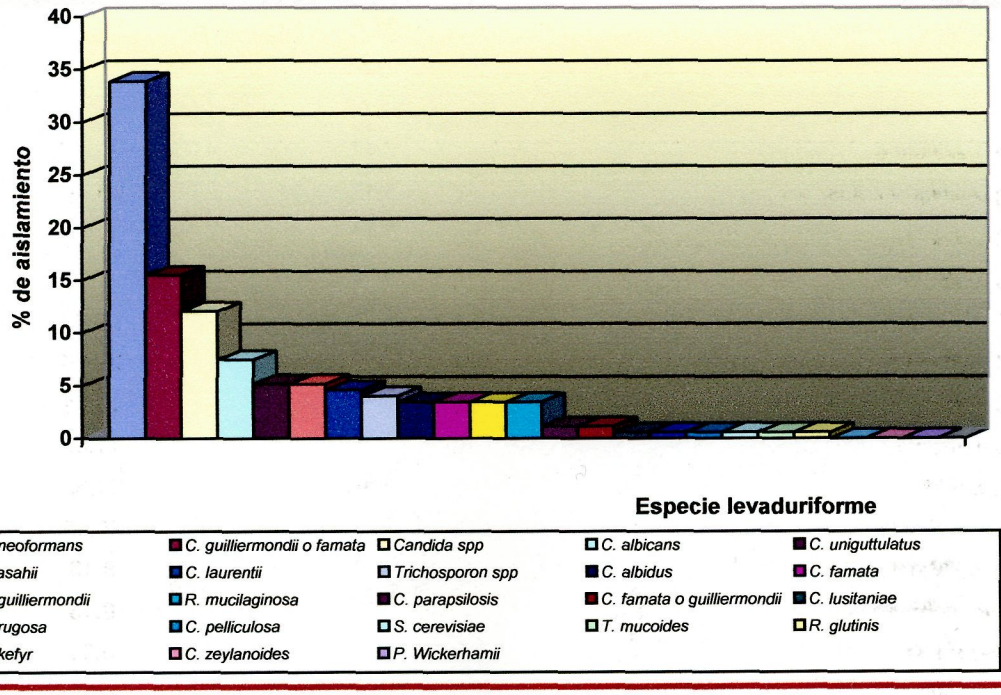
© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Aislamiento	Excretas N=174 (%)	Intervalo de confianza 95% Límite inferior	Intervalo de confianza 95% Límite superior
C. neoformans	**33.9**	26.91	41.45
C. guilliermondii o famata	**15.51**	10.48	21.76
Candida spp	**12.06**	7.62	17.85
C. albicans	**7.47**	4.03	12.43
C. uniguttulatus	**5.17**	2.39	9.59
T. asahii	**5.17**	2.39	9.59
C. laurentii	**4.59**	2.0	8.85
Trichosporon spp	**4.02**	1.63	8.11
C. albidus	**3.44**	1.27	7.35
C. famata	**3.44**	1.27	7.35
C. guilliermondii	**3.44**	1.27	7.35
R. mucilaginosa	**3.44**	1.27	7.35
C. parapsilosis	**1.14**	0.13	4.08
C. famata o guilliermondii	**1.14**	0.13	4.08
C. lusitaniae	**0.57**	0.01	3.16
C. rugosa	**0.57**	0.01	3.16
C. pelliculosa	**0.57**	0.01	3.16
S. cerevisiae	**0.57**	0.01	3.16
T. mucoides	**0.57**	0.01	3.16
R. glutinis	**0.57**	0.01	3.16
C. kefyr	**0**	0	1.70
C. zeylanoides	**0**	0	1.70
P. wickerhamii	**0**	0	1.70

Tabla 24.- Porcentaje de muestras de excretas positivas a las diferentes especies levaduriformes. N= número total de excretas analizadas

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Figura 33.- Porcentaje de muestras de excretas positivas a cada especie levaduriforme



© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.6.- PREVALENCIA DE LAS DISTINTAS ESPECIES LEVADURIFORMES POR PALOMAR INDEPENDIENTEMENTE DE LA MUESTRA EN LA QUE SE HAYA AISLADO DICHA LEVADURA.

AISLAMIENTO	Nº PALOMARES POSITIVOS N=86	PREVALENCIA (%)
C. neoformans	49	**56.97**
C. guilliermondii o famata	45	52.32
Candida spp	37	43.02
C. uniguttulatus	28	**32.55**
C. albidus	22	**25.58**
C. albicans	20	**23.25**
C. famata	13	15.11
C. laurentii	10	**11.62**
T. asahii	10	11.62
R. mucilaginosa	9	10.46
C. guilliermondii	7	8.13
Trichosporon spp	7	8.13
S. cerevisiae	5	5.81
C. kefyr	4	4.65
C. famata o guilliermondii	3	3.48
C. pelliculosa	3	3.48
C. rugosa	2	2.32
T. mucoides	2	2.32
R. glutinis	2	2.32
C. lusitaniae	1	1.16
C. parapsilosis	1	1.16
C. zeylanoides	1	1.16
P. wickerhamii	1	1.16

Tabla 25.- Prevalencia por palomares

4.2.7.- CORRELACIÓN DE AISLAMIENTOS LEVADURIFORMES MÁS RELEVANTES DE NUESTRO ESTUDIO: *C. NEOFORMANS, C. UNIGUTTULATUS, C. LAURENTII, C. ALBIDUS* Y *CANDIDA ALBICANS.*

A continuación se exponen los datos estadísticos referentes a los aislamientos levaduriformes más relevantes de nuestro estudio y su posible correlación presencia-ausencia de la misma levadura en buche y en cloaca de un animal determinado. La finalidad del estudio es determinar la

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

existencia o no de significación estadística en estos aislamientos. También hemos querido establecer en nuestro estudio las posibles asociaciones que pudieran existir entre la presencia de palomares positivos o no a *Cryptococcus* spp. y *Candida albicans* con la presencia de palomas infectadas o no con estos microorganismos en sus buches o cloacas.

Para ello, realizamos un contraste de asociación utilizando el análisis estadístico del test de probabilidades exacto de Fisher para determinar la presencia-ausencia de *C. neoformans*, *C. uniguttulatus*, *C. laurentii*, *C. albidus* y *Candida albicans* en buche- cloaca. En todos los casos se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$.

4.2.7.1.- ASOCIACIONES BUCHE-CLOACA (PALOMAS)

4.2.7.1.1.- *Cryptococcus neoformans*

No encontramos asociación significativa entre la presencia de *C. neoformans* en buche y su presencia en cloaca (p=0.106). De las 32 palomas positivas a esta especie levaduriforme en buche, sólo 2 también la presentaron en su cloaca, de un total de 6 palomas positivas en esta localización. 295 palomas no presentaron la levadura ni en el buche ni en la cloaca (Tabla 26).

			C. neoformans en Cloaca		Total
			Ausente	Presente	
C. neoformans en buche	**Ausente**	Recuento	295	4	299
		% de *C. neoformans* en Buche	98.7%	1. 3	100.0%
	Presente	Recuento	30	2	32
		% de *C. neoformans* en Buche	93.8%	6.3%	100.0%
Total		Recuento	325	6	331
		% de *C. neoformans* en Buche	98.2%	1.8%	100.0%

Tabla 26.- Tabla de contingencia *Cryptococus neoformans* en buche * *Cryptococus neoformans* en cloaca. Estadístico exacto de Fisher p = 0.106

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.7.1.2.- *Cryptococcus uniguttulatus*

C. uniguttulatus se aisló en 23 buches de diferentes palomas. Una sola de éstas lo presentó también en cloaca de un total de 11 palomas positivas en esta localización, no encontrándose ninguna relación entre la presencia de esta levadura en el buche y la cloaca. La p de Fisher toma un valor de 0.553 (Tabla 27).

			C. uniguttulatus en Cloaca		Total
			Ausente	Presente	
C. uniguttulatus en buche	**Ausente**	Recuento	298	10	308
		% de *C. uniguttulatus* en Buche	96.8%	3.2%	100.0%
	Presente	Recuento	22	1	23
		% de *C. uniguttulatus* en Buche	95.7%	4.3%	100.0%
Total		Recuento	320	11	331
		% de *C. uniguttulatus* en Buche	96.7%	3.3%	100.0%

Tabla 27.- Tabla de contingencia *Cryptococus uniguttulatus* en buche * *Cryptococus uniguttulatus* en cloaca. Estadístico exacto de Fisher p = 0.553

4.2.7.1.3.- *Cryptococcus laurentii*

Sin embargo, en el caso del *C. laurentii* sí se ha detectado asociación significativa entre su aislamiento en buche y en cloaca (p=0.042) (Tabla 28).

			C. laurentii en Cloaca		Total
			Ausente	Presente	
C. laurentii en buche	**Ausente**	Recuento	323	6	329
		% de *C. laurentii* en Buche	98.2%	1.8%	100.0%
	Presente	Recuento	1	1	2
		% de *C. laurentii* en Buche	50.0%	50.0%	100.0%
Total		Recuento	324	7	331
		% de *C. laurentii* en Buche	97.9%	2.1%	100.0%

Tabla 28.-Tabla de contingencia *Cryptococus laurentii* en buche * *Cryptococus laurentii* en cloaca Estadístico exacto de Fisher p = 0.042

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.7.1.4.- *Cryptococcus albidus*

Hemos detectado que de 23 muestras de buche positivas a *C. albidus*, una lo presentó también en cloaca, sobre un total de 3 palomas positivas en esta última localización. 306 palomas no presentaron el criptococo en cuestión ni en buche ni en cloaca. El valor de p obtenido ha sido igual a 0.195, no existiendo ninguna diferencia estadísticamente significativa en este caso (Tabla 29).

			C. albidus en Cloaca		Total
			Ausente	Presente	
C. albidus en buche	**Ausente**	Recuento	306	2	308
		% de *C. albidus* en Buche	99.4%	0.6%	100.0%
	Presente	Recuento	22	1	23
		% de *C. albidus* en Buche	95.7%	4.3%	100.0%
Total		Recuento	328	3	331
		% de *C. albidus* en Buche	99.1%	0.9%	100.0%

Tabla 29.- Tabla de contingencia *Cryptococus albidus* en buche * *Cryptococus albidus* en cloaca. Estadístico exacto de Fisher p = 0.195

4.2.7.1.5.- *Candida albicans*

Existe asociación significativa entre la presencia de *C. albicans* en el buche y en la cloaca. La levadura en cuestión sigue un curso distinto al resto. Las palomas que no presentaron *C. albicans* en su buche, tampoco lo presentaron en cloaca. No obstante, de las 13 palomas positivas al microorganismo en buche, detectamos 3 palomas que también lo presentaban en cloaca. Hemos obtenido que el valor estadístico exacto de Fisher es de p=0, existiendo por lo tanto asociación estadísticamente significativa entre las dos localizaciones. Estos datos quedan expuestos en la Tabla 30.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

			Candida albicans en Cloaca		Total
			Ausente	Presente	
Candida albicans en buche	**Ausente**	Recuento	318		318
		% de *Candida albicans* en Buche	100.0%		100.0%
	Presente	Recuento	10	3	13
		% de *Candida albicans* en Buche	76.9%	23.1%	100.0%
Total		Recuento	328	3	331
		% de *Candida albicans* en Buche	99.1%	.9%	100.0%

Tabla 30.- Tabla de contingencia *C. albicans* en buche * *C. albicans* en cloaca. Estadístico exacto de Fisher p = 0

4.2.7.2.- ASOCIACIONES HECES-BUCHE (PALOMARES)

Para el análisis de este apartado, hemos tomado como número total de palomares válidos 79, ya que hemos tenido en cuenta que no todos los colombófilos nos han permitido la recolección de los tres tipos de muestras (buche, cloaca y heces).

Hemos comparado los aislamientos de palomares positivos y negativos en heces a cada uno de los criptococos y a *Candida albicans*, con la presencia o no de palomas infectadas en buche a través del test exacto de Fisher, obteniendo diferencias significativas en todos los casos analizados a excepción de la relación realizada para *C. albidus*. A continuación exponemos los datos:

4.2.7.2.1.- *Cryptococcus neoformans*

C. neoformans no ha estado presente en las excretas de 35 palomares. 33 de éstos tampoco lo presentaron en el buche de sus palomas y sólo 2 palomares que no estaban infectados por esta especie levaduriforme en sus heces presentaron palomas infectadas en el buche. De los 44 palomares en los que logramos la identificación de *C. neoformans* a partir de las heces recolectadas, 17 también lo estaban en el buche de sus

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

palomas, habiéndose obtenido una gran diferencia estadísticamente significativa entre la presencia-ausencia de palomares infectados por dicha levadura en excretas con la presencia-ausencia de palomas con *C. neoformans* en sus buches (valor p=0.001). Los porcentajes se detallan en la Tabla 31 y la representación gráfica de estos datos en la Figura 34.

			C. neoformans en Buche		Total
			Negativo	Positivo	
C. neoformans en heces	**Negativo**	Recuento	33	2	35
		% de *C neoformans* en Heces	94.3%	5.7%	100.0%
	Positivo	Recuento	27	17	44
		% de *C. neoformans* en Heces	61.4%	38.6%	100.0%
Total		Recuento	60	19	79
		% de *C. neoformans* en Heces	75.9%	24.1%	100.0%

Tabla 31.- Tabla de contingencia *C. neoformans* en heces * *C. neoformans* en buche. Estadístico exacto de Fisher p = 0.001

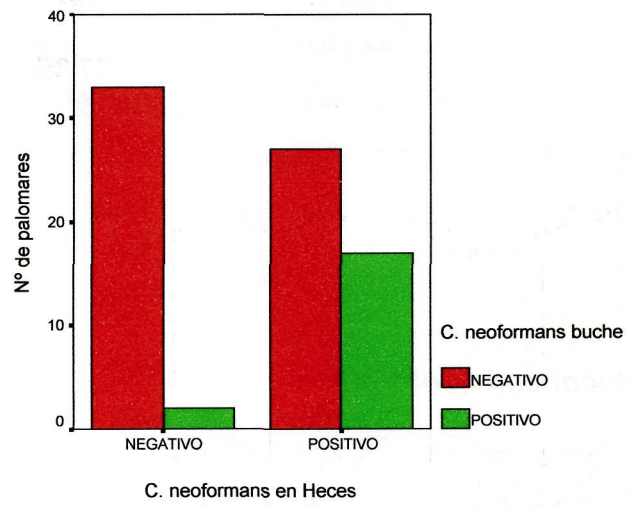


Figura 34.- Representación gráfica del número de palomares positivos y negativos en heces y buche

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.7.2.2.- *Cryptococcus uniguttulatus*

De los 9 palomares infectados por *C. uniguttulatus* en sus excretas, 5 lo estaban también en buche. 57 palomares no presentaron *C. uniguttulatus* ni en las heces ni en el buche de las palomas que habitaban en ellos. El estadístico exacto de Fisher nos indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre la presencia-ausencia de palomares infectados por *C. uniguttulatus* en heces con la presencia-ausencia de aves portadoras de *C. uniguttulatus* en sus buches (valor p=0.025). Los porcentajes se detallan en la Tabla 32 y la representación gráfica de estos datos en la Figura 35.

			C. uniguttulatus en Buche		Total
			Negativo	Positivo	
C. uniguttulatus en heces	**Negativo**	Recuento	57	13	70
		% de *C uniguttulatus* en Heces	81.4%	18.6%	100.0%
	Positivo	Recuento	4	5	9
C.uniguttulatus		% de en Heces	44.4%	55.6%	100.0%
Total		Recuento	61	18	79
C.uniguttulatus		% de en Heces	77.2%	22.8%	100.0%

Tabla 32.- Tabla de contingencia *C. unigutulattus* en heces * *C. unigutulattus* en buche Estadístico exacto de Fisher p = 0.025

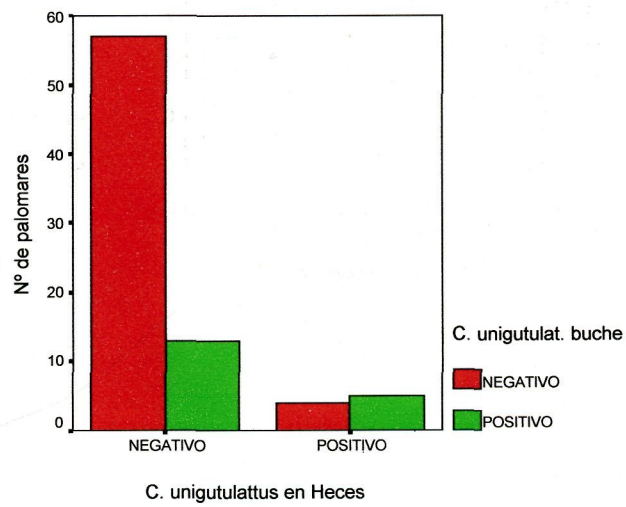


Figura 35.- Representación gráfica del número de palomares positivos y negativos en heces y buche a *C. uniguttulatus*

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.7.2.3.- *Cryptococcus laurentii*

De los 79 palomares totales, *C. laurentii* no ha estado presente en las excretas de una gran parte de ellos (72), de los que a su vez, en ninguno se pudo detectar la levadura en el buche de sus aves. 7 palomares presentaron el microorganismo en sus heces y sólo 2 de éstos también lo presentaron en el buche. Obtuvimos diferencias estadísticamente significativas entre la presencia-ausencia de esta levadura en las heces presentes en los palomares con la presencia-ausencia de palomas con *C. laurentii* en sus buches (valor p=0.007). Los porcentajes se detallan en la Tabla 33 y la representación gráfica de estos datos en la Figura 36.

			C. laurentii en Buche		Total
			Negativo	Positivo	
C. laurentii en heces	**Negativo**	Recuento	72		72
		% de *C. laurentii* en Heces	100.0%		100.0%
	Positivo	Recuento	5	2	7
		% de *C. laurentii* en Heces	71.4%	28.6%	100.0%
Total		Recuento	77	2	79
		% de *C. laurentii* en Heces	97.5%	2.5%	100.0%

Tabla 33.- Tabla de contingencia *C. laurentii* en heces * *C. laurentii* en buche Estadístico exacto de Fisher p = 0.007

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

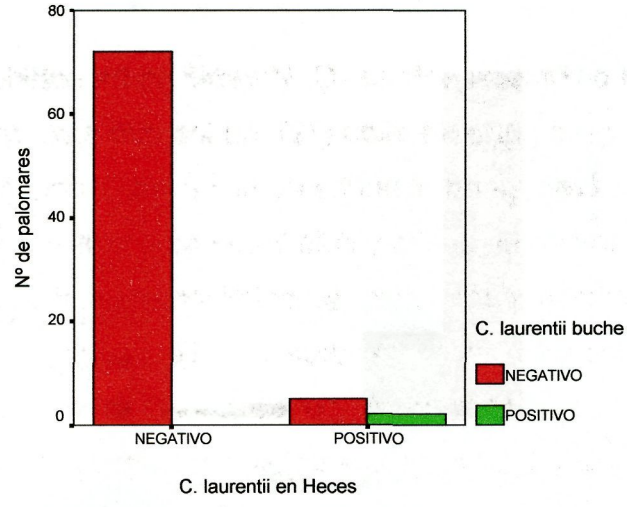


Figura 36.- Representación gráfica del número de palomares positivos y negativos en heces y buche a *C. laurentii*

4.2.7.2.4.- *Cryptococcus albidus*

La existencia o ausencia de esta levadura en las excretas de los palomares muestreados, no parece interferir en la presencia o ausencia en el buche de sus palomas. En este caso, no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas (p de Fisher=0.292). Los porcentajes se detallan en la Tabla 34 y la representación gráfica de estos datos en la Figura 37.

			C. albidus en Buche		Total
			Negativo	Positivo	
C. albidus en heces	**Negativo**	Recuento	59	15	74
		% de *C. albidus* en Heces	79.7%	20.3%	100.0%
	Positivo	Recuento	3	2	5
		% de *C. albidus* en Heces	60.0%	40.0%	100.0%
Total		Recuento	62	17	79
		% de *C. albidus* en Heces	78.5%	21.5%	100.0%

Tabla 34.- Tabla de contingencia *C. albidus* en heces * *C. albidus* en buche Estadístico exacto de Fisher p = 0.292

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

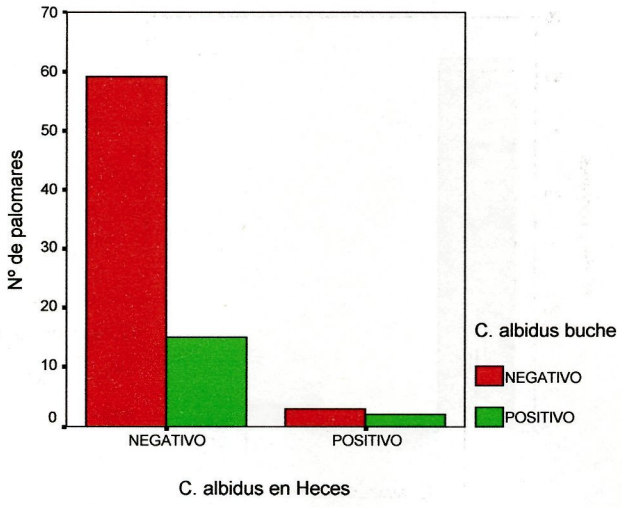


Figura 37.- Representación gráfica del número de palomares positivos y negativos en heces y buche a *C. albidus*

4.2.7.2.5.- *Candida albicans*

De los 79 palomares totales, *C. albicans* sólo ha estado presente en las excretas de 12. 4 de éstos a su vez, presentaron también palomas que portaban la levadura en buche. 67 palomares estaban libres del microorganismo en las excretas, de los cuales 6 lo presentaron en el buche. Obtuvimos diferencias estadísticamente significativas entre la presencia-ausencia de esta levadura en las heces presentes en los palomares con la presencia-ausencia de palomas con *C. albicans* en sus buches (valor p=0.040). Los porcentajes se detallan en la Tabla 35 y la representación gráfica de estos datos en la Figura 38.

			C. albicans en Buche		Total
			Negativo	Positivo	
C. albicans en heces	**Negativo**	Recuento	61	6	67
		% de *C. albicans* en Heces	91.0%	9.0%	100.0%
	Positivo	Recuento	8	4	12
		% de *C. albicans* en Heces	66.7%	33.3%	100.0%
Total		Recuento	69	10	79
		% de *C. albicans* en Heces	87.3%	12.7%	100.0%

Tabla 35.- Tabla de contingencia *C. albicans* en heces * *C. albicans* en buche. Estadístico exacto de Fisher p = 0.040

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

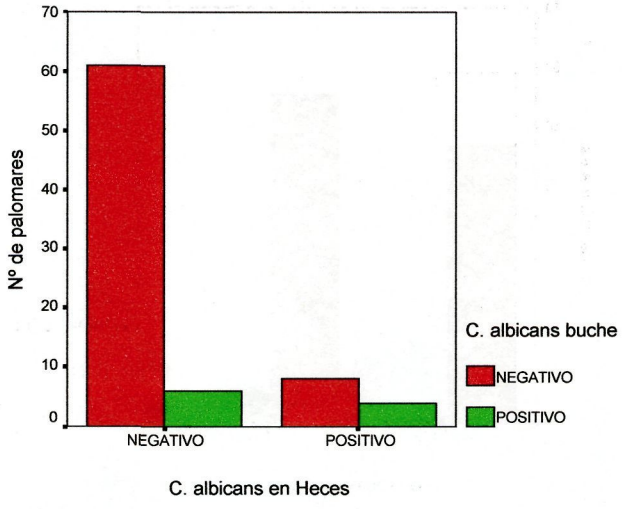


Figura 38.- Representación gráfica del número de palomares positivos y negativos en heces y buche a *C. albicans*

4.2.7.3.- ASOCIACIONES HECES-CLOACA (PALOMARES)

Comparamos los aislamientos de palomares positivos y negativos en heces a cada uno de los criptococos, con la presencia o no de palomas infectadas en cloaca a través del test exacto de Fisher, no obteniendo diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos analizados tal y como queda reflejado en las Tablas (36 a 40) y Figuras (39 a 43).

4.2.7.3.1.- *Cryptococcus neoformans*

			C. neoformans en Cloaca		Total
			Negativo	Positivo	
C. neoformans en heces	**Negativo**	Recuento	34	1	35
		% de *C. neoformans* en Heces	97.1%	2.9%	100.0%
	Positivo	Recuento	40	4	44
		% de *C. neoformans* en Heces	90.9%	9.1%	100.0%
Total		Recuento	74	5	79
		% de *C. neoformans* en Heces	93.7%	6.3%	100.0%

Tabla 36.- Tabla de contingencia *C. neoformans* en heces * *C. neoformans* en cloaca Estadístico exacto de Fisher p = 0.259

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

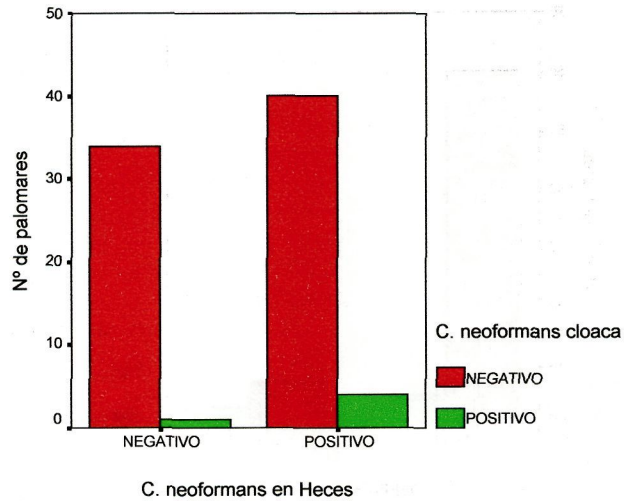


Figura 39.- Representación gráfica del número de palomares positivos y negativos en heces y cloaca a *C. neoformans*

4.2.7.3.2.- *Cryptococcus uniguttulatus*

			C. uniguttulatus en Cloaca		Total
			Negativo	Positivo	
C. uniguttulatus en heces	**Negativo**	Recuento	60	10	70
		% de *C uniguttulatus* en Heces	85.7%	14.3%	100.0%
	Positivo	Recuento	9		9
C.uniguttulatus		% de en Heces	100.0%		100.0%
Total		Recuento	69	10	79
C.uniguttulatus		% de en Heces	87.3%	12.7%	100.0%

Tabla 37.- Tabla de contingencia *C. unigutulattus* en heces * *C. unigutulattus* en cloaca Estadístico exacto de Fisher p = 0.275

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

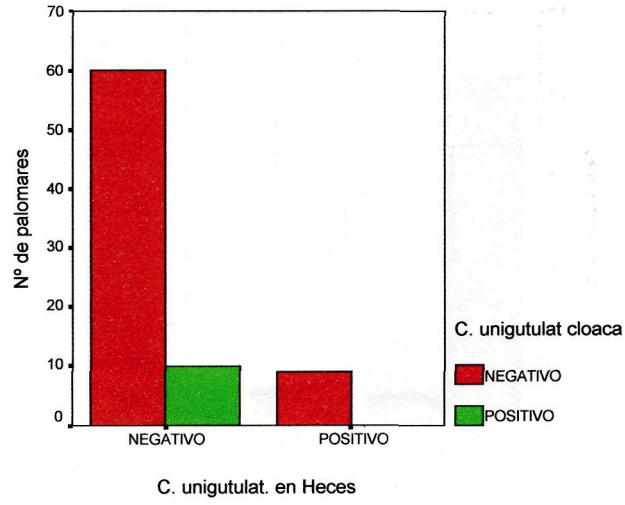


Figura 40.- Representación gráfica del número de palomares positivos y negativos en heces y cloaca a *C. uniguttulatus*

4.2.7.3.3.- *Cryptococcus laurentii*

			C. laurentii en Cloaca		Total
			Negativo	Positivo	
C. laurentii en heces	**Negativo**	Recuento	67	5	72
		% de *C. laurentii* en Heces	93.1%	6.9%	100.0%
	Positivo	Recuento	6	1	7
		% de *C. laurentii* en Heces	85.7%	14.3%	100.0%
Total		Recuento	73	6	79
		% de *C. laurentii* en Heces	92.4%	7.6%	100.0%

Tabla 38.- Tabla de contingencia *C. laurentii* en heces * *C. laurentii* en cloaca. Estadístico exacto de Fisher p = 0.438

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

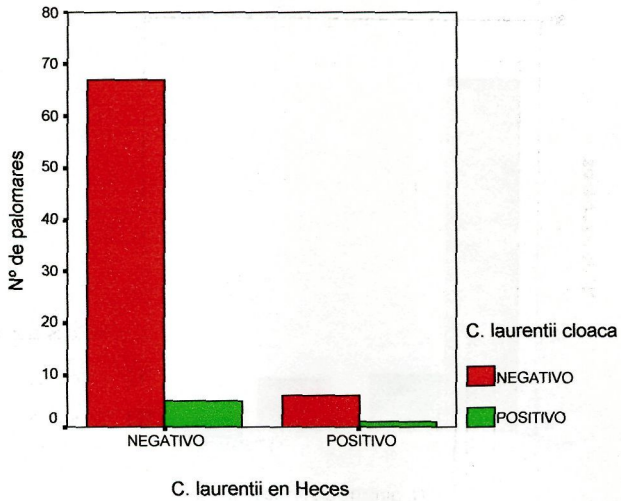


Figura 41.- Representación gráfica del número de palomares positivos y negativos en heces y cloaca a *C. laurentii*

4.2.7.3.4.- *Cryptococcus albidus*

			C. albidus en Cloaca		Total
			Negativo	Positivo	
C. albidus en heces	**Negativo**	Recuento	72	2	74
		% de *C. albidus* en Heces	97.3%	2.7%	100.0%
	Positivo	Recuento	4	1	5
		% de *C. albidus* en Heces	80.0%	20.0%	100.0%
Total		Recuento	76	3	79
		% de *C. albidus* en Heces	96.2%	3.8%	100.0%

Tabla 39.- Tabla de contingencia *C. albidus* en heces * *C. albidus* en cloaca. Estadístico exacto de Fisher p = 0.180

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

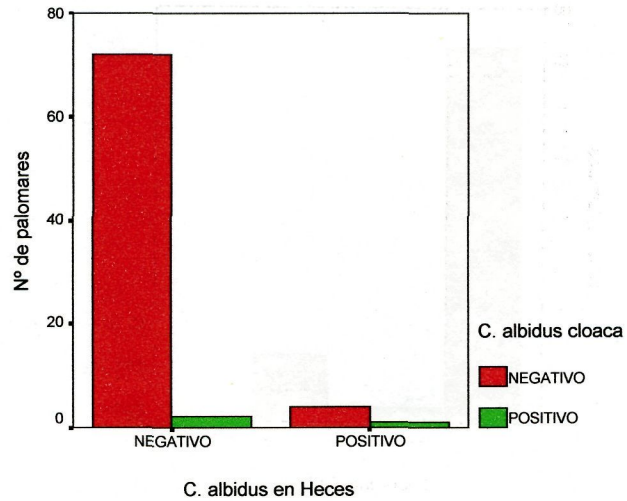


Figura 42.- Representación gráfica del número de palomares positivos y negativos en heces y cloaca a *C. albidus*

4.2.7.3.5.- *Candida albicans*

			C. albicans en Cloaca		Total
			Negativo	Positivo	
C. albicans en heces	**Negativo**	Recuento	64	3	67
		% de *C. albicans* en Heces	95.5%	4.5%	100.0%
	Positivo	Recuento	12		12
		% de *C. albicans* en Heces	100%		100.0%
Total		Recuento	76	3	79
		% de *C. albicans* en Heces	96.2%	3.8%	100.0%

Tabla 40.- Tabla de contingencia *C. albicans* en heces * *C. albicans* en cloaca Estadístico exacto de Fisher p = 0.606

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

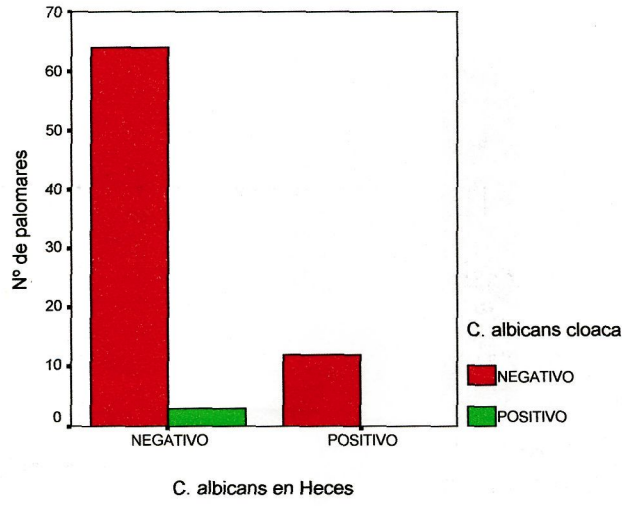


Figura 43.- Representación gráfica del número de palomares positivos y negativos en heces y cloaca a *C. albicans*

4.2.8.- ESTUDIO DISTRITOS

Para determinar la presencia de diferencias estadísticamente significativas en el aislamiento de *C. neoformans*, *C. uniguttulatus*, *C. laurentii*, *C. albidus* y *C. albicans* entre las diferentes zonas del municipio de Las Palmas de Gran Canaria, utilizamos el método estadístico de la Chi cuadrado de Pearson con el programa estadístico SPSS. No encontramos diferencias significativas en el aislamiento de las cepas pertenecientes al Género *Cryptococcus* ni en el caso de *C. albicans* entre las diferentes zonas. En las Tablas (41 a 45) se muestran los porcentajes de aislamiento de estas especies levaduriformes en cada una de las zonas estudiadas.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.8.1.- *Cryptococcus neoformans*

SECTOR ESTUDIADO		AUSENCIA-PRESENCIA *C. NEOFORMANS*		Total palomares muestreados
		0	1	
ZONA 1	Recuento	8	9	17
	% de P-A *C. neoformans*	47.1%	52.9%	100%
ZONA 2	Recuento	9	7	16
	% de P-A *C. neoformans*	56.3%	43.8%	100%
ZONA 3	Recuento	9	12	21
	% de P-A *C. neoformans*	42.9%	57.1%	100%
ZONA 4	Recuento	4	9	13
	% de P-A *C. neoformans*	30.8%	69.2%	100%
Total	Recuento	30	37	67
	% de P-A *C. neoformans*	44.8%	55.2%	100.0%

Tabla 41.- Porcentajes de aislamiento de *C. neoformans* en los diferentes distritos del municipio de Las Palmas de Gran Canaria. P-A: Presencia-ausencia. 0= ausencia; 1= presencia
Chi-cuadrado de Pearson., p valor: 0.583

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.8.2.- *Cryptococcus uniguttulatus*

SECTOR ESTUDIADO		AUSENCIA-PRESENCIA *C. UNIGUTTULATUS*		Total palomares muestreados
		0	**1**	
ZONA 1	Recuento	12	5	17
	% de P-A *C. uniguttulatus*	70.6%	29.4%	100%
ZONA 2	Recuento	11	5	16
	% de P-A *C. uniguttulatus*	68.8%	31.3%	100%
ZONA 3	Recuento	12	9	21
	% de P-A *C. uniguttulatus*	57.1%	42.9%	100%
ZONA 4	Recuento	9	4	13
	% de P-A *C. uniguttulatus*	69.2%	30.8%	100%
Total	Recuento	44	23	67
	% de P-A *C. uniguttulatus*	65.7%	34.3%	100.0%

Tabla 42.- Porcentajes de aislamiento de *C. uniguttulatus* en los diferentes distritos del municipio de Las Palmas de Gran Canaria. P-A: Presencia-ausencia. 0= ausencia; 1= presencia
Chi-cuadrado de Pearson., p valor: 0.801

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.8.3.- *Cryptococcus laurentii*

SECTOR ESTUDIADO		AUSENCIA-PRESENCIA *C. LAURENTII*		Total palomares muestreados
		0	1	
ZONA 1	Recuento	14	3	17
	% de P-A *C. laurentii*	82.4%	17.6%	100%
ZONA 2	Recuento	14	2	16
	% de P-A *C. laurentii*	87.5%	12.5%	100%
ZONA 3	Recuento	18	3	21
	% de P-A *C. laurentii*	85.7%	14.3%	100%
ZONA 4	Recuento	12	1	13
	% de P-A *C. laurentii*	92.3%	7.7%	100%
Total	Recuento	58	9	67
	% de P-A *C. laurentii*	86.6%	13.4%	100.0%

Tabla 43.- Porcentajes de aislamiento de *C. laurentii* en los diferentes distritos del municipio de Las Palmas de Gran Canaria. P-A: Presencia-ausencia. 0= ausencia; 1= presencia
Chi-cuadrado de Pearson., p valor: 0.884

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.8.4.- *Cryptococcus albidus*

SECTOR ESTUDIADO		AUSENCIA-PRESENCIA *C. ALBIDUS*		Total palomares muestreados
		0	**1**	
ZONA 1	Recuento	12	5	17
	% de P-A *C. albidus*	70.6%	29.4%	100%
ZONA 2	Recuento	12	4	16
	% de P-A *C. albidus*	75%	25%	100%
ZONA 3	Recuento	15	6	21
	% de P-A *C. albidus*	71.4%	28.6%	100%
ZONA 4	Recuento	8	5	13
	% de P-A *C. albidus*	61.5%	38.5%	100%
Total	Recuento	47	20	67
	% de P-A *C. albidus*	70.1%	29.9%	100.0%

Tabla 44.- Porcentajes de aislamiento de *C. albidus* en los diferentes distritos del municipio de Las Palmas de Gran Canaria. P-A: Presencia-ausencia. 0= ausencia; 1= presencia
Chi-cuadrado de Pearson., p valor: 0.883

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.2.8.5.- *Candida albicans*

SECTOR ESTUDIADO		AUSENCIA-PRESENCIA *C. ALBICANS*		Total palomares muestreados
		0	**1**	
ZONA 1	Recuento	16	1	17
	% de P-A ***C. albicans***	94.1%	5.9%	100%
ZONA 2	Recuento	10	6	16
	% de P-A ***C. albicans***	62.5%	37.5%	100%
ZONA 3	Recuento	17	4	21
	% de P-A ***C. albicans***	81%	19%	100%
ZONA 4	Recuento	12	1	13
	% de P-A ***C. albicans***	92.3%	7.7%	100%
Total	Recuento	55	12	67
	% de P-A ***C. albicans***	82.1%	17.9%	100.0%

Tabla 45.- Porcentajes de aislamiento de *C. albicans* en los diferentes distritos del municipio de Las Palmas de Gran Canaria y el resto de municipios. P-A: Presencia-ausencia. 0= ausencia; 1= presencia Chi-cuadrado de Pearson., p valor: 0.079

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

4.3.- AISLAMIENTOS LEVADURIFORMES OBTENIDOS EN EL MUESTREO DE LAS PLAZAS PÚBLICAS

De las muestras de excretas analizadas en las 17 plazas públicas muestreadas en la isla de Gran Canaria, *C. laurentii* estuvo presente en 4 de ellas, lo que representa el 23.52%, *C. albidus* en 3 (17.64%), *C. neoformans* en 2 (11.76%) y *C. uniguttulatus* en 1 (5.88%), de lo que obtenemos que el criptococo que mayor porcentaje de aislamiento presentó fue el *C. laurentii* con el 23.52% y el de menor frecuencia de aislamiento fue el *C. uniguttulatus*, siendo únicamente en el municipio de Agaete donde se aislaron de forma conjunta a *C. laurentii* y *C. uniguttulatus*. Sin embargo, la levadura aislada con mayor frecuencia ha sido *C. albicans*, la cual se detectó en 5 de ellas (29%). *Candida* spp. estuvo presente en 4 plazas (23.52%), *C. krusei/inconspicua* en 3 (17.64%), *C. guilliermondii* y *C. famata* en 2 (11.76%) y *C. lusitaniae*, *C. glabrata* y *C. pelliculosa* en una plaza, representando estas últimas especies las que se aislaron con menor frecuencia (5.88%). En la Tabla 46 se detallan las especies levaduriformes aisladas en cada una de las plazas muestreadas en nuestro estudio.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

MUNICIPIO	PLAZAS	AISLAMIENTOS OBTENIDOS
	Santa Ana	*C. albicans*
	San Telmo	*C. albidus,* *C. krusei/inconspicua,* *Candida spp*
	Santa Catalina	*Candida spp*
Las Palmas de Gran Canaria	**Ingeniero Manuel Becerra**	*C. laurentii*, *C. albicans*, *C. famata*, *R. mucilaginosa*
	El muelle Grande	*C. albidus*, *Candida glabrata*
	Argentina	*R. mucilaginosa*, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *Candida spp*
	Escaleritas	-
	Schamann	*C. pelliculosa*
	Plaza de la Feria	*C. krusei/inconspicua*
Telde	**San Juan**	*C. laurentii*, *C. guilliermondii*
	San Gregorio	*R. mucilaginosa*
Agaete	La Concepción	*C. uniguttulatus*, *C. laurentii* *C. guilliermondii*
Arucas	San Juan	*C. neoformans* *C. albicans* *T. asahii* *R. mucilaginosa*
Firgas		*C. laurentii* *C. albicans* *R. mucilaginosa*
Gáldar	Santiago de los Caballeros	*C. albidus*
Santa Mª de Guía		*C. albicans* *T. asahii*
Teror	Basílica de Ntra Sra del Pino	*C. neoformans* *C. krusei/inconspicua* *Candida spp*

Tabla 46.- Especies levaduriformes aisladas en las plazas públicas muestreadas en nuestro estudio.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Discusión

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

El agar *Guizotia abyssinica* es un excelente medio diferencial para el aislamiento primario, separación inmediata e identificación presuntiva de *C. neoformans*, aún cuando se presenten colonias de otros hongos o incluso otras especies pertenecientes al Género *Cryptococcus* incapaces de producir dicha coloración. El 100% de las cepas identificadas como *C. neoformans* en nuestro estudio, produjeron pigmentación color café. Estudios recientes realizados por Ikeda y cols. (2002) confirman que no sólo *C. neoformans* produce fenoloxidasa sino que otras especies de criptococos tales como *C. albidus*, *C. laurentii* y *C. curvatus*, tienen potencial para expresar esta enzima y por lo tanto sintetizar melanina, aunque esta actividad es menor que la de *C. neoformans*. Staib (1999), observa que otros criptococos pueden dar en este medio tonalidades marrón (*C. gastricus*, *C. neoformans* var. *neoformans*), colonias marrón claro (*C. dimennae*, *C. terreus* y *C. albidus*) e incluso coloración verde (*C. neoformans* var. *gattii* y *C. laurentii*), ésta última parece estar relacionada con la actividad letal que ejercen estos criptococos al producir una toxina denominada mycocina. En nuestro estudio, ninguna de las cepas identificadas como *C. laurentii*, *C. uniguttulatus* y *C. albidus* produjo coloración alguna en este medio. La mayoría de los autores han usado este medio obteniendo buenos resultados para la identificación de *C. neoformans* (Weber y Schäfer., 1991 y Baró y cols., 1998 A y B) Recientemente, han surgido modificaciones del mismo que utilizan como sustrato semillas distintas a la negrilla tales como alpiste y semilla de girasol (Colom y cols., 1997; Diamond, 1997; Pal, 1997).

No obstante, tras observar esta coloración en el medio y dada la posibilidad anteriormente descrita de otras especies de criptococos capaces de producir coloración en el mismo, se estudió la asimilación de azúcares de todas las cepas utilizando API 20 C AUX, ya descrito previamente por diversos autores como un buen sistema para la identificación de distintas especies de criptococos (Hermoso de Mendoza., 1984 A; Baró y cols., 1998 A y B; Smith y cols., 1999; Koh y cols., 2002).

Desde que en 1982 A, Kwon-Chung y cols. proponen el medio de cultivo conocido como CGB (Canavanina-Glicina-Azul bromotimol), que

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

permitía la diferenciación de ambas variedades con alta especificidad, éste ha sido empleado por diferentes autores para la diferenciación sencilla y específica de las 2 variedades (Hermoso de Mendoza., 1987; Kwon-Chung y cols., 1994; Speed y Dunt, 1995; Ellis y cols., 1996; Colom y cols., 1997; Baró y cols., 1999; Colom y cols., 2001). La capacidad de la variedad *gattii* de resistir y crecer en presencia de L-canavanina y utilizar la glicina como una única fuente de carbono, ocasiona un viraje del medio de amarillo dorado a un azul intenso, propiedad que no presenta la variedad *neoformans*.

C. neoformans var. *gattii* jamás ha sido aislado de heces aviares, (Baró y cols., 1998 A); y nuestros resultados ponen de manifiesto una vez más que *C. neoformans* var. *neoformans* ha sido la variedad aislada de esta fuente ambiental (heces de paloma) y que el medio CGB permite la correcta identificación y separación de ambas variedades de esta especie levaduriforme. Igualmente, mediante el uso de este medio pudimos confirmar que el 100% de las cepas identificadas en nuestro estudio como *C. neoformans* (aislados clínicos humanos y ambientales), pertenecían a la variedad *neoformans* al no producirse ningún cambio de color en el medio, resultados que se corresponden con los observados en otros estudios llevados a cabo en España por Hermoso de Mendoza en 1984 A, Colom y cols. en el año 1997, Baró y cols. en 1999 y Colom y cols. en el año 2001 y en otros países (Caicedo y cols., 1996; Fernández Andreu y cols., 1998; Castañón Olivares y cols., 2000; Kielstein y cols., 2000 A).

Es escasa la bibliografía que existe cuando se trata de entender el papel que juega la paloma como portadora de *C. neoformans* var. *neoformans* en **cloaca**, dato de especial importancia en la epidemiología de la criptococosis. Más escasa resulta cuando el agente etiológico de esta patología es una especie distinta de la habitual como *C. laurentii, C. albidus* o *C. uniguttulatus*. La mayoría de los estudios realizados con palomas se han centrado en el aislamiento de *C. neoformans* var. *neoformans*, despreocupándose de estas otras especies anteriormente citadas que toman día a día una mayor significación clínica.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Nuestros resultados coinciden con los expuestos por Mattsson y cols. en 1999, que aislaron *C. uniguttulatus* y *C. laurentii* de la cloaca de dichas aves. Sin embargo, no lograron aislar *C. neoformans* var. *neoformans* ni *C. albidus* en ninguna de las muestras analizadas. Todos ellos han sido referidos como responsables etiológicos de criptococosis clínica (Gugnani y cols., 1989; Custis y cols., 1995; Krcmery y cols., 1997; Johnson y cols., 1998; Kordossis y cols., 1998; Ritterband y cols., 1998; Cheng y cols., 2001). Existe cierta controversia en el aislamiento de distintas especies de criptococos de cloaca de palomas, basada principalmente en la alta temperatura corporal de estas aves. En 1965, Littman y cols. consiguen infectar palomos vía parenteral y Weiland y cols. y Hermoso de Mendoza y cols. en 1968 y 1984 B respectivamente, observaron casos de infección natural en estas aves. Además, Littman en 1968 mostró que *C. neoformans* era capaz de sobrevivir al pasaje gastrointestinal apareciendo posteriormente en heces frescas (dichas palomas eran instiladas con una suspensión de *C. neoformans* en buche). Otros trabajos muestran la existencia de cepas de *C. neoformans* capaces de multiplicarse a 41 y a 43ºC e incluso la capacidad de sobrevivir durante días a la exposición de 45-46ºC (Saez, 1978; Bohm, 1980). Todo lo anteriormente expuesto apoya la viabilidad de nuestros aislamientos de *C. neoformans* en la cloaca de estas aves.

Nuestros aislamientos en cloaca de paloma de *C. albidus*, *C. laurentii* y *C. uniguttulatus* se encuentran apoyados no sólo por los aislamientos de Mattsson y cols. sino también por otras referencias que los han descrito en varias ocasiones como especies termotolerantes a 37ºC. Van Uden y cols. en 1957 y Kurtzman y Fell en 1998 describen cepas de *C. albidus* capaces de crecer a 37ºC y Saez (1978) describe cepas de *C. uniguttulatus* capaces de crecer a esta misma temperatura y cepas de *C. laurentii* capaces de crecer a 38ºC. No obstante, suponemos que dichas especies de criptococos al igual que *C. neoformans* no son capaces de replicarse en el tracto gastrointestinal, sino que el aislamiento en cloaca se debe a la supervivencia de un pequeño número de criptococos localizados inicialmente en buche, aunque otros autores han demostrado experimentalmente la termotolerancia

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

y replicación de *C. neoformans* a 43ºC, por lo que ellos no descartan que esta levadura pueda replicarse en el tracto gastrointestinal (Hermoso de Mendoza y cols., 1987).

Respecto al aislamiento en esta localización de *C. albidus, C. laurentii* y *C. uniguttulatus*, especies reconocidamente más termosensibles, cabría sospechar su origen en una contaminación exógena, pero teniendo presentes la desinfección de la zona cloacal previa a la toma de muestras y la presencia en buche de las mismas especies, así como el rápido tránsito de *C. neoformans* por el aparato digestivo en estas aves (< 24 h., según Littman y cols. 1968), es posible especular que al menos algunas cepas resistan dicho tránsito.

Precisamente nuestros resultados de termotolerancia *in vitro* concuerdan con los expuestos por Phaff y Fell en 1970 y Saez en 1978, difiriendo únicamente en la termotolerancia de *C. albidus*, aunque en nuestro estudio el 45% de *C. albidus* sobrevivió a una temperatura de 39ºC.

Las palomas actúan como portadoras en cloaca de distintas especies de criptococos, que al ser expulsados pasan directamente a las heces, sustrato rico en nitrógeno no proteico que favorece su multiplicación (Littman y Borok, 1968). Por ello nos atrevemos a sugerir que la paloma mensajera, en sus largos viajes puede diseminar estos criptococos en puntos lejanos respecto a los de su origen y contaminar ambientes quizás anteriormente libres de estos microorganismos, aún teniendo presente que la cantidad de levaduras existentes en cloaca sea muy inferior en número a las existentes inicialmente en buche.

Nuestros resultados confirman que la paloma es también un importante portador en **buche** de distintas especies de criptococos: *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. laurentii*, *C. albidus* y *C. uniguttulatus*, todos ellos capaces de desarrollar cuadros clínicos de criptococosis como ya se ha comentado anteriormente. Efectivamente *C. neoformans* var. *neoformans* y *C. albidus*, han sido previamente aislados en esta localización

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

por Swinne-Desgain en 1975 y por Hermoso de Mendoza en 1987. Nuestros resultados muestran que la frecuencia de portadores en buche de *C. neoformans* (9.66%) es similar a los resultados obtenidos por éste último autor (8.2%) en un estudio realizado en buche, con un tamaño muestral similar al nuestro, aunque la frecuencia de portadores en buche de *C. albidus* obtenida por Hermoso de Mendoza (1987) es significativamente menor (0.98%) a la nuestra (6.94%). Khan y cols. confirmaron en 1978 la existencia de *Cryptococcus neoformans* en el buche de palomas en la India trabajando con un tamaño muestral similar al nuestro y logrando un aislamiento de 1.3%, resultado muy inferior al obtenido por nosotros.

No hemos encontrado referencias previas de aislamientos en buche de *C. laurentii* y *C. uniguttulatus* con las que contrastar nuestros datos, pese al considerable interés de estas especies desde el punto de vista epidemiológico, ya que son citadas en repetidas ocasiones como responsables de cuadros clínicos (Johnson y cols., 1998; Kordossis y cols., 1998; Ritterband y cols., 1998; Cheng y cols., 2001; McCurdy y Morrow, 2001). La paloma resulta ser un importante portador en buche no sólo de *C. neoformans* var. *neoformans* ya descrito, sino también de *C. laurentii, C. albidus* y *C. uniguttulatus* (Swinne Desgain, 1976; Khan y cols., 1978 y Hermoso de Mendoza, 1987).

Otras especies levaduriformes aisladas en muestras de buche han sido *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. zeylanoides*, *C. famata* (sinónimo de *T. candida*), *S. cerevisiae, R. glutinis* y *R. mucilaginosa* (sinónimo de *R. rubra*) aislamientos que coinciden con los obtenidos por Hermoso de Mendoza en 1987. Sin embargo, este último autor aísla *C. tropicalis,* no obtenida en nuestro estudio. Además nosotros hemos obtenido *C. kefyr*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa*, *T. asahii*, *T. mucoides* y *P. wickerhamii,* no existiendo referencias que hagan mención al aislamiento de estas últimas especies levaduriformes.

En repetidas ocasiones *C. neoformans* var. *neoformans* ha sido aislado de **heces aviares** (Staib y Schulz-Dieterjch, 1984; Mangiarotti y cols., 1993, Staib, 1994, Colom y cols., 1997; Kielstein y cols., 2000A).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Mangiarotti y cols. en 1993 pusieron en evidencia la presencia de *C. laurentii* en heces de gallinas; Colom y cols. en 1997 y Mattson y cols. en 1999, comunicaron la presencia de este criptococo en excrementos de palomas, y éste último aísla también a *C. uniguttulatus*. Previo a nuestro estudio, pocas son las referencias que hacen mención al aislamiento de *C. albidus* en heces de paloma (Schonheyder y Stenderup, 1982; Colom y cols., 1997; Kielstein y cols., 2000A). Tan sólo Maldonado y cols. en el año 2001, obtienen resultados similares a los nuestros aislando a *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. uniguttulatus* y *C. curvatus* (sinónimo de *Candida curvata*) pero no a *C. neoformans;* y Vidotto y Gallo en 1985, y Gallo y cols. en 1989 aíslan *Cryptococcus albidus, C. laurentii* y *C. neoformans pero* no *C. uniguttulatus*, aunque Vidotto y Gallo en 1985 aislaron *C. terreus*, no aislado por nosotros.

En nuestro estudio hemos podido aislar de heces de palomas especies levaduriformes con potencialidad patógena. Ya Staib en 1963 y Kielstein en el año 2000 A, determinan que las heces de paloma constituyen un buen medio para el crecimiento y la supervivencia de *C. neoformans* y otras especies de criptococos, sobre todo por su composición bioquímica y por su elevado contenido en ácido úrico, xantina, guanina y creatinina, ésta última utilizada especialmente por *C. neoformans*. De nuestro estudio se desprende que las condiciones climáticas y medioambientales de Gran Canaria son excelentes para el desarrollo y viabilidad de distintas especies de criptococos, pues existen pocas referencias que hagan mención al aislamiento de tantas especies de criptococos obtenidas de una misma muestra. Aún así, nos llama la atención no haber aislado *C. humicolus* ni *C. curvatus* citados también como productores de cuadros clínicos en patología humana (Sugita y cols., 2000; Ikeda y cols., 2000 y 2002).

Otras especies levaduriformes aisladas en muestras de excretas han sido: *C. albicans*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. rugosa*, *C. parapsilosis*, *R. glutinis*, *R. mucilaginosa* (sinónimo de *R. rubra*) y *S. cerevisiae*, las cuales coinciden con las aisladas anteriormente por Vidotto y Gallo en 1985 y Gallo y cols. en 1989. Estudios realizados por estos autores, indican que la paloma es un vector importante de patógenos para el hombre

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

y los animales domésticos, representando un serio problema higiénico-sanitario. Estos autores demostraron que la carga fúngica presente en éstas era elevada, aislando además: *C. krusei, C. intermedia, C. pseudotropicalis, C. tropicalis, C. humicola, C. lypolitica, C. lambica, C. zeylanoides, Pichia membranaefaciens, Pichia anomala* (forma sexual de *Candida pelliculosa), Geotrichum sp, Kloeckera apiculata, S. oleaginosus, S. telluris, T. beigelii, T. capitatum* y *T. pullulans*, muchas de las cuales se consideran patógenas (Hoog y Guarro,1995).

Maldonado y cols. en el año 2001, aislaron *C. famata* y otras especies levaduriformes no presentes en nuestros aislamientos: *C. holmii, C. globosa, C. norvegica, C. colliculosa* y *Saccharomyces kluyverii*. No obstante, hemos aislado *C. pelliculosa, T. asahii, T. mucoides* no relacionadas anteriormente con muestras de heces de paloma.

Comparando nuestros aislamientos de *C. neoformans* en esta muestra (33.9% por palomar), con los obtenidos por otros autores en otros países independientemente de que sus estudios hayan sido realizados en zonas urbanas o en palomares, observamos que dicho porcentaje solamente ha sido superado en China (69.4%) y Colombia (49.6%) (Li y cols., 1993 y Caicedo y cols., 1996). En España, en 1980, Pérez Ramos no aísla *C. neoformans* de ninguna de las muestras analizadas en la provincia de Cádiz, sin embargo, aísla esta especie en un porcentaje mayor (68%) al obtenido por nosotros en la provincia de León, y en la provincia de Sevilla aísla dicha especie levaduriforme en un porcentaje de 3.03%.

Estudios realizados en otros países del mundo han mostrado un porcentaje de aislamiento muy inferior al nuestro: Alemania (18.6%) (Weber Albert y Renate Schäfer, 1991), Suecia (0%) (Mattsson y cols., 1999), Austria (0%) (Kielstein y cols., 2000 A), Etiopía (4.7%) (Yimtubezenash y cols., 2001), Egipto (15%) (Refai y cols., 1983), Irán (17.8%) (Khosravi, 1997), Turquía (13.9% y 4.6%) (Yilmaz y cols., 1989 y Yildiran y cols., 1998), en Nepal (25%) (Pal, 1997) y en México (20.7%) (Castañón Olivares y López Martínez, 1994).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Con respecto al aislamiento de *C. laurentii* en excrementos, Mattsson y cols. (1999) lo aíslan en un porcentaje muy superior (68.57%) al nuestro (4.59%) sobre un muestreo significativamente menor (35 muestras) y Pérez Ramos (1980) no aísla esta especie levaduriforme en ninguna de las 116 muestras de heces de palomas estudiadas en las provincias de Cádiz, Sevilla y León.

Respecto a *C. albidus,* éste ha sido aislado recientemente en Austria en un porcentaje muy superior (50%) al nuestro (3.44%) por Kielstein y cols. (2000). En Gran Canaria el porcentaje de aislamiento de este criptococo en excrementos de palomas de palomares es similar al conseguido por Pérez Ramos en la provincia de Cádiz (3.45%), inferior al conseguido en Sevilla (12.12%) y superior al de León (0%).

Este último autor también ha aislado a *C. uniguttulatus* de la provincia de Sevilla en un 24.24% de las muestras de excretas analizadas, porcentaje superior al obtenido por nosotros (5.17%) y por Mattsson y cols. en 1999 (11.43%) en un estudio realizado en Suecia. En España, los únicos estudios existentes al respecto corresponden a Pérez Ramos en el año 1980 trabajando en las provincias de Cádiz y León no mostrando la presencia de esta levadura en dichas provincias.

Si comparamos los porcentajes de aislamiento de las distintas especies levaduriformes obtenidas en heces en palomar con las obtenidas en las excretas muestreadas de las plazas públicas, observamos que en esta última, el criptococo mayormente aislado corresponde a *C. laurenttii* (23.52%) frente a los palomares privados (4.59%), en el caso de *C. albidus*, en plazas públicas representa el 17.64% frente a 3.44% en palomares, *C. neoformans* supone un 11.76% de los aislamientos y en palomares 33.9%, *C. uniguttulatus* en plazas públicas de un 5.88% frente a un 5.17% en palomares. *C. albicans* supuso un 29% en plazas públicas y *Candida* spp. un 23.52%, *C. krusei/inconspicua* 17.64% respecto a los aislados en palomares y por el mismo orden en donde *C. albicans* supuso un 7.47%. *Candida* spp. 12.06%, *C. krusei/inconspicua* 0%. Al analizar estos datos comprobamos

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

que las siguientes especies levaduriformes que citamos por orden de frecuencia de aislamiento: *Candida* spp., *C. laurentii*, *C. albidus*, *C. albicans* y *C. uniguttulatus* se aíslan con mayor frecuencia en las plazas públicas que en los palomares privados y el único aislado con mayor frecuencia en palomares con respecto a las plazas públicas es el *C. neoformans*.

Estos datos llaman nuestra atención pues en un principio pensamos que en las plazas públicas, debido a una mayor incidencia directa de la luz solar y por lo tanto de los rayos ultravioletas, así como la falta de acúmulo de excretas en estos lugares iban a representar un menor porcentaje de aislamientos respecto al obtenido en los palomares, máxime si tenemos presente los resultados obtenidos por Caicedo y cols. en el año 1996 que apuntaban que la probabilidad de encontrarlo en excretas acumuladas es mucho mayor, llegando incluso a observar que una alta densidad de palomas constituía también un factor importante en el porcentaje de aislamiento obtenido. Los resultados obtenidos nos hacen pensar que realmente las condiciones necesarias para la replicación y viabilidad de *C. neoformans* y otros *Cryptococcus* spp. sean distintas. Colom, en 1997, obtuvo resultados muy similares a los nuestros en *C. neoformans, C. laurentii* y *C. albidus*, mostrando el aislamiento de *C. neoformans* y *C. laurentii* tanto en zonas urbanas como en palomares, no obstante, *C. neoformans* es mayormente aislado en palomares y *C. laurentii* y *C. albidus* en zonas urbanas.

Hasta la fecha, no existían estudios sobre el papel que podría representar la paloma como reservorio de hongos levaduriformes con impacto en la salud pública en las plazas de nuestra Comunidad Autónoma. Estos espacios de recreo y ocio concentran de forma habitual a un gran número de personas, principalmente niños y ancianos, así como individuos marginados y afectos de SIDA que toman asiento en ellas de forma asidua. Estudios realizados por Littman y Borok en 1968 ponían de manifiesto que las palomas salvajes podían ser portadoras de *C. neoformans* var. *neoformans* y diseminarlo en el medio ambiente. Además, Matsson y cols. en 1999 sugieren que las palomas salvajes pueden ser portadoras de hongos patógenos

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

incluyendo a *C. neoformans* var. *neoformans*. El hecho de que éstas abunden en muchas ciudades y se asocien a altas edificaciones tales como hospitales, aumenta la probabilidad de que algunos pacientes susceptibles tomen contacto con ellas y sus excretas, pudiendo dar lugar a infecciones nosocomiales.

Los resultados anteriormente expuestos confirman que realmente las excretas de paloma localizadas en plazas públicas, suponen un reservorio de estos agentes infectivos para el hombre y los animales. Caicedo y cols., en 1996 ya recalcaban la importancia de emprender campañas que eviten la acumulación de excretas de paloma en estas áreas ya que si el grado de contaminación es elevado podría convertirse en un peligro para la salud pública. En el año 1987, Hermoso de Mendoza y cols. emitieron la hipótesis, dado sus resultados, de que el riesgo para la población en general que suponían las aves de vida libre, nidificantes en parques, edificios públicos y jardines era mínimo ya que en ninguno de sus dos colectivos muestreados habían detectado portador alguno. Apuntó en dicho estudio que estos datos deberían ser sometidos a un exhaustivo estudio pues resultaba paradójico que la infección criptococócica fuera más frecuente en palomares domésticos de aves deportivas y ornamentales, a menudo de gran valor y objeto de mayores cuidados y mejor higiene que los puramente utilitarios de zuritos o que las aves de vida libre. Nuestro estudio reafirma la hipótesis planteada por Hermoso de Mendoza y cols. (1987) con respecto a especies de criptococos distintas a *C. neoformans*, ya que realmente nuestro estudio reafirma que *C. neoformans* está primordialmente presente en los palomares privados y se encuentra en un bajo porcentaje en las zonas urbanas, suponiendo un riesgo escaso para la población general. Realmente las personas dedicadas a la colombofilia y aquellas que viven colindantes a estos palomares, tienen un mayor riesgo de infección.

Hermos intentado estudiar la **prevalencia** de las distintas especies levaduriformes por palomar, considerando que la verdadera prevalencia de estas levaduras debe de ser dada estudiando la presencia de las mismas en varias localizaciones, máxime si tenemos en cuenta la influencia que ejerce

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

la temperatura en estos aislamientos. Por lo tanto, hemos querido establecer la prevalencia de infección por palomar para las distintas especies levaduriformes obtenidas en nuestro estudio independientemente de la muestra de la que hayan sido aisladas, estos resultados quedaron expuestos en el apartado de resultados 4.2.6. Tal y como pensábamos *C. neoformans* se encuentra presente en nuestros palomares con una alta prevalencia (56.97%). No obstante, nunca pensamos que se encontrara en una mayor proporción con respecto a *C. albicans*, levadura que se considera flora habitual del tracto digestivo de estas aves, habiendo observado para esta última una prevalencia de infección por palomar en la isla de Gran Canaria de un 23.25%. Otras especies de criptococos han obtenido también una mayor prevalencia que la de *C. albicans*, tal es el caso de *C. uniguttulatus* (32.55%) y *C. albidus* (25.58%). *C. laurentii* tiene una baja prevalencia en nuestros palomares (11.62%). No hemos encontrado referencias en otros países o ciudades que calculen la prevalencia de infección en palomares usando simultáneamente aislamientos procedentes de distintas muestras. Sin embargo, teniendo sólo en cuenta las muestras de buche, la frecuencia media de infección por palomares a *C. neoformans* obtenida por Hermoso de Mendoza en 1984 A es superior a la obtenida por nosotros en esta localización (36.8% frente a un 23.17%), mientras que en el caso de *C. albidus* la frecuencia media de infección por palomares obtenida por nosotros fue superior a la obtenida por este autor (20.7% frente a un 2.63%). Kielstein y cols. (2000 A), analizando muestras de excretas obtienen una frecuencia de infección por palomares del 40.5%, porcentaje inferior al obtenido por nosotros en esta misma localización (55.42%).

Sólo existen suposiciones o inoculaciones experimentales encaminadas a demostrar que *C. neofomans* es capaz de sobrevivir al tránsito gastrointestinal de las palomas. Nadie anteriormente ha relacionado aislamientos de distintas especies de criptococos y *C. albicans* en excretas, buche y cloaca. Para determinar si existe relación entre los aislamientos procedentes en estas localizaciones hemos aplicado el **test exacto de Fisher.**

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Al relacionar los aislamientos de heces con los obtenidos de buche, dicho test mostró diferencias significativas para *C. neoformans; C. uniguttulatus*, *C. laurentii* y *C. albicans*. No hemos obtenido diferencias significativas respecto a *C. albidus*, pensamos que éste último resultado sea debido a que la proporción con la que se aísla dicha especie de criptococo en heces es la menor del estudio. Por lo tanto, opinamos que palomares infectados por distintas especies de criptococos conlleva a la infección en buche de sus palomas, no obstante, no de todos los palomares infectados se ha conseguido el aislamiento de dichas especies de criptococos en buche, por lo que suponemos que la dosis infectiva necesaria para conseguir el aislamiento de dichas especies levaduriformes en buche ha de ser grande, considerando que una gran proporción de dicha dosis infectiva puede morir debido a la elevada temperatura (42ºC) de estas aves, ya que distintos autores, han observado la variabilidad en la termotolerancia de las levaduras anteriormente citadas. De 100 palomares infectados en heces por *C. neoformans* tan solo 38.6 presentan palomas infectadas en sus buches, de *C. uniguttulatus* tan solo 18.6, *C. laurentii* 28.6, *C. albidus* 40 y *C. albicans* 33.3, con lo que aportamos que de 100 palomares infectados en heces por distintas especies de criptococos y *C. albicans*, el rango de infección de sus palomas en buche, oscila entre 18.6% y 40%. Observamos también la existencia de palomares que en nuestro estudio se mostraron libres en heces de distintas especies de criptococos y de *C. albicans* consiguiéndose el aislamiento en buche de estas especies levaduriformes. Pensamos que esto podría deberse a la contaminación por bacterias y hongos filamentosos obtenidas durante nuestro estudio al procesar las muestras de heces que podrían haber enmascarado la presencia de dichos criptococos en esta muestra, con lo que concluimos que realmente aquellos palomares cuyas palomas se mostraron infectadas en buche siendo negativas en heces podrían ser realmente falsos negativos, máxime si tenemos en cuenta el bajo porcentaje con el que este fenómeno se observó durante nuestra experiencia. Para *C. neoformans* un 5.7% de infectados en buche de palomares libres en heces, para *C. uniguttulatus* 18.6%, para *C. laurentii* 0%, *C. albidus* 20.3% y para *C. albicans* 9%.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Al correlacionar los aislamientos obtenidos de heces-cloaca, el test de Fisher no ha mostrado diferencias significativas para ninguna de las levaduras estudiadas. Realmente al analizar detenidamente los aislamientos procedentes de estas dos muestras, observamos que el porcentaje de aislamiento de estas especies levaduriformes en cloaca es mínimo respecto a los palomares infectados en heces por las mismas. De un total de 79 palomares estudiados, 44 eran positivos al aislamiento de *C. neoformans* en heces y tan solo 4 palomares mostraron palomas infectadas en cloaca lo que supone un 9.1%. Respecto a *C. uniguttulatus* en el mismo estudio de 9 palomares infectados en heces, ninguno mostró palomas infectadas en cloaca lo que implica un 0% de aislamiento. 7 palomares infectados en heces por *C. laurentii* y tan solo 1 infectado en cloaca, para *C. albidus* de 5 palomares infectados en heces 1 solo infectado en cloaca y por último de 12 palomares infectados en heces por *C. albicans*, ningún aislamiento de dicha levadura en cloaca. Realmente estos datos apoyaría al test exacto de Fisher que afirma que no existe relación entre dichos aislados.

Si estos resultados los comparamos con los obtenidos de buche, observamos para *C. neoformans* de 100 palomares infectados en heces un 38.6 infectados en buche, 9.1 infectados en cloaca. *C. uniguttulatus*, de 100 palomares infectados en heces, 55.6 en buche y 0 en cloaca, *C. laurentii* para el mismo número de palomares infectados en heces 28.6 en buche y 14.3 en cloacas, *C. albidus* 40 infectados en buche y 20 en cloaca y por último de 100 palomares infectados en heces por *C. albicans* 33.3 en buche y 0 en cloaca, con lo que se demuestra realmente que un alto porcentaje de dichas especies levaduriformes mueren en el pasaje gastrointestinal, debiéndose la baja proporción de aislamientos en cloaca a este fenómeno y existiendo realmente una correlación entre palomares infectados en buche y la presencia de dichas levaduras en cloaca.

Se observa también en este apartado de nuestro estudio el aislamiento de estas levaduras en cloaca de palomas de los palomares negativos al aislamiento de los mismos, opinando que dicho fenómeno es

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

explicado de la misma manera que hemos expuesto en el caso de los aislamientos heces-buche.

Por último, al analizar las posibles relaciones entre los aislamientos obtenidos de buche y cloaca, observamos tal como adelantábamos en el apartado anterior que el porcentaje de aislamiento de las distintas especies de criptococos y *C. albicans* obtenidas de cloaca respecto a las de buche es mucho menor, por lo que aún existiendo desde el punto de vista científico una relación entre animales infectados en cloaca y buche, al aplicar el test de Fisher, éste afirma que dicha relación no existe.

Estos resultados estarían aclarados tal como exponíamos por la termotolerancia de dichas especies levaduriformes (Saez, 1978; Lennette y cols., 1987 y Fell y Statzell-Tallman, 1998), si bien es verdad que existen autores que obtienen para *C. neoformans* una alta termotolerancia, de tal forma que a una temperatura de 41ºC, Hermoso de Mendoza (1984 A) observa que el 100% de las cepas crecen, sin embargo a 43ºC sólo crecieron dos sobre el total de cepas estudiadas y el resto sobrevivió. A 45ºC no creció ni sobrevivió ninguna cepa. En nuestro caso la termotolerancia para dicha especie a 42ºC ha sido de un 30%. Teniendo en cuenta que ya Littman y cols en 1968 realizaron estudios sobre la termorregulación de éstas aves y que establecieron unos rangos de temperatura en cloaca entre 41ºC-43ºC y observaron que la temperatura rectal era tres décimas superior a la existente en buche, correspondiendo una temperatura rectal de 43.1ºC a una temperatura en buche de 42.8ºC y una temperatura corporal tomada debajo del ala de 42.7ºC. Estos datos vienen a apoyar el menor porcentaje de aislamientos obtenidos en cloaca respecto a buche.

También observamos con estos datos que realmente la termotolerancia *in vivo* no se corresponde con la obtenida por otros autores *in vitro* (Hermoso de Mendoza., 1984 A) ya que esta disminución del porcentaje de aislamiento de cloaca con respecto a los inicialmente

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

obtenidos en buche hace pensar que muchas de estas levaduras quedan en el tránsito gastrointestinal sin replicarse y sin sobrevivir a 42ºC.

Es por esta razón por la que pensamos que los resultados obtenidos con el test exacto de Fisher para *C. neoformans*, *C. uniguttulatus* y *C. albidus* serían erróneos, acertando dicho test en el caso de *C. laurentii* y *C. albicans*. Pensamos que en el caso de *C. laurentii* dicho test se muestra efectivo debido al bajísima proporción con la que dicha levadura aparece en buche, de 331 palomas muestreadas, tan solo dos se mostraron infectadas por este criptococo en dicha localización. En el caso de *C. albicans* pensamos que dicho test se ha mostrado también efectivo debido a que no se ha conseguido ningún aislamiento de esta levadura en cloaca de animales libres en buche. Cerrando este apartado, y al no existir estudios similares al nuestro, lo cual nos ha impedido contrastar nuestros resultados, pensamos que el test exacto de Fisher no es apto en este tipo de estudio pues existen factores como la temperatura que interfieren en los resultados de este test.

Para la identificación de géneros y especies nos ha resultado de vital importancia la utilización de medios actualizados, observando que el uso del API 20 C AUX era actualizado en géneros y datos bioquímicos de las distintas especies de forma periódica. Así, llegamos a detectar géneros nombrados por otros autores a los trabajos en heces principalmente que habían sido renombrados y reclasificados respecto a las nuestras. Para la adaptación de la nomenclatura y bioquímica nos hemos ayudado también del libro The yeasts: A taxonomic study de Kurtzman y Fell (1998). Recomendamos siempre la actualización de los sistemas de lectura de los códigos del sistema API para poder llegar a una identificación correcta tanto de la especie como del género. Nuestra gran sorpresa surgió cuando en el intento de identificar distintas especies, utilizamos distintos textos de microbiología observando en ellos un gran desfase en las cuestiones anteriormente mencionadas (Jungerman y Schwartzman, 1977; Braude y cols., 1984; Lennette y cols., 1987; Diamond, 1997; García Rodríguez y Picazo., 1998).

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

En la actualidad se han observado variaciones en la asimilación de azúcares que estas referencias citan como negativas o positivas y que en la actualidad han sido referidos como variables. La última ha sido la variabilidad de *C. neoformans* en la asimilación del inositol, azúcar reconocido hasta la fecha como asimilado por todas las cepas de *C. neoformans*. Entre nuestros aislados, ha sido identificada una cepa de *C. neoformans* que no asimiló este azúcar correspondiendo al siguiente perfil (001000001). Aeharn en 1998 y Uno y cols. en el año 2001, muestran esta posible variabilidad. Este último autor describe el caso de una cepa identificada como *C. neoformans* aislada del líquido cefalorraquídeo de un paciente con SIDA que no mostró la asimilación de este azúcar.

Nos sorprende observar que dicha variabilidad se encuentra recogida en el Apilab plus versión 3.3.3. El estudio de los auxanotipos ha sido empleado por Nosanchuk y cols. en el año 2000, con el fin de buscar una posible relación entre la infección humana y la fuente de origen, ya que la cadena de infección entre las excretas aviares como reservorio de *Cryptococcus* y la existencia de enfermedades humanas causadas por *C. neoformans* no ha sido claramente demostrada, debido a la escasa caracterización de las cepas de *C neoformans* de origen humano y animal (Kielstein y cols., 2000 A).

Nosanchuk y cols. en el año 2000 sugieren que las heces de una cacatúa eran la posible fuente de la infección criptocócica contraída por su dueño, tras la realización del estudio paralelo de las tres cepas mediante técnicas moleculares y de asimilación de azúcares (API 20 C AUX), las cuales demostraron la similitud existente entre dichas cepas. Si son pocos los datos existentes que muestren que las heces de paloma son fuentes de infección para el hombre, estudios similares que hagan referencia a las heces como fuente de infección de otras especies de criptococos son aún más escasos (Kielstein y cols., 2000 A).

Dentro de esta variabilidad, en el presente estudio hemos obtenido tal como muestran nuestros resultados, una serie de perfiles según la asimilación o no de dichos azúcares. Es por esta razón por lo que

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

consideramos interesante comparar los auxanotipos obtenidos de distintas fuentes en nuestra Isla y su comparación por los obtenidos por otros autores.

Llama nuestra atención al analizar y comparar distintos perfiles que el número 8, el cual se corresponde al 001101111, es el que más se repite tanto en los aislados de origen humano como en los de paloma procedentes de palomares. Ninguna de las cepas aisladas de plazas públicas presentaron dicho perfil. Otros estudios similares a los nuestros realizados por Hermoso de Mendoza en 1987 sobre muestras de buche de palomas, han llamado nuestra atención al comprobar que el auxanotipo aislado mayoritariamente por este autor se corresponde al aislado mayoritariamente por nosotros, correspondiendo éste al perfil número 8 (001101111), teniendo ambos procedencia aviar y además tanto en nuestro estudio como en el de Hermoso de Mendoza en 1987, es el más aislado en muestras de buche de paloma. El porcentaje de aislamiento que presentó dicho auxanotipo en nuestro estudio es de un 43.4% frente a un 72% obtenido por Hermoso de Mendoza en 1987.

El perfil número 6 (001101011) de procedencia de paloma Y que ha sido aislado tanto de cepas de humana como de heces, buche y cloaca, ha sido también observado en buche por Hermoso de Mendoza (1987) suponiendo un 15.2% para nuestro estudio respecto a un 12% para el autor anteriormente citado.

El perfil número 4 (001001011) fue el segundo perfil mayoritariamente obtenido de palomas, no observándose el mismo en los *C. neoformans* de procedencia humana, aislándose de muestras de heces y buches de palomas pertenecientes a los palomares privados muestreados de nuestra isla. Llama nuestra atención que no existan aislamientos de cloacas con dicho perfil. Quizás podría tratarse de cepas con poca termotolerancia.

Los perfiles 7 y 9 obtenidos a partir de cepas de *C. neoformans* de origen humano, no se obtienen de muestras de heces, buche y cloaca recogidas en palomares ni en las muestras de heces de las plazas públicas.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Por lo tanto, podría tratarse de una infección que tuviera una procedencia distinta a la de paloma. Los perfiles 10 y 13 obtenidos de cloaca, no se ha obtenido de las muestras de heces ni de buche, si realmente el auxanotipo hace referencia a la fuente de infección, desconocemos cual ha sido dicha fuente en este caso debido a lo anteriormente expuesto. El perfil número 3, 11 y 14 fueron aislados exclusivamente de heces. Nosanchuk y cols. en el año 2000, utilizó este método entre otros para ver la posible relación existente entre un aislado de humano y las heces de una cacatúa, obteniendo el perfil correspondiente a nuestro perfil número 11 (011101011), aislando también el mismo perfil en el cuidador de dicho animal enfermo de criptococosis y llega a la conclusión de que la infección humana podría tener su fuente en las heces de la cacatúa. Dicho perfil fue también obtenido por Hermoso de Mendoza en 1987 en muestras de buche en 4% de sus aislados frente a un 2% obtenido por nosotros.

Pensamos que no es fruto de la casualidad que de las 9 cepas de *C. neoformans* var. *neoformans* de origen humano analizadas, 6 presentasen el perfil más frecuentemente obtenido de aislados de paloma (001101111) correspondiendo con el auxanotipo anteriormente mencionado obtenido más frecuentemente por Hermoso de Mendoza (1987) en aislados de buche y que a la par correspondía con el mayormente aislado en esta misma localización por nosotros.

Creemos también que existe una fuente distinta a las heces de paloma que actúan como responsable de la criptococosis humana y que las palomas localizadas en las plazas públicas suponen un riesgo nulo o ínfimo en la salud pública en caso de la criptococosis debida a *C. neoformans*, si bien según datos cedidos por el Hospital Dr. Negrín, no se han observado casos de criptococosis humana por especies de criptococos distintos al mismo. Desconocemos si estos 6 enfermos de criptococosis pudieran vivir en zonas cercanas a palomares, y que en su condición de inmunodeprimidos hayan adquirido dicha enfermedad.

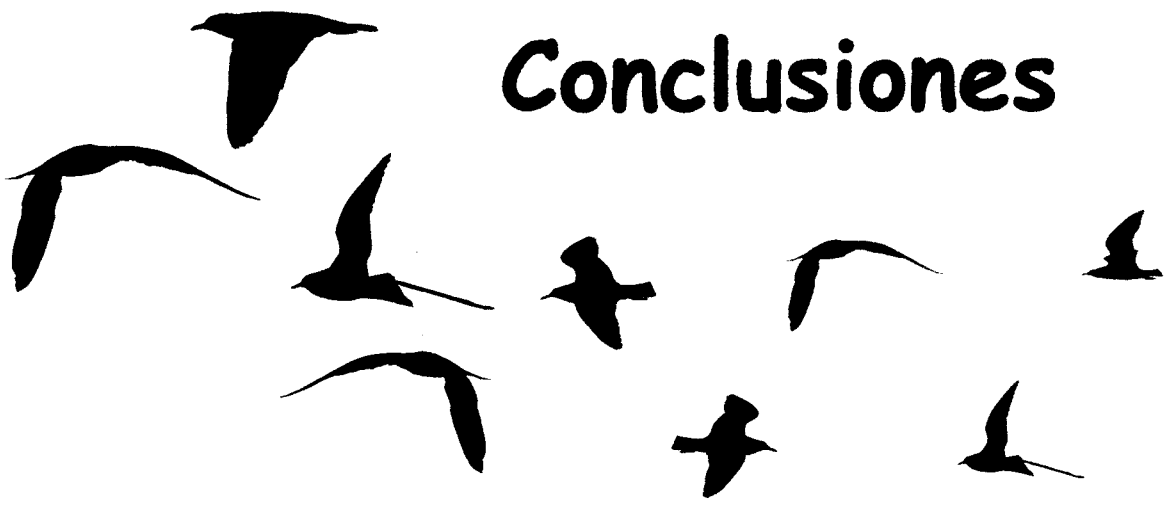
© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Debido al gran número de palomares existentes en el municipio de Las Palmas de Gran Canaria y conociendo la diversidad de microclimas existentes en nuestra isla y en dicho municipio al abarcar tanto zonas costeras como de montaña, hemos querido estudiar si el aislamiento de las distintas especies de criptococos se haya influenciado por este factor. Alguien escribió sobre el clima de Gran Canaria: *En una sola jornada, con suaves temperaturas los doce meses del año, es posible pasar de la costa cálida a zonas templadas de medianías, atravesar valles y bosques subtropicales o alcanzar las cumbres donde, en ocasiones, cae la nieve sin merma del sol costero.*

Además como ya hemos dicho en repetidas ocasiones, la acción o no de factores como la temperatura, humedad y luz pueden condicionar la presencia o ausencia de *Cryptococcus* spp. Estos factores anteriormente citados no parecen influir en la distribución de las distintas especies de criptococos aislados de nuestra capital, al haber obtenido que estas especies se presentan en proporción similar en las distintas zonas climáticas.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Bibliotecas Universitaria, 2006

Conclusiones



© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

6.- CONCLUSIONES

PRIMERA.- *Cryptococcus neoformans* se encuentra presente en la población colombófila en cautividad de la isla de Gran Canaria con una prevalencia en los palomares de un 56.97%, por lo que opinamos que realmente la cría en cautividad de estas aves, si no se extreman las condiciones higiénicas, suponen un riesgo real para el colombicultor y habitantes colindantes.

SEGUNDA.- La prevalencia de *Cryptococcus neoformans* en las plazas públicas de la zona centro norte de Gran Canaria es baja, no representando dicha levadura un gran riesgo para la salud de los cuidadanos que se recrean en ellas. El peligro de estas áreas podría estar representado por otras especies de criptococos menos patógenos para los que se ha obtenido una mayor prevalencia, considerando que los individuos inmunodeprimidos y niños estarían más predispuestos a contraer una infección por estas levaduras.

TERCERA.- Las infecciones humanas o animales producidas por el auxanotipo 0011001111, podrían tener su origen en las heces de palomas, *no obstante esta hipótesis necesita su confirmación mediante la utilización* de técnicas genéticas.

CUARTA.- La presencia en muestras humanas de auxanotipos que no se obtienen de aislados de heces de palomas nos induce a suponer que la fuente de infección se deba a las excretas de otras aves.

QUINTA.- No sólo *C. neoformans* sino también *C. albidus*, *C. uniguttulatus* y *C. laurentii* son capaces de sobrevivir al tránsito gastrointestinal, apareciendo en cloaca y heces frescas.

SEXTA.- La paloma porta en cloaca a distintas especies de criptococos pudiendo diseminar estas levaduras hacia zonas anteriormente libres de estos microorganismos.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

SÉPTIMA.- El test exacto de Fisher no resulta apto cuando existen factores que determinan el valor de la variable dicotómica en estudio.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Resumen

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

7.- RESUMEN

El papel que desempeñan las palomas como portadoras de hongos levaduriformes en la isla de Gran Canaria, ha sido la incógnita que ha movido el desarrollo del presente trabajo, máxime si tenemos en cuenta que Canarias es una de las Comunidades Autónomas con mayor número de palomas mensajeras de España.

Para la realización del presente trabajo nos hemos planteado estudiar el papel que juega la paloma como portadora de levaduras con impacto en la Salud Pública: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Cryptococcus humicolus*, *Cryptococcus curvatus* y *Candida albicans*. Para ello, hemos trabajado con palomas en libertad y en cautiverio recolectando muestras de excrementos localizados en plazas públicas y muestras de excretas, buche y cloaca de palomas localizadas en palomares privados.

Hemos constatado que el clima de Gran Canaria es excelente para el desarrollo de distintas especies de criptococos y otras levaduras patógenas para el hombre y los animales. Hemos obtenido que tanto en plazas públicas como en palomares privados se encuentran presentes *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus* y *Candida albicans*, no aislándose *Cryptococcus humicolus* ni *Cryptococcus curvatus* en ninguno de los casos.

A modo general, el porcentaje de aislamiento de cada especie, a partir del número total de palomares muestreados ha sido, en orden decreciente, de un 56.97% en el caso de *Cryptococcus neoformans*, de un 32.55% (*Cryptococcus uniguttulatus*), de un 25.58% (*Cryptococcus albidus*), de un 23.25% (*Candida albicans*), y finalmente de un 11.62% en el caso de *Cryptococcus laurentii*, la especie aislada con menor frecuencia.

Refiriendo los resultados solamente a las muestras de excretas analizadas recogidas en dichos palomares, los porcentajes obtenidos para

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

cada especie han sido: 33.9% para *Cryptococcus neoformans*, 7.47% para *Candida albicans*, 5.17% para *Cryptococcus uniguttulatus*, 4.59% para *Cryptococcus laurentii*, y 3.44% para *Cryptococcus albidus*.

Los valores de prevalencia de la infección en buche han sido de un 9.66% para *Cryptococcus neoformans*, 7.25% en el caso de *Cryptococcus laurentii*, 6.94% para *Cryptococcus albidus*, 3.92% para *Candida albicans* y por último, tan sólo de un 0.60% en el caso de *Cryptococcus uniguttulatus*.

Finalmente y respecto a la prevalencia de la infección en cloaca, hemos obtenido los siguientes porcentajes: *Cryptococcus neoformans* (1.81%), *Cryptococcus uniguttulatus* (3.32%), *Cryptococcus laurentii* (2.11%), *Cryptococcus albidus* (0.90%) y finalmente *Candida albicans*, también con un 0.90%.

De las muestras de excretas analizadas en las 17 plazas públicas muestreadas, hemos observado que el criptococo aislado con mayor frecuencia ha sido *Cryptococcus laurentii* (23.52%) y el de menor frecuencia ha sido *C. uniguttulatus*. Sin embargo, *Candida albicans* ha sido la especie presente en un mayor número de plazas, un total de 5 (29%).

El auxanotipo de *C. neoformans* aislado más frecuentemente a partir de todas las muestras aviares estudiadas en nuestro trabajo ha sido el 001101111, correspondiéndose al que con mayor frecuencia se obtuvo también del análisis de las cepas de origen humano de dicha especie cedidas por el Hospital Dr. Negrín de Las Palmas de Gran Canaria.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Summary

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

8.- SUMMARY

The role that pigeons carry out as yeast form fungus carriers on the Island of Gran Canaria has been the unknown fact that moved us to carry out this work, especially if we keep in mind that the Canaries is one of the Spanish Autonomic Communities with a greater number of carrier pigeons.

For the development of this work we have planned to study the role the pigeon plays as a carrier of yeasts having any impact on public health: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Cryptococcus humicolus*, *Cryptococcus curvatus* and *Candida albicans*. To do so, we have worked with free pigeons and captive ones, collecting excrement samples located in public squares, and excreta, crop and cloaca samples from pigeons housed in private pigeon lofts.

We have confirmed that the Gran Canaria climate is excellent for the development of different species of cryptococcus and other yeasts that are pathogenic for human beings and animals. Our findings have been that *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus* and *Candida albicans are* present in public squares, as well as in private pigeon lofts, while neither *Cryptococcus humicolus* nor *Cryptococcus curvatus* has been isolated in any case.

Generally, each specie's isolation percentage, starting from the total number of sampled lofts, has been, in a decreasing order: 56.97% in the case of *Cryptococcus neoformans*, 32.55% for *Cryptococcus uniguttulatus*, 25.58% for *Cryptococcus albidus,* 23.25% for *Candida albicans* and finally 11.62% in the case of *Cryptococcus laurentii*, the least frequently isolated species.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

With the results only being based on analyzed excreta samples collected in the previously mentioned pigeons lofts, the percentages obtained for each species were: 33.9% for *Cryptococcus neoformans*, 7.47% for *Candida albicans*, 5.17% for *Cryptococcus uniguttulatus*, 4.59% for *Cryptococcus laurentii* and 3.44% for *Cryptococcus albidus*.

Prevalence values of infection in crop have been 9.66% for *Cryptococcus neoformans*, 7.25% in the case of *Cryptococcus laurentii*, 6.94% for *Cryptococcus albidus*, 3.92% for *Candida albicans* and finally, only 0.60% in the case of *Cryptococcus uniguttulatus*.

Lastly, regarding prevalence of infection in cloaca, we have obtained the following percentages: *Cryptococcus neoformans* (1.81%), *Cryptococcus uniguttulatus* (3.32%), *Cryptococcus laurentii* (2.11%), *Cryptococcus albidus* (0.90%) and finally *Candida albicans*, also with 0.90%.

From the analyzed excreta samples collected in 17 public squares, we have observed that the most frequently isolated cryptococcus has been *Cryptococcus laurentii* (23.52%), and the least frequently isolated one has been *C. uniguttulatus*. However, *Candida albicans* has been the species found in a greater number of public squares, in a total of 5 (29%).

The auxanotype *C. neoformans* most frequently isolated in all the avian samples studied in our work has been 001101111, corresponding to the one also obtained with greater frequency from the analysis of human origin strains provided by Dr Negrin Hospital in Las Palmas de Gran Canaria.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Bibliografía

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

9.- BIBLIOGRAFÍA

Abadi JS, Nachman AB, Kressel AB, Pirofski L. 1999. Cryptococcosis in children with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 28:309-313.

Abou-Gabal M, Atia M. 1978. Study of the role of pigeons in the dissemination of *Cryptococcus neoformans* in nature. *Sabouraudia.* 16(1):63-8.

Abraham M, Mathews V, Ganesh A, John TJ, Mathews MS. 1997. Infection caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B in an AIDS patient in India. *J. Med. Vet. Mycol.* 35(4):283-4.

Ackerman L. 1988. Feline Cryptococcosis. *Compendium Small Animal.* 10(9): 1049-1055.

Acosta B, Alvarez P, Déniz S, Rodríguez JL, Real F, Rosario I. 1999. Linfadenitis canina por *Cryptococcus neoformans. Rev. Iberoam. Micol.* 16:155-157.

Aeharn DG. Yeasts pathogenic for humans. En: Kurtzman CP y Fell JW, eds. The Yeasts, a Taxonomy Study, 4ª ed. Amsterdam: Elsevier; 1998:9-12.

Alexopoulos CJ, Mims CW. Introducción a la Micología, 1ª ed. Barcelona: Ediciones Omega; 1985:508-543.

Aller B, Santiago E, Escudero A, Rey M. 1971. Criptococosis pulmonar en cabras. *Rvta. Patrón. Biol. Anim.* XV(4): 387-397.

Argüero LB, Garza GD, Flores UV, Cervantes Olivares RA. 1999. Aislamiento y caracterización de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a partir de muestras de *Eucalyptus camaldulensis* en la ciudad de México. *Rev. Iberoam. Micol.* 16:40-42.

Argüero LB, Garza GD, Torres ZM. 1996. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* var *gattii* de *Eucalyptus tereticornis. Rev. Iberoam. Micol.* 13:27-28.

Atkinson AJ, Bennett JE. 1968. Experience with a new skin test antigen prepared from *Cryptococcus neoformans. Am. Rev. Respir. Dis.* 97:637-43.

Baes H, Van Cutsem J. 1985. Primary cutaneous cryptococcosis. *Dermatologica.* 171(5):357-61.

Banerjee U, Gupta K, Venugopal P. 1997. A case of prosthetic valve endocarditis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans. J. Med. Vet. Mycol.* 35(2):139-41.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Baró T, Morera Y, Torres Rodríguez JM, Alía C, Lázera M. 1998 (B). Estudio de muestras de polvo doméstico para el aislamiento ambiental de *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Iberoam. Micol.* 15:309.

Baró T, Torres Rodríguez JM, Hermoso de Mendoza M, Morena Y, Alía C. 1998 (A). First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 36:458-463.

Baró T, Torres-Rodríguez JM, Morera Y, Alía C, López O, Méndez R. 1999. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 37:1170-1172.

Barron CN. 1955. Cryptococcosis in Animals. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 127:125-132.

Bartralot-Soler R, García Patos Briones V, Castells-Rodellas A. 1995. Criptococcosis cutánea. *Piel.* 10:303-307.

Bava AJ, Negroni R, Bianchi M. 1993. Cryptococcosis produced by a urease negative strain of *Cryptococcus neoformans*. *J. Med. Vet. Mycol.* 31(1):87-9.

Behrman RE, Masci JR, Nicholas P. 1990. Cryptococcal skeletal infections: case report and review. *Rev. Infect. Dis.* 12:181-190.

Benham RW. 1935. Cryptococci: Ther Identification by Morphology and by Serology. *J. Infect. Dis.* 57:255-274.

Bennet M, Smith NR. 1992. Feline Immnodeficiency Virus: A brief review. *British. Veterin. Journal.* 148:399-412.

Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Howard D. 1984. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* 105:582-586.

Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Theodore TS. 1978. Biochemical differences between serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia.* 16(3):167-74.

Berenguer J. 1996. Diagnóstico de laboratorio de la criptococosis. *Rev. Iberoam. Micol.* 13(S82-S83).

Blackstock R, Hall NK. 1982. Immunosuppression by avirulent, pseudohyphal forms of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 80(2):95-9.

Blanchard PC, Filkins M. 1992. Cryptococcal pneumonia and abortion in an equine fetus. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 201:1591-1592.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Blaschke-Hellmessen R. 2000. *Cryptococcus* species-etiological agents of zoonoses or sapronosis? *Mycoses.* 43(1):48-60.

Blauvelt A, Kerdel FA. 1992. Cutaneous cryptococcosis mimicking Kaposi's sarcoma as the initial manifestation of disseminated disease. *Int. J. Dermatol.* 31:279-280.

Boekhout T, Bandoni RJ, Fell JW and Kwon-Chung KJ. Discussion of telemorphic and anamorphic genera of heterobasidiomycetous yeasts. En: Kurtzman CP and Fell JW, eds. The Yeasts, a Taxonomy Study, 4ª ed. Amsterdam: Elsevier; 1998:609-626.

Bohm KH. 1980. Untersuchungen zur temperaturresistenz von *Cryptococcus neoformans. Ein. Beitrag. Zur. Epidemiol. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 93:358-360.

Borton LK, Wintroub BU. 1984. Disseminated cryptococcosis presenting as herpetiformn lesions in a homosexual man with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Am. Acad. Dermatol.* 10:387-390.

Bozzette SA, Larsen RA, Chiu J, Leal MAE, Tilles JG, Richman DD, Leedom JM, McCutchan JA. 1991. Fluconazole treatment of persistent *Cryptococcus neoformans* prostatic infection in AIDS. *Ann. Intern. Med.* 115:285-286.

Braude AI, Davis CE, Fierer J. Microbiología Clínica, 1ª ed. Junín-Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1984:722-732.

Breen JF, Lee IC, Vogel FR, Friedman H. 1982. Cryptococcal capsular polyssaccharide induced modulation of murine immune responses. *Infect. Immun.* 36:47-51.

Brown WC, Bissey L, Logan KS, Pedersen NC, Elder JH, Collisson EW. 1991. Feline immunodeficiency virus infects both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J. Virol.* 65(6):3359-64.

Brueske CH. 1986. Proteolytic activity of a clinical isolate of *Cryptococcus neoformans. J. Clin. Microbiol.* 23:631-633.

Buchanan KL, Murphy JW. 1998. What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen? *Emerg. Infect. Dis.* 4(1):71-83.

Bunting LA, Neilson JB, Bulmer GS. 1979. *Cryptococcus neoformans*: Gastronomic delight of a soil amoeba. *Sabouraudia.* 17:255.

Busse O. 1894. Über parasitare Zelleinschlusse und ihre Zuchtung. *Zentralbl. Bakteriol.* 16:175-180.

Busse O. 1895. Ueber saccharomycosis hominis. *Virchow. Arch. Path. Anat*; 140:23-46.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Bustamante Rufino B, Swinne D. 1998. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii* en dos pacientes peruanos. *Rev. Iberoam. Micol.* 15:22-24.

Cabral Passoni LF. 1999. Wood, animals and human *Cryptococcus neoformans* infection. *Rev. Iberoam. Micol.* 16:77-81.

Caicedo LD, Álvarez MI, Llanos CE, Molina D. 1996. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas del perímetro urbano de Cali. *Colombia. Med.* 27(3-4):106-109.

Callejas A, Ordóñez N, Rodríguez MC, Castañeda E. 1998. First isolation of *C. neoformans* var. *gattii* serotype C, from the environment in Colombia. *Med. Mycol.* 36:341-344.

Canelo C, Casquero CJ. 2000. Fenoloxidasa modificada: clave para identificar cepas de *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Med. Exp.* 17 (1-4):5-8.

Canelo C, Navarro A, Guevara M, Urcia F, Zurita S, Casquero J. 1999. Determinación de la variedad de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de pacientes con SIDA. *Rev. Med. Exp.* (1-2):44-47.

Cano Rangel MA, Gómez Rivera N, Sotelo Cruz N, Durazo Arvizu MA. 2002. Meningitis por *Cryptococcus*. Reporte de un caso. *Rev. Mex. Pediatr.* 69(1):25-28.

Canteros CE, Rodero L, Rivas MC, Davel G. 1996. A rapid urease test for presumptive identification of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia.* 136(1):21-3.

Carlson MA, Condon RE. 1994. Nephrotoxity of amphotericin B. *J. Am. College. Surg.* 179:361-81.

Carrada Bravo T. 2003. Criptococosis en la era del SIDA. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 50(1):33-40.

Carter GR. Procedimientos de diagnóstico en Bacteriología y Micología Veterinarias, 1ª ed. Madrid: Editorial Acribia; 1969:251-253.

Casadevall A, Perfect JR. 1998. *Cryptococcus neoformans.* Washington: *ASM Press*; Washington DC.

Casadevall A, Rosas AL, Nosanchuk JD. 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3(4):354-8.

Castañón Olivares LR, Arreguín Espinosa R, Ruiz Palacios y Santos G, López Martínez R. 2000. Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their comparison with some Latin American Countries. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 42:35-40.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Castañón Olivares LR, López Martinez R. 1994. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columba livia*) droppings in Mexico city. *Mycoses.* 37(9-10):325-7.

Chandna VK, Morris E, Gliatto JM, Paradis MR. 1992. Localised subcutaneous cryptococcal granuloma in a horse. *Equin. Vet J.* 25(2):66-8.

Chapman HM, Robinson WF, Bolton JR, Robertson JP. 1990. *Cryptococcus neoformans* infection in goats. *Aust. Vet. J.* 67(7):263-5.

Chaskes SR, Tyndall L. 1978. Pigment production by *Cryptococcus neoformans* and other *Cryptococcus* species from aminophenols and diaminobenzenes. *J. Clin. Microbiol.* 7:146-52.

Chen CK, Chang DY, Chang SC, Lee EF, Huang SC, Chow SN. 1993. Cryptococcal infection of the vagina. *Obstet. Gynecol.* 81(5):867-9.

Chen LC, Blank ES, Casadevall A. 1996. Extracellular proteinase activity of *Cryptococcus neoformans. Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3:570-574.

Cheng MF, Chiou CC, Liu YC, Wang HZ, Hsieh KS. 2001. *Cryptococcus laurentii* fungemia in a premature neonate. *J. Clin. Microbiol.* 39:1608-1611.

Chuck SL, Sande MA. 1989. Infections with *Cryptococcus neoformans* in the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 321:794-799.

Clancy MN, Fleishmann J, Howard DH, Kwon-Chung KJ, Shimiku RY. 1990. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a patient with AIDS in southern California. *J. Infect. Dis.* 161:809.

Clark DS, Wallace RH, David JJ. 1954. Yeasts occurring on apples and in apple cider. *Can. J. Microbiol.* 1:145-49.

Colom MF, Alberdi M, Meseguer I, Torres-Rodriguez JM. 1997. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras de medio ambiente de Alicante. *Rev. Iberoam. Micol.* 14:63-64.

Colom MF, Frasés S, Ferrer C, Martín Mazuelos E, Hermoso De Mendoza M, Torres Rodríguez JM, Quindós G. y los colaboradores desde las instituciones hospitalarias. 2001. Estudio epidemiológico de la criptococosis en España: primeros resultados. *Rev. Iberoam. Micol.* 18:99-104.

Concus AP, Helfand RE, Imber MJ, Lenner EA, Sharpe RJ. 1988. Cutaneous cryptococcosis mimicking molluscum contagiosum in a patient with AIDS. *J. Infect. Dis.* 158:897-898.

Corazza M, Mancianti F, Bizzeti M, Buonaccorsi A. 1991. Canine cryptococcosis: descrizione di un caso. *Obiettivi e Documenti Veterinari.* 2:45-47.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Cordero E, Lara C, Canas E, Romero J, Trujillo F, Chinchon I, Pachon J. 1996. Usefulness of cerebral biopsy in focal cerebral lesions in patients with human immunodeficiency virus infection. *J. Med. Clin.* 107(19): 738-41.

Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect JR. 2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect. Immun.* 68(2):443-8.

Criseo G, Bolignano MS, De Leo F, Staib F. 1995. Evidence of canary droppings as an important reservoir of *Cryptococcus neoformans. Zentralbl. Bakteriol.* 282(3):244-54.

Cullén y Verdugo S. Nociones de Colombofilia y estudio de Telegrafía Alada aplicada a las Islas Canarias, 2ª ed. Las Palmas: Ediciones del Cabildo Insular de Gran Canaria; 1992.

Custis PH, Haller JA, De Juan E. 1995. An unusual case of cryptococcal endophthalmitis. *Retina.* 15:300-304.

Da Cunha T, Lusins J. 1973. *Cryptococcus albidus* meningitis. *South. Med. J.* 66:1230-1243.

Davies C, Troy GC. 1996. Deep mycotic infections in cats. *J. Am. Anim. Hosp. Ass.* 32(5):380-91.

Davis CE. Criptococos. En: Braude AI, Davis CE y Fierer J, eds. Microbiología Clínica, 1ª ed. Junín-Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1984:722-732.

De Gracia Mira A. 1959. Identificación en España de un tipo de mamitis bovina de etiología levaduriforme. *Supl. Cient. Bol. Inf. Cons. Gen. Col. Vet. Esp.* VI:5-24.

De Melo NT, Lacaz S, Charbel CE, Pereira AD, Heins-Vaccari EM, Franca-Netto AS, Machado R, Livramento JA. 1993. *Cryptococcus neoformans* chemotyping. Review of the literature. New epidemiologic data on cryptococcosis. Our experience with the use of C.G.B. media in the study of this yeast. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo.* 35(5):469-78.

Decostere A, Hermans K, De Baere T, Pasmans F, Haesebrouck F. 2003. First report on *Cryptococcus laurentii* associated with feather loss in a glossy starling (*Lamprotornis chalybaeus*). *Avian. Pathol.* 32(3):309-11.

Diamond RD. *Cryptococcus neoformans.* En: Mandell GL, Bennet BE, Dollin R, eds. Enfermedades infecciosas, principios y práctica, 4ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1997:2617-2627.

Diamond RD. *Crytcococcus neoformans.* En: Mandell GL, Douglas JE, Dolin R eds. Principles and practice of infectious diseases, xª ed. New York: Churchill Livingstone; 1995:2331-2340.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Dismukes WE. 1993. Management of cryptococcosis. *Clin. Infect. Dis.* 17:507-12.

Doering TL, Nosanchuk JD, Roberts WK, Casadevall A. 1999. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. *Med. Mycol.* 37(3):175-81.

Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Laporte A, and the French Cryptococcosis Study Group. 1996 (B). Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). *Clin. Infect. Dis.* 23:82-90.

Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Letenneur L, Ronin O, and the French Cryptococcosis Study Group. 1996 (A). Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. *Clin. Infect. Dis.* 23:91-96.

Dromer F, Moulignier A, Dupont B, Gueho E, Baudrimont M, Improvisi L, Provost F, Gonzalez-Canali G. 1995. Myeloradiculitis due to *Cryptococcus curvatus* in AIDS. *AIDS.* 9(4):395-6.

Duperval R, Hermans PE, Brewer NS, Roberts GD. 1977. Cryptococcosis with emphasis on the significance of isolation of *Cryptococcus neoformans* from the respiratory tract. *Chest.* 72:13-19.

Durden FM, Elewski B. 1994. Cutaneous involvement with *Cryptococcus neoformans* in AIDS. *J. Am. Acad. Dermatol.* 30:844-848.

Ellis DH, Pfeifer TJ. 1990 (A). Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii. J. Clin. Microbiol.* 28:1642-1644.

Ellis DH, Pfeifer TJ. 1990 (B). Ecology, life cycle and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans. Lancet.* 336:923-925.

Ellis DH, Pfeiffer TJ. 1994. Additional *eucalyptus* hosts for *Cryptococcus neoformans* var. *gattii.* Abstract FIII, p. 106. In: Abstracts of the 13th Congress of the International Society for Human and Animal (ISHAM), North Adelaide, Australia.

Ellis D, Pfeiffer T, Ruma P, Brownlee A, Chen S, Sorrell T. 1996. Distribution and frequency of *C. neoformans* var. *gattii* among the species of *Eucalyptus.* En: Program and Abstracts of 3rd. International Conference on *Cryptococcus* and Cryptococcosis 22-26:47-8 Institut Pasteur, Paris.

Emmons CW. 1951. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J. Bacteriol.* 62 :685-90.

Emmons CW. 1955. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am. J. Hyg.* 62 :227-232.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Emmons CW. 1960. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. *Publ. Health. Rep.* 75:362-364.

Erke KH, Schneidau JD. 1973. Relationship of some *Cryptococcus neoformans* hypha-forming strains to standard strains and to other species of yeasts as determined by deoxyribonucleic acid base ratios and homologies. *Infect. Immun.* 7(6):941-8.

Euzeby J. *Cryptococcus* et cryptococcose. Cours de Mycologie Medicale Comparée. 1ª ed. Ed. Vigot Fréres París. 1969:239-248.

Faggi E, Gargani G, Pizzirani C, Pizzirani S, Saponetto N. 1993. Cryptococcosis in domestic mammals. *Mycoses.* 36(5-6):165-70.

Fell JW, Statzell-Tallman A. *Cryptococcus* Vuillemin. En: Kurtzman CP y Fell JW, eds. The Yeasts, a Taxonomy Study, 4ª ed. Amsterdam: Elsevier; 1998:742-767.

Fernández Andreu CM, Martínez Machín G, Illnait Zaragozí MT, Perurena Lancha M, González Miranda M. 1998. Identificación de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* en aislamientos clínicos cubanos. *Rev. Cub. Med. Trop.* 50(2):167-9.

Ferrán Andreu JM. Las palomas mensajeras. Cómo se crían. Cómo se adiestran, 1ª ed. Barcelona: Editorial De Vecchi; 1973:37.

Figueroa DR. 1999. Criptococosis meníngea no asociada con VIH. *Rev. Med. IMSS.*37(4):310-8.

Fleming WH, Hopkins JM, Land GA. 1977. New culture medium for the presumptive identification of *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans. J. Clin. Microbiol.* 5(2):236-43.

Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Diagnostic Microbiology, 10ª ed. Houston-Texas: Mosby; 1998:942-946.

Fortún Abete J. 1995. Diagnóstico, tratamiento y prevención de las infecciones causadas por hongos en el paciente VIH positivo. *Rev. Clin. Esp.* 195(3):4-14.

Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37:838-40.

Frisvald JC, Samson RA. Filamentous fungi in foods and feeds: Ecology, Spoilage and Mycotoxins productions. En: Hadbook of applied Mycology. Vol. 3 Ed: Food and feeds 1991:31-68.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Gallo MG, Cabeli P, Vidotto V. 1989. Presence of pathogenic yeasts in the feces of the semi-domesticated pigeon (*Columba livia*, Gmelin 1789, urban type) from the city of Turin. *Parassitologia.* 31(2-3):207-12.

Garau M, Palacio A. 2002. Artritis por *Cryptococcus neoformans* en receptor de trasplante renal. *Rev. Iberoam. Micol.* 19:186-189.

García Rodríguez JA, Picazo JJ. Microbiología Médica. 1. Microbiología Médica General, 1ª ed. Madrid: Harcourt Brace; 1998: 663-667.

García Salas JA, Contreras Balderas AJ, Adame Rodríguez JM, Galán Wong LJ. 2003. Revisión de zoonosis ornitológicas. *Ciencia UANL.* VI(1):23-27.

Gatenby PA. 1989. Reduce $CD4^+$ T cells and candidiasis in absence of HIV infection. *Lancet.* 1:1027-8.

Gauder JR. 1987. Cryptococcal cellulitis. *JAMA.* 237: 672-673.

Gerds-Grogan S, Dayrell-Hart B. 1997. Feline cryptococcosis: a retrospective evaluation. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 33(2):118-22.

Germain G, Noel G, Kwon–Chung KJ. 1988. Disseminated Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a Canadian patient with AIDS. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7:587-8.

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

Ghannoum MA. 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 13:122-143.

Glunder G. 1989. Infections of pigeons as a risk to the health of humans and animals. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 96(3):112-116.

Goonetilleke AK, Krause K, Slater DN, Dev D, Wood ML, Basran GS. 1995. Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompromized pigeon keeper. *Br. J. Dermatol.* 133(4):650-2.

Gottesdiener KM. 1989. Transplanted infections: Donor to host transmisión with the allograft. *Ann. Intern. Med.* 110:1001-16.

Granier F, Kanitakis J, Hermier C, Zhu Y, Thivolet J. 1987. Localized cutaneous cryptococcosis successfully treated with ketoconazole. *J. Am. Acad. Dermatol.* 16:243-9.

Green JR, Bulmer GS. 1979. Gastrointestinal inoculation of *Cryptococcus neoformans* in mice. *Sabouraudia.* 17:233-40.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Greene MH, Macher AM, Henández AD, Tomecki KJ, Chabner B. 1978. Disseminated cryptococcosis presenting as palpable purpura. *Arch. Intern. Med.* 138:1412-1413.

Gugnani HC, Sandhu RS, Shome SK. 1976. Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in avian excreta in India. *Mykosen.* 19(6):183-7.

Gugnani HC, Nzelibe FK, Gini PC, Chukudebelu WO, Njokuobi AN. 1989. Incidence of yeasts in pregnant and non-pregnant women in Nigeria. *Mycoses.* 32(3):131-135.

Hajjeh RA, Conn LA, Stephens DS, Baughman W, Hamill R, Graviss E, Pappas PG, Thomas C, Reingold A, Rothrock G, Hutwagner LC, Schuchat A, Brandt ME, Pinner RW. 1999. Cryptococcosis: Population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected persons. Cryptococcal Active Surveillance Group. *J. Infec. Dis.* 179:449-454.

Hamilton AJ, Gomez BL. 2002. Melanins in fungal pathogens. *J. Med. Microbiol.* 51(3):189-91.

Hermoso de Mendoza M. 1984 (A). Criptococosis en paloma (*Columba livia*). Estudio epizootiológico y micológico en el área urbana de Córdoba. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura. Cáceres.

Hermoso de Mendoza M, Alonso JM, Rey J, Antón J, Cardenal A, Gil MC, Naranjo G, Hermoso de Mendoza J. 1991. Dos brotes de criptococosis en cabras en la provincia de Cáceres. Res. PJ58, XIII Congreso Nacional de Microbiología, Salamanca, Spain. p. 244.

Hermoso de Mendoza M, Miranda García A, Leon Vizcaíno L, Perea JA, Carranza J, Gazquez A, Del Pino J. 1984 (B). Criptococosis espontánea en palomo. *Arch. Zootec.* 33(125):27-41.

Hermoso de Mendoza M, Miranda A, Perea AJ, Arenas A, Poveda JB, Carranza J, Leon L. 1987. Criptococosis en paloma I. Frecuencia de portadores en buche en el área urbana de Córdoba. *Rev. Iberoam. Micol.* 4:121-127.

Hermoso de Mendoza Salcedo, M. 1994. Micosis de relevancia actual en animales de renta, deporte y compañía en Extremadura. Res. PO16, II Congreso Nacional de Micología, Santiago de Compostela, Spain. *Rev. Iberoam. Micol.* 11: s12.

Hilbert BJ, Huxtable CR, Pawley SE. 1980. Cryptococcal pneumonia in a horse. *Austral. Veter. J.* 56:391-392.

Hirch TB, Hanning K, Yañes PL. 2001. Meningoencefalitis por *Cryptococcus*. Reporte de un caso clínico y revisión de la literatura. *Rev. Chil. Pediatría.* 71:335-39.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Holzworth J. 1952. Cryptococcosis in a Cat. *Cornell Vet.* 42:12-15.

Holzworth J, Coffin DL. 1953. Cryptococcosis in a Cat. A Second case. *Cornell Vet.* 43:546-550.

Hoog GS, Guarro J. Atlas of clinical fungi, 2ª ed. Reus-España: Centraalbureau voor schimmelcultures; 1995:208-238.

Horowitz ID, Blumberg EA, Krevolin L. 1993. *Cryptococcus albidus* and mucormycosis empyema in a patient receiving hemodialysis. *Southern. Med. J.* 86:1070-1072.

Howard DH. 1973. The commensalism of *Cryptococcus neoformans*. *Sabouraudia.* 11(2):171-4.

Hoy JF, Murphy JW, Miller GG. 1989. T cell response to soluble Cryptococcal antigens after recovery from cryptococcal infection. *J. Infect. Dis.* 159:116-119.

Huérfano S, Castañeda A, Castañeda E. 2001. Infección experimental de plántulas de almendro (*Terminalia catappa*) con un aislamiento ambiental de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotipo C. *Rev. Iberoam. Micol.* 18:131-132.

Hungerford LL, Campbell CL, Smith AR. Veterinary Mycology Laboratory Manual, 1ª ed. USA: Iowa State University Press; 1998:40-43.

Husain S, Wagener MM, Singh N. 2001. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcomes. *Emerg. Infect. Dis.* 7:375-380.

Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, Kaufman L. 1982. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 16:22-29.

Ikeda R, Sugita T, Jacobson ES, Shinoda T. 2002. Laccase and melanization in clinically important *Cryptococcus* species other than *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 40(4):1214-8.

Ikeda R, Sugita T, Shinoda T. 2000. Serological relationships of *Cryptococcus* spp.: Distribution of antigenic factors in *Cryptococcus* and intraspecies diversity. *J. Clin. Microbiol.* 38:4021-4025.

Ikeda R, Shinoda T. 2000. Mycological and serological diagnosis of cryptococcosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 41(4):241-4.

Innes JRM, Seibold HR, Arentzen WP. 1952. The pathology of bovine mastitis caused by *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Vet. Res.* 13:469-475.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Inui N, Chida K, Suda T, Toyoshima M, Todate A, Ide K, Tsukamoto K, Sato J, Tsuchiya T, Nakamura H. 1998. Pulmonary cryptococcosis exhibiting diffuse multiple nodular shadows. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi.* 36(12):1038-42.

Iñigo García MA, Sánchez Porto A, González Serrano M. 1996. Profilaxis de las infecciones oportunistas asociadas al SIDA. *Farm. Hosp.* 20(6):337-342.

Irokanulo EAO, Akueshi CO, Makinde AA. 1994. Differentiation of *Cryptococcus neoformans* serotypes A and D using creatinine dextrose bromothymol blue thymine medium. *Br. J. Biomed. Sci.* 51:100-103.

Ishaq CM, Bulmer GS, Felton FG. 1968. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 35:81-90.

Italiano A, Yen BC, Rosenthal SA, Rafii M. 2001. Cryptococcal osteomyelitis with septic arthritis. *Orthopedics.* 24:59-61.

Jacobson ES, Jenkins ND, Todd JM. 1994. Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. *Infect. Immun.* 62:4085-4086.

Jean SS, Fang CT, Shau WY, Chen YC, Chang SC, Hsueh PR, Hung CC, Luh KT. 2002. Cryptococcaemia: clinical features and prognostic factors. QJM 95(8): 511-18.

Jen TM. 1992. *Cryptococcus albidus* isolated from pigeon excreta in Taiwan. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi.* 25(4):270-5.

Jennings A, Bennett JE, Young V. 1968. Identification of *Cryptococcus neoformans* in a routine clinical laboratory. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 35:256-64.

Jergens AE, Wheeler CA, Collier LL. 1986. Cryptococcosis involving the eye and nervous system of a dog. *J. Am. Veter. Med. Ass.* 189:302-304.

Johnson LB, Bradley SF, Kauffman CA. 1998. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-neoformans cryptococcaemia. *Mycoses.* 41:277-280.

Jungerman PF, Schwartzman RM. Cryptococcosis. Micología Médica Veterinaria. 1ª ed. Philadelphia: Compañía Editorial Continental. 1977. 169-188.

Kakeya H, Abe K, Yoshinaga M, Ishii H, Tomiyama Y, Maesaki S, Kadota J, Tomono K, Tashiro T, Kohno S. 1998. Spontaneous resolution of pulmonary cryptococcosis report of 2 cases. *Nihon. Kokyuki. Gakkai. Zasshi.* 36(10):902-7.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Kamalam A, Yesudian P, Thambiah AS. 1977. Cutaneous infection by *Cryptococcus laurentii. Br. J. Dermatol.* 97:221-223.

Kapenda K. 1987. Meningitis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a Zairean AIDS Patient. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6:320-1.

Kariniemi AL, Jeskanen L, Stubb S. 1999. Cutaneous and cerebral cryptococcosis during corticosteroid therapy. *Duodecim.* 115:2759-62.

Karstaedt AS, Crewe-Brown HH, Dromer F. 2002. Cryptococcal meningitis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii,* serotype C, in AIDS patients in Soweto, South Africa. *Med. Mycol.* 40(1):7-11.

Kelley DC, Mossier JE. 1977. Public health aspects of mycotic diseases. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 171:1168-1170.

Kenneth JR. Medical Microbiology. An Introduction to Infectious Diseases, 3ª ed. Appleton & Lange; 1994:601-603.

Khan ZU, Pal M, Randhawa HS, Sandhu RS. 1978. Carriage of *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons. *J. Med. Microbiol.* 11(2):215-8.

Khosravi AR. 1997. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columbia livia*) droppings in northern Iran. *Mycopathologia.* 139(2):93-5.

Kielstein P, Bocklisch H, Hotzel H, Schmalreck A, Otto B. 2000 (B). Evidence of *Cryptococcus neoformans* in domestic and sports pigeons in Thyringia. *Mycoses.* 43(1):23-8.

Kielstein P, Hotzel H, Schmalreck A, Khaschabi D, Glawischnig W. 2000 (A). Occurrence of *Cryptococcus* spp. in excreta of pigeons and pet birds. *Mycoses.* 43(1-2):7-15.

Kisha DL, Orkiszewski DR, Howell D, Gilligan PH. 1994. Evaluation of new monoclonal antibody-based latex aglutination test for detection of cryptococcal polysaccaride antigen in serum and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 32:2309-2311.

Kohl KH, Hof H, Schrettenbrunner A, Seeliger HPR, Kwon-Chung KJ. 1985. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Europe. *Lancet.* 29:1515.

Koh TH, Tan AL, Lo YL, Oh H. 2002. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* meningitis in Singapore. Med. Mycology. 40:221-223.

Koneman E, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico, 5ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 1999:955-1037.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Kordossis T, Avlami A, Velegraki A, Stefanou I, Georgakopoulus G, Papalambrou C, Legakis NJ. 1998. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. *Med. Mycol.* 36:335-339.

Krcmery V, Kunova A, Mardiak J. 1997. Nosocomial *Cryptococcus laurentii* fungemia in a bone marrow transplant patient after prophylaxis with ketoconazole successfully treated with oral fluconazole. *Infection.* 25(2):130.

Krumholz RA. 1972. Pulmonary cryptococcosis. A case due to *Cryptococcus albidus. Am. Rev. Respir. Dis.* 105(3):421-4.

Kurtzman CP, Fell JW. The Yeasts, a Taxonomy Study, 4ª ed. Amsterdam: Elsevier; 1998.

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

Kwon-Chung KJ. 1976. A new genus, *Filobasidiella*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans* B and C serotypes. *Mycologia.* 68:943-6.

Kwon-Chung KJ. *Filobasidiella* Kwon-Chung. En: Kurtzman CP and Fell JW, eds. The Yeasts, a Taxonomy Study, 4ª ed. Amsterdam: Elsevier; 1998 (A):656-662.

Kwon-Chung KJ. *Filobasidium* Olive. En: Kurtzman CP and Fell JW, eds. The Yeasts, a Taxonomy Study, 4ª ed. Amsterdam: Elsevier; 1998 (B):663-669.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. 1984. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans. Am. J. Epidemiol.* 120:123-130.

Kwon-Chung KJ, Hill WB, Bennet JE. 1981. New special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. *J. Clin. Microbiol.* 3:383-387.

Kwon-Chung KJ, Peiffer T, Chang YC, Wickes BL, Mitchell D, Stern JJ. 1994. Molecular biology of *Cryptococcus neoformans* and therapy of cryptococcosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 32(1):407-15.

Kwon-Chung KJ, Polachek I, Bennet JE. 1982 (A). Improved diagnostic medium for separation of *C. neoformans* var. *neoformans* (Serotypes A and D) and *C. neoformans* var. *gatii* (Serotypes B and C). *J. Clin. Microbiol.* 15:535-537.

Kwon-Chung KJ, Polachek I, Popkin TJ. 1982 (B). Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. *J. Bacteriol.* 150:1414-21.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Rhodes JC. 1982 (C). Taxonomic studies on *Filobasidiella* species and their anamorphs. Antonie van Leeuwenhoek 48:25-38.

Kwon-Chung KJ, Sorrell TC, Dromer F, Fung E, Levitz SM. 2000. Cryptococcosis. Clinical and biological aspects. *Med. Mycol.* 38:205-213.

Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Stockman L, Roberts GD, Ellis D, Howard DH. 1992. Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Infect. Immun.* 60:1869-74.

Kwon-Chung, Rhodes JC. 1989. Encapsulated and melanin formation as indicators of virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 51:218.

La Rocco MT, Burgert SJ. 1997. Fungal infection in the trasplant recipient and laboratory methods for diagnosis. *Rev. Iberoam. Micol.* 14(4):143-6.

Larone DH. Medically Important Fungi - A Guide to Identification, 3ª ed. Washington, D.C: ASM Press; 1995.

Larsen RA, Bozzette S, McCutchan JA, Chiu J, Leal MA, Richman DD. 1989. The California Collaborative Treatment Group. Persistent-*Crypcococcos neoformans* of the prostate after successful treatment of meningitis. *Ann. Intern. Med.* 111:125-128.

Larsson CE. 2000. Criptococose. En: Simpósio Brasileiro Sobre Micoses Animais, Porto Alegre (Brasil). Anais: 72-7.

Lazera MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM. 2000. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med. Mycol.* 38:379-383.

Lazera MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. 1998. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *Med. Mycol.* 36:119-122.

Lazera MS, Pires FDA, Camillo-Coura L, Nishikawa MM, Bezerra CCF, Trilles L. 1996. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J. Med. Vet. Mycol.* 34(2):127-31.

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

Legendre A, Berthelin C. 1995. How do I treat? Central Nervous System Cryptococcosis in Dogs and Cats. *Progress in Veterinary Neurology.* 6(1):32-34.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Leggiadro RJ, Barrett FF, Hughes WT. 1992. Extrapulmonary cryptococcosis in immunocompromised infants and children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11:43-47.

Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. Manual de Microbiología clínica, 4ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 1987:661-677.

Levitz SM. 1991. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. *J. Infect. Dis.* 13:1163-9.

Levitz SM, Nong S, Seetoo KF, Harrison TS, Speizer RA, Simons ER. 1999. *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infect. Immun.* 67:885-890.

Levitz ST. 1998. Macrophage Interactions with *Cryptococcus neoformans. ASM News.* 64(12):693-699.

Li A, Guo N, Wu S. 1993 (A). A strain of urease negative *Cryptococcus neoformans* isolated from the environment in China. *Chin. Med. Sci. J.* 8(1):52-4.

Li A, Nishimura K, Taguchi H, Tanaka R, Wu S, Miyaji M. 1993 (B). The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinically sourced isolates in China. *Mycopathologia.* 124(1):1-5.

Littman LM, Borok R. 1968. Relation of the pigeon to cryptococcosis: Natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans. Mycopathol. Mycol. Appl.* 35:922-933.

Littman ML, Borok R, Dalton TJ. 1965. Experimental avian cryptococcosis. *Am. J. Epid.* 82:197-207.

Lizarazo J, Mendoza M, Palacios D, Vallejo A, Bustamante A, Ojeda E, Restrepo A, Castañeda E. 2000. Criptococosis ocasionada por *Cryptococcus neoformans* variedad *gattii. Acta. Med. Colomb.* 25:171-178.

López Félix PR. 2002. Criptococosis del Sistema Nervioso Central. *Rev. Mex. Neuroci.* 3(1):34-36.

Lynch DP, Naftolin LZ. 1987. Oral *Cryptococcus neoformans* infection in AIDS. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.* 64(4):449-53.

Maddy KT. 1967. Epidemiology and Ecology of Deep Mycoses of Man and Animals. *Arch. Derm.* 96:409-417.

Madrenys N, De Vroey C, Raes-Wuytack C, Torres-Rodriguez JM. 1993. Identification of the perfect state of *Cryptococcus neoformans* from 195 clinical isolates including 84 from AIDS patients. *Mycopathologia.* 123:65-68.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Maldonado LB, Sosa BA, Mizrachi R. 2001. Aislamiento de levaduras del Género *Cryptococcus* de excretas de palomas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 21(2).

Malik R, Alderton B, Finlaison D, Krockenberger MB, Karaoglu H, Meyer W, Martin P, France MP, McGill J, Lester SJ, O'Brien CR, Love DN. 2002. Cryptococcosis in ferrets: a diverse spectrum of clinical disease. *Aust. Vet. J.* 80(12):749-55.

Malik R, Dill-Macky E, Martin P, Wigney DI, Muir DB, Love DN. 1995. Cryptococcosis in dog: retrospective study of 20 consecutive cases. *J. Med. Vet. Mycol.* 33:291-297.

Malik R, Wigney DI, Muir DB, Love DN. 1997. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of dogs and cats. *J. Med. Vet. Mycol.* 35(1):27-31.

Mancianti F, Nardoni S, Ceccherelli R. 2002. Occurrence of yeasts in psittacines droppings from captive birds in Italy. *Mycopathologia.* 153(3):121-4.

Manfredi R. 2000. Effects of the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) on the temporal trend of diagnosis of AIDS and AIDS-defining disorders. *Infez. Med.* 8(3):134-138.

Mangiarottii AM, Caretta G, De Luca C, Piontelli E. 1993. Hongos asilados del plumaje y excrementos de gallinas en una industria avícola de Monferrato (Pavia-Italia). *Boletín Micológico.* 8(1-2):91-98.

Manrique P, Mayo J, Álvarez JA, Ganchegui X, Zabalza I, Flores M. 1992. Polymorphous cutaneous cryptococcosis: nodular, herpes-like and molluscum-like lesions in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Am. Acad. Dermatol.* 26:122-124.

Martín Mazuelos E, Valverde Conde A. 2001. Criptococosis: Diagnóstico microbiológico y estudio de la sensibilidad in vitro. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Valme. Sevilla http://www.seimc.org/control/revi_Mico/cripto.htm.

Martins HM, Bernardo FM, Martins ML. 1996. *Cryptococcus* spp. associated with *Eucalyptus* trees in Lisboa, Portugal, abstr. 7.1. *In* Abstracts of the Third Meeting of the European Confederation of Medical Mycology, Lisboa, Portugal.

Mascaró JM. 1993. Primary cutaneous cryptococcosis in a patient with AIDS. *Eur. J. Dermatol.* 3:570-572.

Massa MC, Doyle JA. 1981. Cutaneous cryptococcosis simulating pyoderma gangrenosum. *J. Am. Acad.* 5:32-36.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Matee MI, Matre R. 2001. Pathogenic isolates in meningitis patients in Dar Es Salaam, Tanzania. *East. Afr. Med. J.* 78(9):458-60.

Mattsson R, Haemig PD, Olsen B. 1999. Feral pigeons as carriers of *Cryptococcus laurentii, Cryptococcus uniguttulatus* and *Debaryomyces hansenii. Med. Mycol.* 37(5):367-9.

McCurdy LH, Morrow JD. 2001. Ventriculitis due to *Cryptococcus uniguttulatus. South. Med. J.* 94(1):65-6.

McNamara TS, Cook RA, Behler JL, Ajello L, Padhye AA. 1994. Cryptococcosis in a common anaconda (*Eunectes murinus*). *J. Zoo. Wildlife. Med.* 25:128-132.

Medleau L, Barsanti JA. Criptococosis. En: Green CE, ed. Enfermedades infecciosas. Perros y gatos, México: McGraw-Hill Interamericana; 1993:723-731.

Micalizzi C, Persi A, Parodi A. 1997. Primary cutaneous cryptococcosis in an immunocompetent pigeon keeper. *Clin. Exp. Dermatol.* 22(4):195-7.

Miller MF, Mitchell TG. 1991. Killing of *Cryptococcus neoformans* strains by human neutrophils and monocytes. Infect. Immun. 59:24-28.

Miller RF. 1999. *Pneumocystis carinii* infection in non-AIDS patients. *Current opinion in Infectious Diseases.* 12:371-377.

Miró J, Mallolas J, Moreno A. Criptococosis. En: Podzamczer Palter D, Graus Ribas F, Clotet Sala B, Portegies P, eds. Sistema nervioso y SIDA. Barcelona: J.R. Prous; 1995:93-110.

Miró J, Mallolas J, Moreno A, Marco F, García F. 1997. *Cryptococcus neoformans* infections in patients infected and not infected with HIV. *Rev. Clin. Esp.* 1:49-59.

Mitchell TG, Perfect JR. 1995. Cryptococcosis in the era of AIDS 100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans. Clin. Microbiol. Rev.* 8:515-48.

Montagna MT, Tortorano AM, Fiore L, Viviani MA, Barbuti S. 1997. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en Italy. Note I. Premier cas autochtone de mëningite à sérotype B chez un sujet VIH positif. *J. Mycol. Med.* 7:90-92.

Montesdeoca, JA. 1989. La colombofilia en las islas. La Real Sociedad Colombófila de Tenerife. *Colombofilia Mensajera.* 355:32-34.

Nakamura Y, Kano R, Sato H, Watanabe S, Takahashi H, Hasegawa A. 1998. Isolates of *Cryptococcus neoformans* serotype A and D on canavanine-glycine-bromthymol blue medium. *Mycoses.* 41(1-2):35-40.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Nelson RW, Couto CG. Medicina interna de animales pequeños, 2ª ed. Buenos Aires-República Argentina: Inter-Médica; 2000:1388-1391.

Newberry WM, Walter JE, Chandler JW. 1967. Epidemiologic study of *Cryptococcus neoformans. Ann. Intern. Med.* 67:724-32.

Nielsen SL, Davis RL. 1988. Neuropathology of Acquired Immunodeficiency syndrome. In AIDS and the Nervous System. Rosenblum ML, Levy RM, Bredesen Eds. Raven Press.

Nodarse Hernández R, Bravo Pérez R. 1999. Aspectos clínicos y microbiológicos en un paciente inmunocompetente con criptococosis del Sistema Nervioso Central. *Rev. Cubana. Med. Milit.* 28(1):67-72.

Nosanchuk JD, Casadevall A. 2003. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. *Microbiology.* 149(7):1945-51.

Nosanchuk JD, Shoham S, Fries BC, Shapiro DS, Levitz SM, Casadevall A. 2000. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. *Ann. Intern. Med.* 132(3):205-8.

Núñez Fernández MJ, Lis Muñoz JM, Rodríguez JR, Allegue MJ, Viladrich A, Conde C, Santiago MP, Amigo Jorrín MC. 1999. Criptococosis encefálica diseminada como forma de presentación de una linfocitopenia T-CD4 idiopática. *Rev. Neurol.* 28(4):390.

Ordóñez N, Castañeda E. 1992. *La Criptococosis y su agente etiológico. Médicas UIS.* 6:207-215.

Ordóñez N, Castañeda E. 1994. Serotipificación de aislamientos clínicos y del medio ambiente de *Cryptococcus neoformans* en Colombia. *Biomédica.* 14:131-39.

Ordóñez N, Castañeda E. 2001. Varieties and serotypes of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates in Colombia. *Rev. Iberoam. Micol.* 18:128-130.

Pal M, Baxter M. 1985. Isolation of *Cryptococcus neoformans* using a simplified sunflower seed medium. *Proc. NZ. Microbiol. Soc.* 29: 155-58.

Pal M, Mehrotra BS. 1984. Studies on the isolation of *Cryptococcus neoformans* from fruits and vegatales. *Mykosen.* 28:200-205.

Pal M. 1991. Feline meningitis due to *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and review of feline cryptococcosis. *Mycoses.* 34(7-8):313-6.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Pal M. 1997. First report of isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from avian excreta in Kathmandu, Nepal. *Rev. Iberoam. Micol.* 14:181-183.

Pankhurst C, Peakman M. 1989. Reduced $CD4^+$ T cells and severe oral candidiasis in absence of HIV infection. *Lancet.* 1:672.

Park MK, Hospenthal DR, Bennett JE. 1999. Treatment of hydrocephalus secondary to cryptococcal meningitis by use of shunting. *Clin. Infect. Dis.* 28(3):629-33.

Paterson DL, Singh N. 2002. *Cryptococcus neoformans* infection. *Liver Transpl.* 8:846-7.

Payá MJ. Hongos de interés veterinario. En: Vadillo Machota S, Píriz Durán S y Mateos Yanes E. eds. Manual de Microbiología Veterinaria. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2002:556-557.

Peachey PR, Gubbins PD, Martin RE. 1998. The association between cryptococcal variety and immunocompetent and immunocompromised hosts. *Pharmacotherapy.* 18:255-64.

Pérez Cárdenas JE. 2003. La criptococosis: De enfermedad esporádica a reemergente. Parte I: Etiología, Distribución y Manifestaciones clínicas. http://www.geocities.com/biosaluduc/criptococosis.html.

Pérez J, Carrasco L. 2000. Diagnóstico histopatológico de micosis en patología veterinaria. *Rev. Iberoam. Micol.* 17:S18-S22.

Pérez Ramos S. 1980. Aportaciones bioquímicas y ecológicas al Género *Cryptococcus*. Resumen de Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.

Pfeiffer TJ, Ellis DH. 1991. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from California. *J. Infect. Dis.* 163:929-930.

Pfeiffer TJ, Ellis DH. 1992. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus tereticornis*. *J. Med. Vet. Mycol.* 30:407-408.

Phaff MJ, Fell JW. The genus *Cryptococcus*. En: Lodder J, ed. The yeasts, a taxonomic study. 2ªed. New Holland Publishing Co. Amsterdam-London; 1970:1088-1145.

Pham TS, Mansfield LS, Turiansky GW. 1997. Zoonoses in HIV infected patients: Risk factors and prevention. Part I. Nervous system and pulmonary diseases. *The AIDS reader.* 7(1):7-15.

Pitisuttithum P, Tansuphasawadikul S, Simpson AJ, Howe PA, White NJ. 2001. A prospective study of AIDS-associated cryptococcal meningitis in Thailand treated with high-dose amphotericin B. *J. Infect.* 43(4):226-33.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Polacheck I, Hearing VJ, Kwon–Chung KJ. 1982. Biochemical studies of phenoloxidase and utilization of catecholamines in *Cryptococcus neoformans. J. Bacteriol.* 150(3):1212-20.

Polacheck I, Kwon-Chung KJ. 1986. Canavanine resistance in *Cryptococcus neoformans. Antimicrob. Agents Chemother.* 29:468-73.

Polacheck Y, Platt Y, Aronovitich J. 1990. Catecholamines and virulence of *Cryptococcus neoformans. Infect. Immun.* 58:2919-2922.

Pollock C. 2003. Fungal diseases of columbiformes and anseriformes. *Veterinary Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.* 6(2):351-61.

Pontón J. 2002. Diagnóstico microbiológico de las micosis. *Rev. Iberoam. Micol.* 19:25-29.

Pounden WD, Anderson JM, Jaeger RF. 1952. A severe mastitis problem associated with *Cryptococccus neoformans* in a large dairy herd. *Am. J. Vet. Res.* 13:121-128.

Powderly WG, Cloud GA, Dismukes WE, Saag MS. 1994. Measurement of cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid: value in the management of AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin. Infect. Dis.* 18(5):789-92.

Powderly WG, Finkelstein D, Feinberg J, Frame P, He W, Van der Horst C, Koletar SL, Eyster ME, Carey J, Waskin H, Hooton T, Hyslop N, Spector S, Bozzette S. 1995. A ramdomized trial comparing fluconazole with clotrimazole troches for the prevention of fungal infections in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. NIAID AIDS Clinical Trials Group. *N. Engl. J. Med.* 332(11):700-5.

Provenzale JM, Jinkins R. 1997. Brain and spine imaging findings in AIDS patients. *Radiol. Clin. North. Am.* 35:1127-66.

Pulido JM, Thopam G. 1999. La Real de Gran Canaria. Algo más que un club. *La Voz de Gran Fondo.* 30-32.

Puras Gil AM, Montes Díaz M, Fernández Seara P, López Cousillas A. 2000. Expresión morfológica de las infecciones fúngicas graves. Participación del patólogo en el diagnóstico. *Rev. Iberoam. Micol.* 17:34-40.

Quin PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Veterinary Microbiology and Microbial Disease, 1ª ed. Great Britain: Blackwell-Science; 2002:235-237.

Quindós, G. 2002. Las micosis en el amanecer del siglo XXI. *Rev. Iberoam. Micol.* 19:1-4.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Radentz W, Elewski BE. Opportunistic mycosis. En: Elewski BE, ed: Cutaneous fungal infections. Nueva York: Igaku-Shoin Medical Publishers; 1992;203-205.

Ramos-Vara JA, Ferrer L, Visa J. 1994. Pathological findings in a cat with cryptococcosis and feline immunodeficiency virus infection. *Histol. Histopathol.* 9(2):305-8.

Refai M, Taha M, Selim SA, Elshabourii F, Yousseff HH. 1983. Isolation of *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* and other yeasts from pigeon droppings in Egypt. *Sabouraudia.* 21(2):163-5.

Rhodes JC, Polacheck I, Kwon–Chung KJ. 1982. Phenoloxidase activity and virulence in isogenic strains of *Cryptococcus neoformans. Infect. Immun.* 36(3):1175-84.

Ricchi E, Manfredi R, Scarani P, Costigliola P, Chiodo F. 1991. Cutaneous cryptococcosis and AIDS. *J. Am. Acad. Dermatol.* 25:365-366.

Riley CB, Bolton JR, Mills JN, Thomas JB. 1992. Cryptococcosis in seven horses. *Aust. Vet. J.* 69(6):135-9.

Ritterband DC, Seedor JA, Shah MK, Waheed S, Schorr I. 1998. A unique case of *Cryptococcus laurentii* keratitis spread by a rigid gas permeable contact lens in a patient with onychomycosis. *Cornea.* 17:115-118.

Rivero Gómez J. 1990. La colombofilia en las islas. La colombofilia en Gran Canaria. *Colombofilia Mensajera.* 356:21-25.

Rodrigues ML, Alviano CS, Travassos LR. 1999. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. *Microbes Infect.* 1(4):293-301.

Rosario I, Acosta B, Déniz S, Padilla D, Soro G. 2002. Presencia de *Cryptococcus* spp en buche y heces de palomas mensajeras (*Columba livia*) en la isla de Gran Canaria (España). *Rev. Iberoam. Micol.* 19(3):S30-S31.

Rose AH, Harrison JS. The yeasts, 2ª ed. Gran Bretaña-Londres: Academic Press; 1987:239-244.

Rozenbaum R. 1990. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in a Brazilian AIDS Patient. *Mycopathol.* 112:33-4.

Rozenbaum R, Goncálvez AJR. 1994. Clinical epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. *Clin. Infect. Dis.* 18:369-380.

Ruane PJ, Walker LJ, George WL. 1988. Disseminated infection caused by urease-negative *Cryptococcus neoformans. J. Clin. Microbiol.* 26(10):2224-5.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Rubio C. Micosis subcutáneas y sistémicas. En: García Rodríguez JA y Picazo JJ, eds. Microbiología Médica. 1. Microbiología Médica General, 1ª ed. Madrid: Harcourt Brace; 1998:663-667.

Ruiz A, Fromtling RA, Bulmer GS. 1981. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. *Infect. Immun.* 31:560-563.

Ruiz A, Neilson JB, Bulmer GS. 1982. Control of *Cryptococcus neoformans* in nature by biotic factors. *Sabouraudia.* 20:21-9.

Sabetta JR, Andriole VT. 1985. Infección criptocócica del Sistema Nervioso Central. *Clin. Med. North. Am.* 2:357-68.

Saez H. 1978. Reservoir animal, caractéristiques et différenciation de trois *Cryptococcus* voisins: *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus uniguttulatus* et *Cryptococcus luteolus. Zbl. Vet. Med. B.* 25:764-774.

Salkin IF, Hurd NJ. 1982. New medium for differentiation *of Cryptococcus neoformans* serotype pairs. *J. Clin. Microbiol.* 15:169-71.

Sanchetee P. 1998. Cryptococcal meningitis in immunocompetent patients. *J. Assoc. Phisician India.* 46:617-9.

Sánchez Ramírez F. 1992. Colombofilia. La primera sociedad grancanaria, a principios de siglo. Diario de Las Palmas, 11 de Marzo, 38.

Sánchez Ramírez F. 1997. Colombofilia. El progreso constante en Canarias. Diario de Las Palmas, 6 de Enero, 74.

Sanfelice F. 1894. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutii. *Ann. Igiene.* 4:463-95.

Sansinforiano ME, Rabasco A, Martínez-Trancón M, Parejo JC, Hermoso de Mendoza M, Padilla JA. 2001. Optimización de las condiciones RAPD-PCR en *Candida* spp y *Cryptococcus* spp. *Rev. Iberoam. Micol.* 18:65-69.

Santamaría Jáuregui JM, Zubero Sulibarria Z. 2002. Las micosis en los pacientes infectados por el VIH en la era de los tratamientos antirretrovirales de gran eficacia. *Rev. Iberoam. Micol.* 19:5-8.

Santamaría Jáuregui JM, Zubero Sulibarria Z. Criptococosis. En: Farreras VP y Rozman C, eds. Medicina Interna. 13ª ed. Barcelona: Mosby-Doyma; 1995.

Schell W. www.dumru.mc.duke.edu/.

Schonheyder H, Stenderup A. 1982. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon manure on two media inducing pigment formation. *Sabouraudia.* 193-197.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Schupbach CW, Wheeler CE, Briggaman RA, Warner NA, Kanof EP. 1976. Cutaneous manifestations of disseminated cryptococcosis. *Arch. Dermatol.* 112:1734-1740.

Schwarz J, Kauffman CA. 1977. Occupational hazards from deep mycoses. *Arch. Dermatol.* 113:1270-1275.

Scott EA, Duncan JR, McCormack JE. 1974. Cryptococcosis involving the postorbital area and frontal sinus in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165:626-627.

Seibold HR, Roberts CS, Jordan EM. 1953. Cryptococcosis in a Dog. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 122:213-215.

Severo LC, Berta e Zardo I, Thomaz Londero A. 2001. Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii. Rev. Iberoam. Micol.* 18:200-201.

Shelburne SA, Hamill RJ. 2003. The immune reconstitution inflammatory syndrome. *AIDS Rev.* 5(2):67-79.

Shields AB, Ajello L. 1966. Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans. Science.* 151:218-23.

Simpson DM, Berger JR. 1997. Neurologic manifestations of HIV infection. *Med. Clin. North. Am.* 80:1363-1394.

Singh N, Gayowski T, Wagener MM, Doyle H, Marino IR. 1997. Invasive fungal infections in liver transplant recipients receiving tacrolimus as the primary immunosuppressive agent. *Clin. Infect. Dis.* 24:179-184.

Sinnott JT, Rodnite J, Emmanuel PJ, Campos A. 1989. *Cryptococcus laurentii* infection complicating peritoneal dialysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8:803-805.

Smith MB, Dunklee D, Hangna VU, Woods GL. 1999. Comparative Performance of the RapID Yeast Plus System and the API 20C AUX Clinical Yeast System. *Journal of Clin. Microbiol.* 37(8): 2697–2698.

Sorrell TC, Ellis DH. 1997. Ecology of *Cryptococcus neoformans. Rev. Iberoam. Micol.* 14:42-43.

Sorrell TC. 2001. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii. Med. Mycol.* 39:155-168.

Speed B, Dunt D. 1995. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans. Clin. Infect. Dis.* 21:28-34.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Staib F. 1962. *Cryptococcus neoformans* and *Guizotia abyssinica* (syn. *G. oleifera* D.C.) (farbreadktion für *C. neoformans*). *Z. Hyg. Infektionskr. Med Mikrobiol. Immunol. Virol.* 148:466-475.

Staib F. 1963. Zur Kreatinin- kreatinin- Assimilation in der hefepilzdiagnostik. *Zbl. Bakt. Par. Infekt. Hyg. I. Orig.* 191:429-432.

Staib F. 1994. *Cryptococcus neoformans* and cryptococcosis. Peculiarities and challenge: opening lecture of the Second International Conference on *Cryptococcus* and cryptococcosis. Milan (Italy). *J. Mycol. Med.* 4:56-60.

Staib F. 1999. The green colour effect (GCE) of the killer strain *Cryptococcus laurentii* CBS 139 on Staib agar. *Mycoses.* 42:103-106.

Staib F, Heissenhuber M. 1989. *Cryptococcus neoformans* in birds droppings: A hygienic-epidemiological challenge. *AIFO.* 4:649-655.

Staib F, Schulz-Dieterich J. 1984. *Cryptococcus neoformans* in fecal matter of birds kept in cages – control of *Cryptococcus neoformans* habitats. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B.* 174:179-186.

Stenderup J, Flensted K, Jorgensen C, Sorensen AH, Hansen NC, Siersted HC. 1989. Occurrence of the yeast, *Cryptococcus neoformans*, in pigeon droppings. *Ugeskr. Laeger.* 151(45):2974-5.

Stoddard JL, Cutler EC. 1916. *Torula* infection in man. *Monogr. Rockefeller Inst. Med. Res.* 6:1-98.

Sugita T, Takashima M, Ikeda R, Nakase T, Shinoda T. 2000. Intraspecies diversity of *Cryptococcus laurentii* as revealed by sequences of internal transcribed spacer regions and 28S rRNA gene and taxonomic position of *C. laurentii* clinical isolates. *J.Clin. Microbiol.* 38(4) :1468-1471.

Sukroongreung S, Kitiniyom K, Nilakul C, Tantimavanich S. 1998. Pathogenicity of basidiospores of *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*. *Med. Mycol.* 36(6):419-24.

Swinne-Desgain D. 1975. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. *Sabouraudia.* 13(3):303-8.

Swinne-Desgain D. 1976. *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons following its experimental administration. *Sabouraudia.* 14(3):313-7.

Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nakase T. 2001. Reclassification of the *Cryptococcus humicola* complex. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:2199-2210.

Taylor MB, Chadwick D, Barkham T. 2002. First reported isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a patient in Singapure. *J. Clin. Microbiol.* 40(8):3098-9.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Thrusfield M. Epidemiología Veterinaria. Zaragoza: Acribia;. 1990: 42-44 y 191-197.

Tokojima M, Ihi T, Kyoraku Y, Hiratsuka T, Matsumoto K, Matsumoto N, Katoh S, Mukae H, Matsukura S. 2001. A case of bird fanciers' disease caused by parrot droppings. *Nihon. Kokyuki. Gakkai. Zasshi.* 39(10):739-43.

Torres N. 2001. Palomas mensajeras. Mensajes en el aire. http://www.alternativasganaderas.com/num13/palomas.htm.

Torres Rodríguez JM, Baró T, Hermoso de Mendoza M, Morena Y, Alía C. 1997. Primeros aislamientos autóctonos de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* en España. *Rev. Iberoam. Micol.* 14:36.

Torres Rodríguez JM, Baró T, Morena Y, Alía C, López O, Hermoso de Mendoza M. 1999. Caracterización molecular de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* de brotes epidémicos de criptococosis en cabras. *Rev. Iberoam. Micol.* 16:164-165.

Torres Rodríguez JM. Criptococosis. En: Torres Rodríguez JM, Del Palacio Hernanz A, Guarro-Artigas J, Negroni-Briz R, Pereiro Miguens M. eds. Micología Médica. Barcelona: Masson; 1994:183-190.

Uno J, Tanaka R, Branchini ML, Aoki FH, Yarita K, Sano A, Fukushima K, Mikami Y, Nishimura K, Miyaji M. 2001. Atypical *Cryptococcus neoformans* isolate from an HIV-infected patient in Brazil. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 42(3):127-32.

Van Breuseghem, R. 1966. Guide pratique de Mycologie Medicale et Veterinaire, 1ª ed. París : Ed. Masson et Cie. 130-131 y 184-185.

Van Cutsem J, Rochette F. Micosis en los animales domésticos. Janssen Research Foundation. Esteve Veterinaria. Laboratorios Dr. Esteve, 1993.

Vandersmissen G, Meuleman L, Tits G, Verhaeghe A, Peetermans WE. 1996. Cutaneous cryptococcosis in corticosteroid-treated patients without AIDS. *Acta Clin. Belg.* 51(2):111-7.

Van Uden N, Do Carmo Sousa L. 1957. Yeasts of the bovine caecum. *J. Gen. Microbiol.* 18:385-395.

Vázquez TO, Campos RT, Bobadilla-Aguirre A, Martínez-Barbabosa I, Coria-Lorenzo JJ, García-Camacho G. 2001. Polymicrobial endocarditis caused by *Geotrichum penicillicatum*, *Cryptococcus albidus* and *Staphylococcus epidermidis* in a child. *Acta Pediatr. Mex.* 22(6):406-410.

Verse M. 1914. Uber einen Fall von Generalisierter Blastomycose beim Menschen. *Verh. Deutsch. Ges. Path.* 17:275-278.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Vidotto V, Defina N, Pugliese A, Aoki S, Nakamura K, Takeo K. 2002. Effect of different K+ concentrations on *Cryptococcus neoformans* phenoloxidase activity. *Mycopathologia.* 156(3):171-6.

Vidotto V, Gallo MG. 1985. Study on the presence of yeasts in the feces of the rock pigeon (*Columba livia* Gmelin 1789) from rural areas. *Parassitologia.* 27(3):313-20.

Vishniac HS. 2002. *Cryptococcus tephrensis*, sp.nov., and *Cryptococcus heimaeyensis*, sp.nov.; new anamorphic basidiomycetous yeast species from Iceland. *Can. J. Microbiol.* 48(5):463-7.

Vuillemin P. 1901. Les blastomycetes pathogenes. *Rev. Gen. Sci. Pures. Appl.* 12:732-751.

Wagner JL, James RP, Krigman MR. 1968. *Cryptococcus neoformans* infection in a Dog. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 153:945-949.

Walker C, Malik R, Canfield PJ. 1995. Analysis of leucocytes and lymphocyte subsets in cats with naturally-occurring cryptococcosis but differing feline immunodeficiency virus status. *Aust. Vet. J.* 72(3):93-7.

Wang Y, Aisen P, Casadevall A. 1995. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect. Immun.* 63(8):3131-6.

Wang Y, Casadevall A. 1994 A. Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(10):3864-6.

Wang Y, Casadevall A. 1994 B. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect. Immun.* 62(7):3004-7.

Weber VA, Schäfer R. 1991. Untersuchungen zum Vorkommen von *Cryptococcus neoformans* in Kotproben von in menschlichen Wohnbereich gehaltenen Vögeln. Berl. Munich. Tierärztl. Wschr. 104:419-421.

Wegener HH, Staib F. 1983. Fatal cryptococcosis in a bird fancier. A clinical case report on pathology, diagnosis and epidemiology of cryptococcosis. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A].* 256(2):231-8.

Weiland E, Bohm KH, Abdallah IS. 1968. Zum Vorkommen Von *Cryptococcus neoformans* in tauben. *Berl. Tirärtzl. Wschr.* 81:409-410.

Wendisch J, Blaschke-Hellmessen R, Kaulen F, Schwarze R, Kabus M. 1996. Lethal meningeal encephalitis from *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in a girl without serious immunodeficiency. *Mycoses.* 39(1):97-101.

Wieser HG. 1973. Pathogenicity of *Crytococcus albidus. Schweiz. Med. Wochenschr.* 103(13):475-81.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Williamson PR. 1997. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front. Biosci.* 2:99-107.

Wilson JW, Plunkett OA. The fungous disease of man. University of California Press, 1ª ed. Berkeley; 1965.

Wong B, Perfect JR, Beggs S. 1990. Production of the hexitol D-mannitol by *Cryptococcus neoformans* in vitro in rabbit with experimental meningitis. *Infect. Immun.* 58:1664.

Xu J, Vilgalys R, Mitchell TG. 2000. Multiple gene genealogies reveal recent dispersion and hybridization in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Ecol.* 9(10):1471-81.

Yamada Y, Kondo K. 1973. Coenzyme Q system in the classification of the yeast genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus*, and the yeast-like genera *Sporobolomyces* and *Rhodosporidium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 19:59.

Yildiran ST, Sarac Li MA, Gonlum A, Gun H. 1998. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from pigeon droppings collected throughout Turkey. *Med. Mycol.* 36(6):391-4.

Yilmaz A, Goral G, Helvaci S, Kilicturgay K, Gokirmak F, Tore O, Gedikoglu S. 1989. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in pigeon feces. *Mikrobiyol. Bul.* 23(2):121-6.

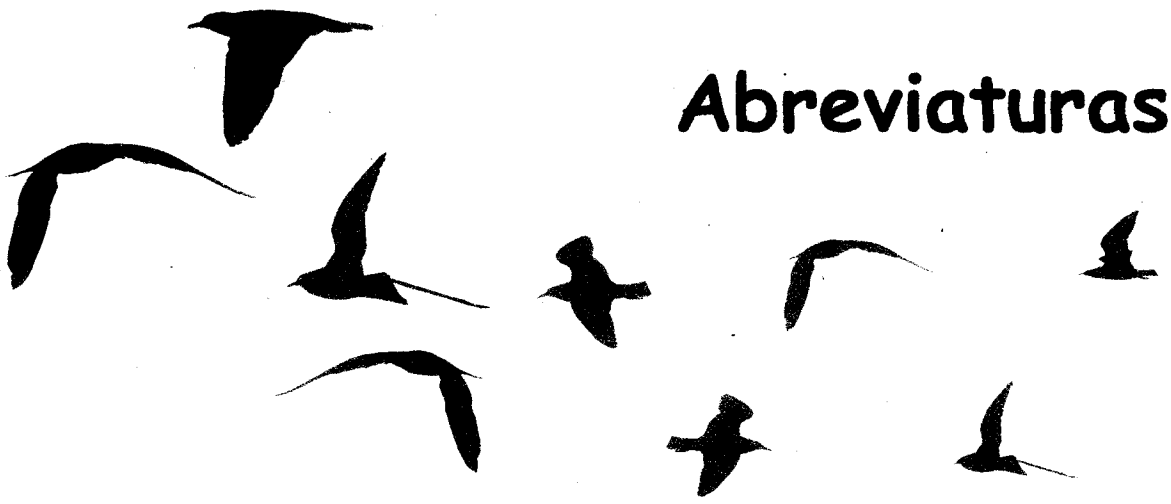
Yimtubezenash WA, Leykun J, Dawit A. 2001. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* from environmental sources in Ethiopia. *Ethiop. J. Health. Dev.* 15:45-50.

Yip SK, Cheng C, Wong MY, Tan BH, Sim CS, Lim SH. 1998. Cryptococcal prostatic abscess in an immunocompromised patient: a case report and review of the literature. *Ann. Acad. Med. Singapore.* 27(6): 873-6.

Zuger A, Louie E, Holzman SR, Simberkoff SM. 1986. Cryptococcal disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* 104:234-240.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Abreviaturas



© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

10.- ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFB	Anfotericina B
cc	Centímetros cúbicos
CDB	Creatinina Dextrosa Azul de Bromotimol
CDBT	Creatinina-Dextrosa-Azul de bromotimol-Tiamina
CECT	Colección Española de cultivos tipo
CGB	Canavanina-Glicina-Azul de bromotimol
EDTA	Ácido etilendiamino-tetraacético
G+C	*Guanina+Citosina*
GCP	Glicina-Cicloheximida-rojo fenol
gr	Gramo
Kg	kilogramo
l	litro
LCR	Líquido cefalorraquídeo
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
m^2	Metro cuadrado
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Mlímetro
NaOH	Hidróxido sódico
nm	Nanómetro

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RM	Resonancia Magnética
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNC	Sistema Nervioso Central
Spp.	Especie
TAC	Tomografía Axial Computerizada
TARGA	Terapia antirretroviral de gran actividad
Var.	Variedad
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

Agradecimientos

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

11.- AGRADECIMIENTOS

A Dª Begoña Acosta Hernández por encaminar mis primeros pasos en el difícil mundo de la Investigación, por su asesoramiento y colaboración incondicional en la realización de esta Tesis Doctoral y por haberme ofrecido su amistad y su cariño incondicionalmente.

A Dª Soraya Déniz Suárez por esa energía que siempre libera y contagia y por hacerme reir en esos días especiales en los que no tienes fuerza para seguir adelante.

A D. Fernando Real Valcárcel y a D. José B. Poveda Guerrero, porque gracias a su ayuda pude disponer de muchos medios que no estaban a mi alcance.

A D. Miguel Hermoso de Mendoza por su inestimable apoyo en el desarrollo de esta Tesis Doctoral tanto por la bibliografía aportada como por la cesión de algunas cepas imprescindibles para finalizar nuestro estudio.

Al personal sanitario del laboratorio de Microbiología del Hospital Doctor Negrín de Las Palmas de Gran Canaria y especialmente a Dña Isabel Álamo, la cual nos proporcionó las cepas clínicas de origen humano imprescindibles en este estudio.

A Angelo Santana del Pino, Profesor Titular de la ULPGC del Área de Conocimiento de Estadística e Investigación Operativa por su gran ayuda y apoyo en el estudio estadístico de esta Tesis y por todo el tiempo que me ha dedicado.

A Giommy, por su ayuda, comprensión, amor y paciencia en esos días oscuros en que no veía nada claro.

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

A la Federación Española de Colombofilia y al Batallón de Transmisiones de Servicios Especiales (El Pardo, Madrid), por haberme aportado los datos básicos sin los que este estudio no habría podido llevarse a cabo y por supuesto a todos aquellos colombófilos que se prestaron a ayudarme desinteresadamente en la elaboración de este estudio y muy especialmente a Carmelo Santana y a Manuel Suárez Fiol por la información que me han transmitido de su propia experiencia como colombófilos y por estar ahí siempre que los necesité.

A Félix y a Dani, mis dos ratoncitos inseparables de laboratorio con los que compartí momentos inolvidables, además de ser dos verdaderos amigos con los que puedo contar no sólo en este momento tan importante de mi vida, sino en cualquiera que se me presente. Gracias.

A Yoly, mi gran amiga y confidente, por estar ahí siempre que la necesité y por supuesto a Irma por su inestimable ayuda. A las dos me gustaría agradecer el apoyo recibido en esos momentos especiales de debilidad y por ofrecerme esos cafecitos de las seis de la tarde que tan bien entraban en compañía de Ángela.

A D. Miguel Batista Arteaga, mi gran amigo y compañero que más de una tarde ha tenido que soportar mis histerias, pero supo comprenderme y ayudarme.

A Ana, por los buenos consejos que siempre me dio, por su comprensión y cariño y a todos aquellos becarios y amigos que me han animado y apoyado en los momentos más difíciles del desarrollo de este trabajo, en especial a Cristian, Vane, Eduardo, Ana Sofía, Luigi, Mª Jose, Patricia y Nicolás.

Debo hacer mención especial a mi inestimable amigo y también becario Raúl, porque juntos hemos compartido los últimos meses de trabajo de nuestras respectivas tesis y porque él ha sido el que me ha aportado

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006

mucha fuerza en estos últimos días quitándole importancia a las cosas que a mi me parecían imposibles.

A César Falcón, por la paciencia que ha mostrado tener conmigo y con mis dificultades informáticas, además de haber aportado de una forma u otra, parte importante de este estudio y por ofrecerme su amistad.

A Vilma y a Pedro, porque a pesar de la distancia que nos separa han seguido preocupándose por el desarrollo de este trabajo.

Por último, debo agradecer a todos aquellos que de una forma u otra han aportado su granito de arena en dicho estudio: Melani, Isolina, Rafita, Elena, Esther, Manola, Miriam, Desiré, René, Jaime, Lita, Victoria, Tana, Jose Carlos, Mª Carmen y Guillermo, Habid, Gustavo, Alexis, Noelia y todos aquellos que a estas horas de la noche no recuerdo.....

© Del documento, los autores. Digitalización realizada por ULPGC. Biblioteca Universitaria, 2006