



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”

Distribución ambiental del género *Cryptococcus* en reservorios naturales (Guano de *Columba* spp. y *Eucalyptus* spp.) y su potencial impacto en la salud pública del municipio de Puebla.

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

DANIELA IVONNE ALANIZ SAUCEDO

Director de tesis:
Dr. Ricardo Munguía Pérez



Diciembre 2020



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



"La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra"

Distribución ambiental del género *Cryptococcus* en reservorios naturales (Guano de *Columba spp.* y *Eucalyptus spp.*) y su potencial impacto en la salud pública del municipio de Puebla.

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

DANIELA IVONNE ALANIZ SAUCEDO

Comité tutorial:

Director	Dr. Ricardo Munguía Pérez
Co-director	Dra. Elsa Iracena Castañeda Roldán
Integrante Comité Tutorial	Dra. María Teresa Zayas Pérez
Integrante Comité Tutorial	Dr. Manuel Huerta Lara
Integrante Comité Tutorial	Dr. Raúl Ávila Sosa Sánchez

Diciembre 2020



BUAP

C. Daniela Ivonne Alaniz Saucedo

Por este conducto me permito comunicarle que los miembros del jurado integrado por:

Dra. Esperanza Duarte Escalante *Presidente*

Dra. María Lilia Cedillo Ramírez *Secretaria*

Dra. María Teresa Zayas Pérez *Vocal*

Dr. Raúl Ávila Sosa Sánchez *Vocal*

Dr. Manuel Huerta Lara *Suplente*

Designado para la defensa de su tesis **“Distribución ambiental del género *Cryptococcus* en reservorios naturales (*Guano de Columba ssp*; *Eucaliptus spp*) y su potencial impacto en la salud pública del municipio de Puebla”** han manifestado mediante su voto que ésta cumple con los méritos suficientes para ser defendida como tesis de grado de Maestría en Ciencias Ambientales, por lo que este Posgrado le autoriza la impresión de la misma.

Sin otro asunto en lo particular, quedo de Usted.

ATENTAMENTE

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z; a 14 de septiembre de 2020

E. Torres. R.

Dr. Eduardo Torres Ramírez

Coordinador

Posgrado en Ciencias Ambientales

c.c.p minutario

Dr.ETR/melh

E-Mail: ciencias.ambientales@correo.buap.mx



Posgrado en Ciencias
Ambientales

Edif. IC6, Ciudad Universitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue.
C.P. 72570
01 (222) 2 29-55-00 Ext. 7387

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por concederme la beca para la realización de mis estudios de Maestría.

A mi asesor el Dr. Ricardo Munguía Pérez y a mi co-asesora la Dra. Elsa I. Castañeda Roldan por su apoyo en la realización de este proyecto y por compartir conmigo sus conocimientos que contribuyeron a mi crecimiento profesional y académico en esta etapa.

A los integrantes de mi Comité Tutorial, por sus valiosas aportaciones en la realización del presente trabajo de tesis, el Dr. Raúl Ávila Sosa Sánchez, la Dra. María Teresa Zayas Pérez y el Dr. Manuel Huerta Lara.

Al laboratorio de Micología I perteneciente al Centro de Investigaciones de Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por albergarme tantas horas y días en sus instalaciones para poder realizar este proyecto de tesis.

Y por último al posgrado en Ciencias Ambientales y a mis doctores docentes por brindarme todas las herramientas para mi formación académica en Ciencias Ambientales.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa IV. Investigación y Posgrado.

DEDICATORIA

A mi mamá Alma y mi papá Nicolas que a pesar de la gran distancia siempre estuvieron a mi lado apoyándome en los momentos buenos y en los momentos cuando quería rendirme.

A mi tía Lola y Lucha porque desde el primer día que nací siguen cuidándome y brindándome el cariño y apoyo necesario para culminar una etapa más en mi vida académica. A mi prima Lupita que siempre me habló para echarme porras que siguiera adelante en momentos difíciles. Y a mis dos ángeles en el cielo, mi abuelita Guadalupe la cual estoy segura me sigue cuidando y protegiendo ahora que estoy lejos de mi hogar y mi prima menor Karina que por ella especialmente seguí en este camino después de haberse ido sin yo poder estar ahí.

A mi novio Bruce por aguantarme en mis días buenos, malos y difíciles apoyándome, por quedarse conmigo hasta la noche muchas veces en el laboratorio, por ayudarme a entender mejor las cosas que a veces mi mente no quería entender y sobre todo por darme la idea de realizar una maestría en lo que amo a pesar de la distancia de nuestro hogar.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Contaminación del aire	7
2.1.1 Bioaerosoles.....	9
2.2 Contaminación del aire y el género <i>Cryptococcus</i> spp.	11
2.2.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	14
2.2.2 <i>Cryptococcus gattii</i>	15
2.2.3 Reservorios ambientales de <i>Cryptococcus</i> spp.	16
2.3 Criptococosis	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos particulares	22
6. HIPÓTESIS	23
7. JUSTIFICACIÓN	24
8. METODOLOGIA	25
8.1 Área de estudio.....	26
8.2 Recolección de muestras.....	27
8.2.1 Arboles de <i>Eucalyptus</i> spp.	27
8.2.2 Guano de <i>Columba</i> spp.....	27

8.3	Procesamiento de muestras	28
8.3.1	Arboles de <i>Eucalyptus</i> spp.	28
8.3.2	Guano de <i>Columba</i> spp.	29
8.4	Caracterización e identificación taxonómica	29
9.	RESULTADOS	30
9.1	Árboles de <i>Eucalyptus</i> spp.	30
9.2	Guano de <i>Columba</i> spp.	37
9.3	Caracterización de <i>Cryptococcus</i> spp.	39
9.4	Impacto en la salud	41
10.	DISCUSIÓN	44
10.1	Árboles de <i>Eucalyptus</i> spp.	44
10.2	Guano de <i>Columba</i> spp.	45
10.3	Caracterización fenotípica	46
11.	CONCLUSIONES	48
12.	RECOMENDACIONES	49
13.	LITERATURA CITADA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Penetración del material particulado en órganos del sistema respiratorio.	10
2. Micrografía de células de <i>Cryptococcus</i> teñidas con tinta china.	13
3. Mecanismo de infección de <i>Cryptococcus</i>	14
4. Principales reservorios ambientales de <i>Cryptococcus spp.</i>	18
5. Sitios del Centro Histórico de la Ciudad.	26
6. Sitios dentro de Ciudad Universitaria.	26
7. Muestras de hojas de <i>Eucalytus spp.</i> y guano de <i>Columba spp.</i>	27
8. Medio de transporte para muestras de guano de <i>Columba spp.</i>	28
9. Mapa de la distribución de los individuos de árboles de eucalipto ubicados dentro de Ciudad Universitaria.....	30
10. Árboles de <i>Eucalyptus spp.</i> infestados con plaga.	31
11. Muestras de las hojas adultas de <i>Eucaliptus spp</i> sembradas en cajas de Petri.....	32
12. Muestras de suelo y hojas sembradas en cajas de Petri con agar Sabouraud, correspondientes a las diluciones 1:1000 y 1:10000.	33
13. UFC obtenidas de las muestras de hojas y suelos sembradas en Sabouraud y Mycosel.	34
14. Porcentaje de cada grupo de microorganismos identificados en medio agar Sabouraud y Mycosel.	35
15. UFC obtenidas de las muestras de suelo y hojas de árbol de eucalipto en tres medios de cultivo, utilizando las diluciones 1:1,000 y 1:10,000.....	36
16. Porcentaje de cada grupo de microorganismos identificados en los tres medios de cultivo utilizados, desarrollados a partir de las muestras de hojas de eucalipto y de suelo.....	37

17. Muestras de excretas de paloma después de siete días de incubación.	38
18. UFC identificadas en las 22 muestras de guano de paloma recolectadas en Parque de Dolores y 22 muestras del Parque del Carmen, sembradas en los tres medios utilizados: Sabouraud, Semilla de niger y Mycosel.	38
19. Porcentaje de cada grupo de microorganismos identificados en los tres medios de cultivo utilizados, desarrollados a partir de muestras de guano de paloma.	39
20. Observación en el microscopio de contraste de fases las colonias que morfológicamente pertenecen al género de <i>Cryptococcus</i> spp.	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Clasificación de los tipos de contaminantes que existen en el aire.	8
2. Clasificación taxonómica del género <i>Cryptococcus</i> según Fonseca <i>et al</i> en 2011.....	12
3. Clasificación de <i>C. neoformans</i> y <i>C. gattii</i> con sus respectivos serotipos y tipos moleculares.	12
4. Variedades de <i>C. neoformans</i>	15
5. Aislados de <i>Cryptococcus</i> spp. que se obtuvieron en los dos reservorios naturales (<i>Eucalyptus</i> spp. y <i>Columba</i> spp.), en tres medios de cultivo. <i>Elaboración propia</i>	40

1. INTRODUCCIÓN

Las sociedades contemporáneas enfrentan problemas ambientales de creciente complejidad, definidos por un sinnúmero de relaciones y variables que no siempre han sido interpretadas adecuadamente. Lo caótico, lo impredecible está presente en el universo, la naturaleza y la sociedad. Se considera que el nuevo paradigma de pensamiento debe tomar en cuenta las diversas dimensiones del objeto de estudio: sus aspectos físico, biológico, cultural y social; un paradigma que reconozca la interdependencia entre los diferentes elementos, el contexto del problema, su naturaleza compleja y la incertidumbre que plantea el constante cambio. Dentro de los problemas de complejidad organizada están incluidos los seres vivos, de manera individual, pero también los comportamientos gregarios de los mismos. Por ejemplo, desde el comportamiento de los microorganismos hasta el de los grupos y sociedades humanos (incluyendo la economía y la política) (Weaver, 1991).

En este contexto, el objeto de estudio de este trabajo es el género *Cryptococcus* spp. y sus asociaciones con reservorios naturales como son el eucalipto, el guano de las palomas y el aire, además del riesgo potencial de la población humana al interactuar con las levaduras patógenas de este género. El guano de las palomas trasmite hongos y otros microorganismos. Los más afectados pueden ser los niños, adultos mayores, personas infectadas por VIH, enfermos de cáncer y diabetes debido a que sus defensas están disminuidas. El mayor peligro lo constituye el contacto directo con los guanos y la inhalación de éstos en forma de polvo microscópico.

2. ANTECEDENTES

Actualmente, existe un incremento de problemas ambientales con creciente complejidad, debido a un sinnúmero de relaciones y variables no interpretadas adecuadamente, que influyen en la salud humana. Existen datos que muestran que, el 23% de las muertes que suceden en el mundo, están relacionadas con el medio ambiente, en donde las enfermedades respiratorias crónicas se encuentran entre las primeras cinco causas. Además, entre los factores de riesgo que están asociados al medio ambiente y que afectan la salud pública, se encuentran los agentes químicos, agua, saneamiento e higiene, entornos urbanizados, prácticas agrícolas, cambio climático y contaminación del aire, la exposición a estos factores puede darse en el hogar, lugar de trabajo y en la comunidad. (OMS, 2018).

2.1 Contaminación del aire

La contaminación es cualquier modificación no deseable del ambiente, que es causada por la existencia de agentes químicos, físicos o biológicos que se llegan a encontrar en cantidades superiores a las naturales y que pueden ser nocivas para la salud humana, dañan los recursos naturales e inclusive pueden alterar el equilibrio ecológico (Romero Placeres *et al.*, 2006).

Las emisiones generadas por el desarrollo de diversas actividades humanas constituyen un gran porcentaje de la contaminación del aire, (Encinas, 2011), las fuentes de contaminación están clasificadas principalmente en:

- **Fuentes fijas o estacionarias:** 1) las fuentes de emisiones son provocadas por la producción agrícola, la minería, entre otras, principalmente en zonas rurales; 2) las fuentes de emisiones son provocadas por industrias o por fuentes comunitarias como la calefacción

de viviendas y edificios, incineradores de residuos urbanos y lodos provenientes de aguas residuales, entre otros.

- **Fuentes móviles:** la fuente de emisión es provocada por todos los vehículos de combustión.
- **Fuentes de interiores:** la fuente de emisión es provocada por el consumo de cigarro, agentes biológicos que han sido transportados por el aire (polen, ácaros, moho, insectos, etc.), emisiones de materiales o sustancias usadas en interiores (compuestos volátiles, plomo, radón, asbesto, productos químicos sintéticos, etc.).

Asimismo, algunos autores han descrito los contaminantes del aire y los han clasificado con base en su origen, composición, tamaño o en función de su fuente de emisión (Tabla 1) (Encinas, 2011; Romero Placeres *et al.*, 2006):

Tabla 1. Clasificación de los tipos de contaminantes que existen en el aire.

Clasificación de los tipos de contaminantes		
Por su origen	Antropogénicos	Derivados de la actividad humana
	Naturales	Resultantes de procesos de la naturaleza.
Por su fuente de emisión	Primarios	Proceden directamente de la fuente
	Secundarios	Reacciones químicas entre contaminantes primarios o entre contaminantes primarios y constituyentes naturales.
Según su composición	Compuestos de C	Incluyen primarios CO y CO ₂ . No hay secundarios.
	Compuestos de S	Incluyen SO ₂ y H ₂ S como contaminantes primarios y SO ₃ , H ₂ SO ₄ y sulfatos metálicos como secundarios.
	Compuestos de N	Incluyen el óxido nitroso (N ₂ O), el nítrico (NO) y el NH ₃ como primarios y el NO ₂ , el NH ₄ ⁺ y los nitratos metálicos como secundarios.
	Aerosoles	Suspensión de partículas sólidas o líquidas en el aire, pueden tener diámetro entre 0.002 µm y 100 µm.

	Hidrocarburos (CH ₄)	Proceden de fuentes naturales de las cuáles implican procesos biológicos, pero también por actividades humanas relacionadas con el petróleo y sus derivados.
	Oxidantes fotoquímicos	El O ₃ estratosférico absorbe las letales radiaciones UV que nos llegan del sol, mientras que el O ₃ troposférico es un importante contaminante secundario.
Por su tamaño	PM _{2.5}	Pueden alcanzar las zonas periféricas de los bronquiolos.
	PM ₁₀	Pueden alojarse y penetrar profundamente dentro de pulmones.

2.1.1 Bioaerosoles

Dentro de los tipos de contaminantes del aire, están los aerosoles, que son partículas suspendidas en el aire de un diámetro entre 0.002-100 µm y dentro de estos, se encuentran los bioaerosoles, que son partículas de origen biológico con un diámetro entre 0.5-100 µm y pueden afectar a los seres humanos causándoles algún tipo de alergia, toxicidad o infección, y son adquiridos principalmente por inhalación. Las partículas de mayor importancia son las que presentan un tamaño inferior a 5 µm, ya que pueden alcanzar los alveolos pulmonares, y pueden causar daño (Figura 1) (Sánchez-Monedero *et al.*, 2006).

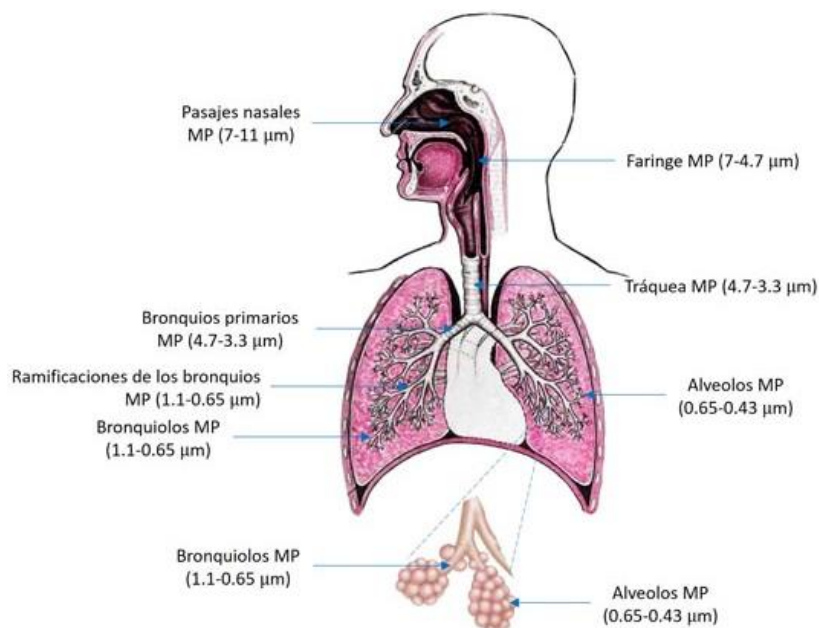


Figura 1. Penetración del material particulado en órganos del sistema respiratorio. Tomado de: CeMCAQ (2017).

La concentración, estabilidad y viabilidad de los bioaerosoles dependen de factores químicos, físicos y ambientales; los de mayor influencia son: contenido de agua en los microorganismos, humedad relativa del aire, temperatura y disponibilidad de oxígeno, así como otros factores propios de ambientes al aire libre, entre los que se encuentran la presencia de iones, radiación solar entre otros (Sánchez-Monedero *et al.*, 2006).

Sin embargo, Solé & Obiols (2005), mencionan que para que se produzca un bioaerosol es necesario que se den tres factores principales:

- a. **Presencia de un reservorio:** depende del organismo, ya que la mayor parte de las bacterias y ciertos hongos pueden vivir y desarrollarse en organismos vivos o sobre materia orgánica.
- b. **Proceso de amplificación:** aumento en número de los organismos o aumento en la concentración de sus partes o componentes. Sin este proceso la diseminación y dispersión no tendrían ningún efecto porque la cantidad de materia dispersada sería muy poca.

Aerosolización o diseminación: condicionado por varios factores como su arrastre provocado por el movimiento del aire, de las personas o de maquinaria.

2.2 Contaminación del aire y el género *Cryptococcus* spp.

Los contaminantes del aire incluyen partículas cultivables y no cultivables. Dentro de las no cultivables, se pueden encontrar fragmentos celulares de microorganismos, endotoxinas, entre otras, que pueden actuar como alérgenos. Mientras que en las partículas cultivables se incluyen bacterias, protozoos, virus y hongos, por ejemplo *Cryptococcus* spp.

En 1894, Busse y Buschke aislaron y describieron una levadura parecida a *Saccharomyces*, como un patógeno humano, más tarde Sanfelice informó sobre el aislamiento de una levadura similar, en la fermentación del jugo de durazno, que denominó *Saccharomyces neoformans*, sin embargo en 1901 Vuillemin cambió el nombre del organismo por *Cryptococcus neoformans* porque no producía ascosporas, que es una característica definitoria del género *Saccharomyces*, creándose de esta manera el género *Cryptococcus* (Srikanta *et al.*, 2014).

La clasificación taxonómica actual se muestra en la Tabla 2, este género alberga en total 70 especies distintas de hongos levaduriformes, entre las más importantes, como patógeno humano, están *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* correspondientes al estado anamorfo (fase de reproducción asexual), y las correspondientes a su estado teleomorfo (fase de reproducción sexual) *Filobasidiella neoformans* y *Filobasidiella bacillispora*, respectivamente (Fonseca, Boekhout, & Fell, 2011).

Tabla 2. Clasificación taxonómica del género *Cryptococcus* según Fonseca *et al* en 2011.

Clasificación taxonómica	
Reino	Fungi
Filo	Basidiomycota
Clase	Tremellomycetes
Orden	Tremelales
Familia	Tremellaceae
Género	Estado anamorfo: <i>Cryptococcus</i> Estado teleomorfo: <i>Filobasidiella</i>

Vuillemin (1901)

Dentro del género *Cryptococcus*, las especies más representativas son *C. neoformans* y *C. gattii* debido a su potencial de patogenicidad, con dos variedades, cinco serotipos y ocho tipos moleculares (Tabla 3) (Srikanta *et al.*, 2014).

Tabla 3. Clasificación de *C. neoformans* y *C. gattii* con sus respectivos serotipos y tipos moleculares.

Serotipo	Especies y variedades	Tipos moleculares
A	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VN I, VN II
B	<i>C. gattii</i>	VG I, VG II, VG III, VG IV
C	<i>C. gattii</i>	VG I, VG II, VG III, VG IV
D	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VN IV
AD	Hibridación de la <i>C. var. neoformans</i> y <i>var. grubii</i>	VN III

Las levaduras pertenecientes al género *Cryptococcus*, desarrollan colonias mucoides en medio sólido, con levaduras esféricas u ovoides cuyo diámetro varía de 5 a 10 μm , cada célula presenta una capsula de polisacáridos que es observada al microscopio con tinta china como un halo que la rodea (Figura 2) (Ramírez, 2007). *C. neoformans* es considerada la de mayor relevancia por su habilidad para causar enfermedades en los seres humanos seguida de *C. gattii*, además presenta otras especies como *C. albidus*, *C. laurentii*, *C. terreus* y *C. uniguttulatus* que forman parte de la microbiota de la piel y ocasionalmente ocasionan daño a la piel u onicomicosis (Ribas *et al.*, 2011).

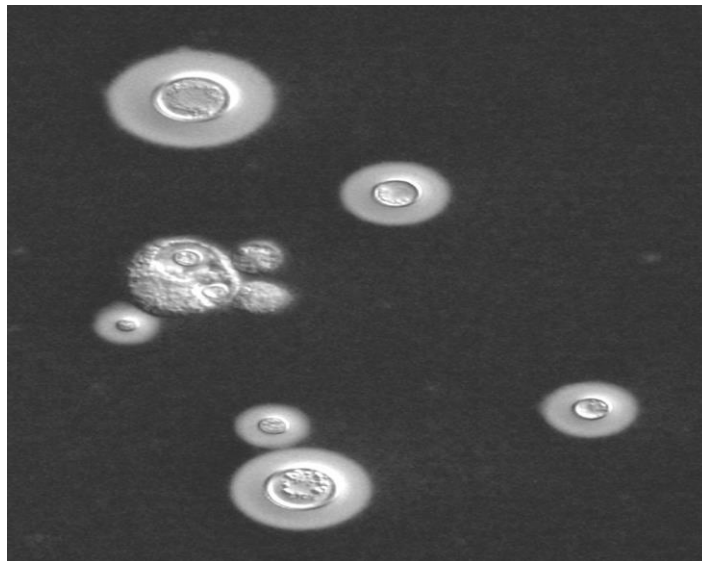


Figura 2. Micrografía de células de *Cryptococcus* teñidas con tinta china. La cápsula de polisacárido es visible como un halo refringente. Tomado de: McDonald *et al.*, 2012.

Las especies del género *Cryptococcus* habitan en el medio ambiente, sin embargo *C. neoformans* es abundante en excretas de aves, particularmente en excretas de palomas, mientras que *C. gattii* se ha asociado a árboles de eucalipto. La infección de los humanos ocurre cuando las esporas son inhaladas y se depositan en los alveolos para poder establecer una infección latente o inclusive diseminarse al sistema nervioso central; posterior a la diseminación en el individuo se pueden extraer células viables a partir del líquido

cefalorraquídeo y realizar un diagnóstico y un tratamiento adecuado (Figura 3) (Hull y Heitman, 2002).

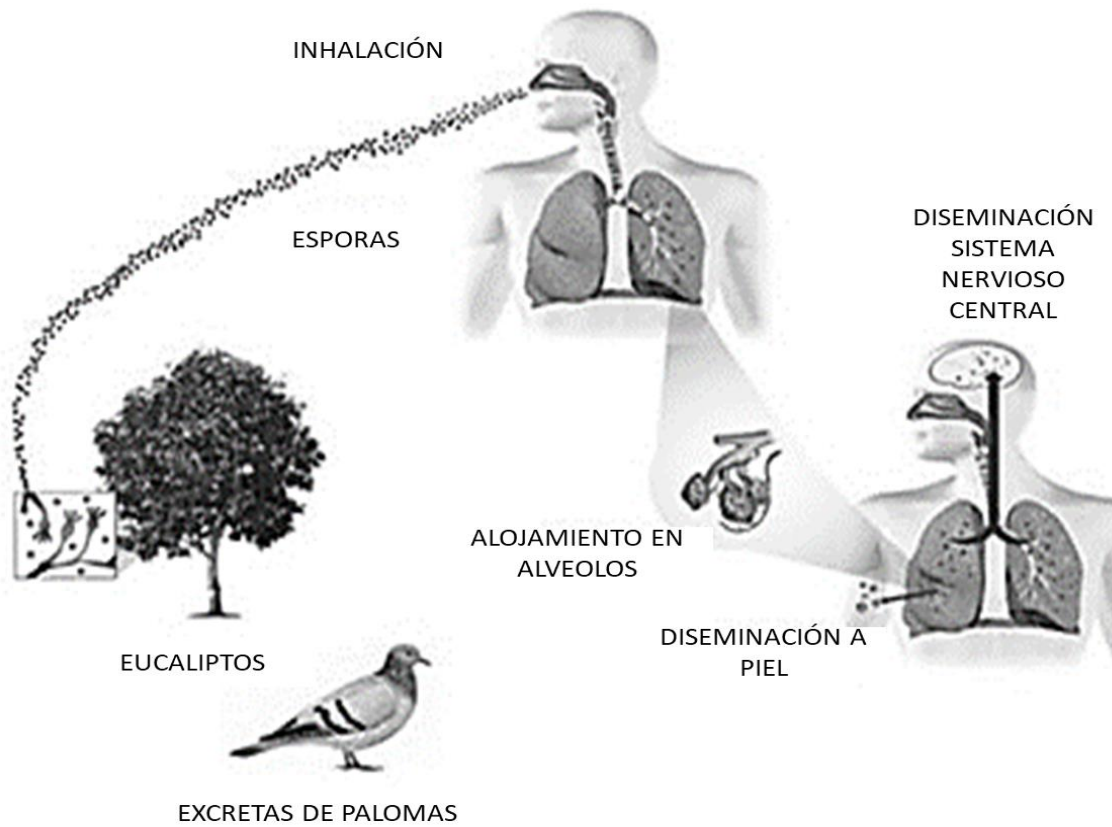


Figura 3. Mecanismo de infección de *Cryptococcus*. El hongo ingresa por las vías respiratorias, las fuentes de infección más conocidas son las excretas de palomas u otras aves y eucaliptos (*Eucalyptus camaldulenses* y *E. tereticornis*). Tomado de: Tello *et al.*, 2013.

2.2.1 *Cryptococcus neoformans*

El primer aislamiento ambiental de *C. neoformans* fue reportado por Sanfelice en 1894, en jugo de durazno, donde observó levaduras encapsuladas, un año después se demuestra por primera vez en seres humanos enfermos y hasta 1901, se clasificó dentro del género *Cryptococcus* sp. y como la especie *C. neoformans* (Curo *et al.*, 2005). *C. neoformans* produce levaduras redondas u ovals (3.5-8 μm), se reproducen por gemación única, su capsula de

polisacárido puede llegar a medir el doble del diámetro de la célula y es la que le confiere virulencia ya que protege al hongo de la fagocitosis (Ramírez, 2007). Esta especie presenta dos variaciones y tres serotipos (Tabla 1) (Curo *et al.*, 2005; Ramírez, 2007; Ribas *et al.*, 2011):

Tabla 4. Variedades de *C. neoformans*. Características principales de las dos variedades que presenta la especie de *C. neoformans*.

Variedades	Serotipo	Características	Reservorio ambiental	Huésped
<i>var. neoformans</i>	D	Colonias blancas o cremosas, lisas y mucoides.	Excretas de palomas, canarios y loros. Permanece viable por dos años.	Gran proporción de individuos inmunocomprometidos.
<i>var. grubii</i>	A		Excretas de aves, jugos de frutas que estén en proceso de fermentación, agua, madera, suelo y aire.	Individuos sanos e inmunocomprometidos.
De la hibridación de la <i>C. var. neoformans</i> y <i>var. grubii</i> forman el serotipo AD.				

La especie *Cryptococcus neoformans* presenta sensibilidad antifúngica a ciertos antimicóticos, entre ellos se han reportado la sensibilidad a la anfotericina B, nistatina, ketoconazol, voriconazol y clotrimazol, cabe destacar que los antimicóticos itraconazol y fluconazol en algunas cepas presentan sensibilidad y en otras resistencia (Alvarez *et al.*, 2010; Huamán *et al.*, 2018).

2.2.2 *Cryptococcus gattii*

La especie *C. neoformans* y *C. gattii* están genéticamente relacionadas, sin embargo, *C. gattii* fue reconocida como una especie distinta de *C. neoformans* debido a la diferencias morfológica de sus basidiósporas, nichos ambientales,

características morfológicas *in vivo*, su identidad molecular limitada (55%-61% de relación con el ADN), múltiples genealogías genéticas patrones de tipificación de ADN polimórficos amplificados al azar únicos y apareamiento ineficaz de especies cruzadas con la producción de progeñe estéril y sin recombinación (Kwon-Chung *et al.*, 2002; Springer y Chaturvedi, 2010; Srikanta *et al.*, 2014).

El primer aislamiento de *C. gattii* fue por Ellis y Pfeiffer (1990) en Australia en muestras corteza, hojas y restos vegetales depositados en la rizosfera del árbol en época de floración de *Eucalyptus camaldulenses*, posteriormente se identificó esta especie en muestras del mismo árbol en Estados Unidos de América (California), México, Italia e India. De esta manera se formula la hipótesis de que esta especie fue exportada de Australia a otros países probablemente por semillas infectadas o por plantas jóvenes de *Eucalyptus spp.* (Licea *et al.*, 1999; Quintero *et al.*, 2005). *C. gattii* presenta el serotipo B y C y es conocida por su tendencia a producir levaduras de formas atípicas (alargadas) junto con sus células redondeadas, esto es cuando se cultiva a 25° C y se observa en un aislamiento primario mientras que su temperatura optima es de 32° C también llega a tolerar hasta una temperatura de 37° C (Ramírez, 2007).

La distribución de esta especie, solo estaba restringida a regiones tropicales y subtropicales, sin embargo, un estudio reveló un brote de criptococosis en la ciudad de Vancouver, Canadá, lo que llevo a lograr notar la presencia de, al menos el serotipo B, en regiones templadas (Escandón *et al.*, 2005; Kidd *et al.*, 2004).

2.2.3 Reservorios ambientales de *Cryptococcus spp.*

La palabra reservorio, con origen en el vocablo francés *réservoirs*, se refiere a un conjunto de organismos vivos que posee el germen de una cierta enfermedad, en muchas ocasiones quien lo hospeda no resulta afectado por la

enfermedad, a este último se le conoce como reservorio natural (Posada de la Paz *et al.*, 2018).

Mientras que, un reservorio ambiental es cualquier animal, humano, planta o suelo en donde normalmente vive un agente infeccioso, del que depende para su supervivencia, y donde se reproduce de manera que pueda ser transmitido a un hospedero susceptible (OMS, 2018).

La especie *C. neoformans* sobrevive como comensal en animales, principalmente en palomas, las cuales actúan como reservorios naturales debido a que están protegidas de la infección por su elevada temperatura corporal que oscila de los 41.5° a 43.3° C. y por la microbiota bacteriana del contenido intestinal aparentemente sano que inhibe su desarrollo (Alvarez *et al.*, 2010; Ribas *et al.*, 2011; Vallejo *et al.*, 2016). Por lo cual, se ha identificado y asociado a las deyecciones de estas aves principalmente por el acúmulo de heces debido a que proporciona sustancias nutritivas como el nitrógeno, que es la fuente primordial para la supervivencia del hongo en la naturaleza (Curo *et al.*, 2005), además, de estar presentes compuestos como xantina, creatinina, urea y ácido úrico (Vallejo *et al.*, 2016; Huamán *et al.*, 2018).

En el caso de la especie de *C. gattii* el serotipo B se ha aislado principalmente de especies del género *Eucalyptus*, como *E. camaldulenses* y *E. tereticornis*, *E. gomphocephala* (Ramírez, 2007), sin embargo, también se ha asociado en huecos de algunos árboles como *Licania spp.*, *Acacia spp.*, *Ficus spp.*, *Pinus spp.*, *Abies spp.* y *Cedrus spp.*, estos huecos difieren en su composición bioquímica, los nutrientes disponibles, la presencia de agua, las comunidades microbianas y la asociación de otros hongos, en cuanto al serotipo C, únicamente se ha encontrado en detritos de almendros (*Terminalia spp.*) (Castañeda y Castañeda, 2001; Escandón *et al.*, 2005; Ramírez, 2007; Springer y Chaturvedi, 2010; Teodoro *et al.*, 2013).

Otros reservorios reportados han sido el aire, suelos contaminados con excretas, hojas, flores y polen de plantas ornamentales como: pino, acacia, jacaranda y tilo (Curo *et al.*, 2005; Duncan *et al.*, 2006).



Figura 4. Principales reservorios ambientales de *Cryptococcus spp.* **A:** Las excretas de las palomas (*Columba sp.*) están asociadas la especie *Cryptococcus neoformans* y **B:** los árboles de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) a la especie *Cryptococcus gattii*. *Elaboración propia.*

2.3 Criptococosis

La enfermedad causada por los hongos *C. neoformans* y *C. gattii* es denominada criptococosis, la cual es considerada una micosis sistémica aguda o crónica oportunista que presenta una predilección por el sistema nervioso central. Particularmente, *C. neoformans* puede causar enfermedad grave y provocar la muerte, especialmente en personas inmunosuprimidas y en animales (Alvarez *et al.*, 2010; Ribas *et al.*, 2011; Vallejo *et al.*, 2016; Huamán *et al.*, 2018). Mientras que *C. gattii*, puede infectar tanto individuos

inmunosuprimidos como individuos inmunocompetentes, además, se ha evidenciado que estos hongos presentan menor sensibilidad a los antifúngicos, por lo que se requiere tratamientos más agresivos (Fang *et al.*, 2015; Spina-Tensini *et al.*, 2017).

En la actualidad esta micosis se considera como una de las tres infecciones oportunistas más importantes, que pueden conducir a la muerte a pacientes inmunocomprometidos convirtiéndose en la causa más importante de morbilidad y mortalidad (Vallejo *et al.*, 2016).

La vía de infección es mediante la inhalación de esporas que entran por el tracto respiratorio almacenándose en los pulmones y provocando primeramente una infección pulmonar primaria, sin embargo, frecuentemente se llega a diseminar a través de la vía hematológica, afectando principalmente al sistema nervioso central (en más del 50% de los casos), además ha sido reportado en piel, ganglios linfáticos, huesos, ojos, corazón, hígado, bazo, riñones, tiroides e incluso la próstata como reservorios para la recurrencia de esta enfermedad (Álvarez *et al.*, 2001; Ribas *et al.*, 2011).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según la OMS (2018), la salud ambiental está relacionada con todos los factores físicos, químicos y biológicos externos de una persona, es decir, engloba factores ambientales que podrían incidir en la salud humana. Muchos hongos forman parte de los bioaerosoles en el medio ambiente, pueden utilizar como reservorios, plantas y animales y su interacción con el ser humano, principalmente individuos inmunosuprimidos, puede causar problemas de salud. Particularmente, se ha reportado que especies del género *Cryptococcus* utiliza a árboles de eucalipto, excretas de paloma, el suelo y el aire como reservorios ambientales. En México existe poca información sobre sus reservorios ambientales, su ecología y su participación con la salud humana y animal, por lo que es necesario e importante un estudio que aporte datos sobre estos aspectos, por lo que el presente trabajo, está orientado a identificar la distribución ambiental y la relación de las especies de *Cryptococcus* con sus reservorios ambientales (*Columba spp.* y *Eucalyptus spp.*) además de su posible impacto en la salud de los individuos potencialmente infectados, en dos áreas del municipio de Puebla.

4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Se encuentran presentes especies del género *Cryptococcus* en los reservorios ambientales (*Columba spp.* y *Eucalyptus spp.*) en el municipio de Puebla?

¿Existen diferentes especies del género *Cryptococcus* en sus reservorios ambientales, como excretas de palomas y arboles de eucalipto?

¿Cuál es la relación entre las especies del género *Cryptococcus*, sus reservorios y la salud humana?

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Conocer la distribución ambiental del género *Cryptococcus* en reservorios ambientales (guano de *Columba* spp., *Eucalyptus* spp.) y su potencial impacto en la salud pública del municipio de Puebla.

5.2 Objetivos particulares

Establecer la presencia de especies del género *Cryptococcus* en dos sistemas biológicos (centro y ciudad universitaria) del municipio de Puebla.

Aislar e identificar las especies del género *Cryptococcus* y sus variedades a partir de muestras de guano de palomas (*Columbia* spp.) y de árboles de eucalipto (*Eucalyptus* spp.).

Recopilar información sobre la relación de la salud pública, reservorios ambientales y especies del género *Cryptococcus*.

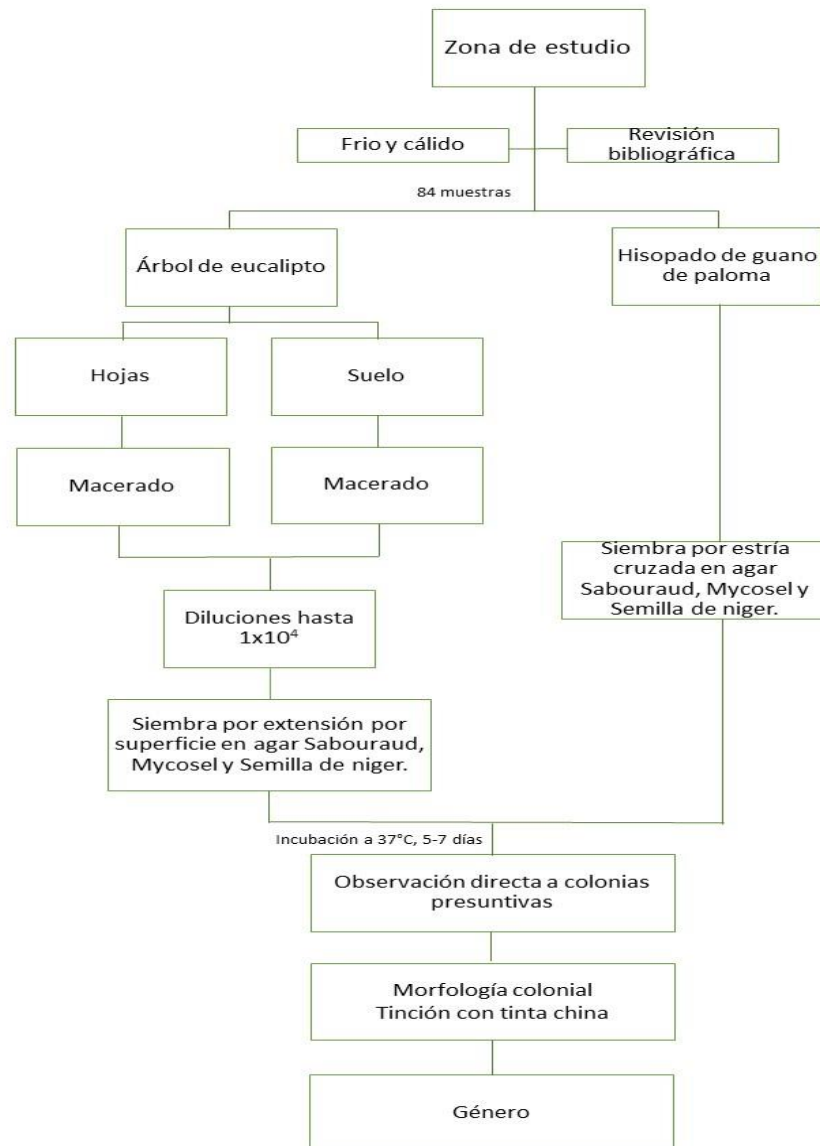
6. HIPÓTESIS

Existe una asociación entre las especies del género *Cryptococcus* y sus dos reservorios ambientales con la salud de las personas en dos sitios en el municipio de Puebla.

7. JUSTIFICACIÓN

La investigación de los reservorios ambientales de *Cryptococcus spp.* y su asociación con el riesgo a la salud humana ha sido poco estudiada en México, los resultados de este trabajo aportaran datos epidemiológicos de *Cryptococcus spp.* relacionados con su distribución en reservorios ambientales en el municipio de Puebla. Así como, información útil para alertar a las autoridades sanitarias, sobre la implementación de medidas de prevención, métodos diagnósticos certeros para un tratamiento oportuno, así como, el manejo y eliminación del hongo de suelos contaminados con guanos de palomas, además, dentro de los aportes científicos implican brindar conocimientos pioneros sobre *Cryptococcus spp.* en Puebla

8. METODOLOGIA



8.1 Área de estudio

El presente estudio fue de tipo exploratorio transversal descriptivo y se llevó a cabo en dos áreas dentro del municipio de Puebla: Área 1) Centro Histórico de la Ciudad, a través de un muestreo por conveniencia, donde se seleccionaron dos zonas, consideradas de alta interacción entre las personas: Parque de Dolores y el Parque del Carmen (Figura 5); Área 2) Ciudad Universitaria (BUAP), en la cual se realizó un muestreo aleatorio estratificado, se seleccionaron distintos árboles ubicados en distintos sitios de Ciudad Universitaria donde se observó la presencia de estudiantes (Figura 6).



Figura 5. Sitios del Centro Histórico de la Ciudad. Se realizaron las tomas de muestras de guano de paloma. *Elaboración propia.*



Figura 6 Sitios dentro de Ciudad Universitaria. Se recolectaron muestras de árboles de eucalipto. *Elaboración propia.*

8.2 Recolección de muestras

Se recolectaron 48 muestras de hojas y suelo de árbol de eucalipto (Figura 7A) en Ciudad Universitaria de la BUAP y 48 muestras de hisopados de guano de palomas (Figura 7B) en el Centro Histórico de la Ciudad.

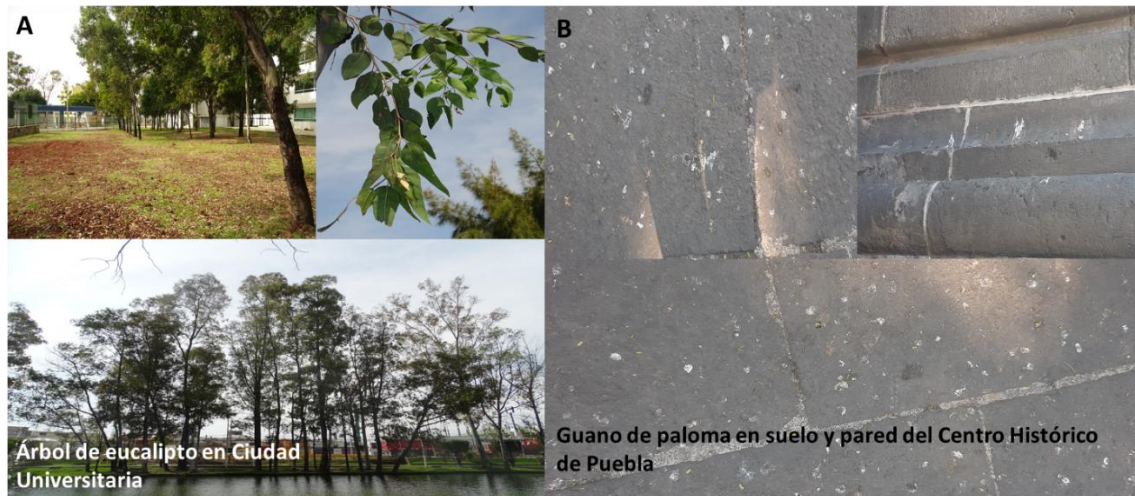


Figura 7. Muestras de hojas de *Eucalyptus* spp. y guano de *Columba* spp. (A) Árboles de eucalipto que se encuentran en Ciudad Universitaria. (B) guano de paloma que se encuentran en los suelos y paredes del Centro Histórico de la Ciudad. *Elaboración propia.*

8.2.1 Árboles de *Eucalyptus* spp.

De cada árbol seleccionado dentro de Ciudad Universitaria se tomaron 10 hojas juveniles de distintas ramas y 100 gramos de muestra de suelo sin hojarasca de la rizosfera con una pala de jardinería, cada muestra se guardó en bolsas de polietileno individualmente y fueron etiquetadas con número de identificación para su traslado al laboratorio.

8.2.2 Guano de *Columba* spp.

En los sitios del Centro Histórico se tomaron hisopados de guano de las palomas localizadas en suelo, bancas de metal o jardineras que se encuentran en el sitio utilizando el medio de transporte Stuart (Figura 9), el cual consiste en tomar la muestra, frotando un hisopo que posteriormente es colocado dentro de

un tubo de vidrio, que contiene en el fondo un medio de agar sin ningún tipo de nutrientes para conservar la muestra sin modificarla hasta su procesamiento en el laboratorio.



Figura 8. Medio de transporte para muestras de guano de *Columba* spp. Muestra de guano de paloma obtenida por hisopado, colocadas en medio de transporte de Stuart. *Elaboración propia.*

8.3 Procesamiento de muestras

Todas las muestras fueron procesadas e identificadas en el laboratorio de Micología 1, del Centro de Investigaciones Microbiológicas del ICUAP.

8.3.1 Árboles de *Eucalyptus* spp.

Se pesó 1 gr de cada muestra de hojas, luego se colocó en un mortero y se agregaron 10 ml. de agua purificada para macerar la muestra, obteniendo una dilución p/v de 1:10. Enseguida, se tomó 1 ml. de la muestra y fue colocado en un tubo de ensayo con 9 ml. de agua, obteniendo una dilución 1:100, se repitió este proceso hasta obtener una dilución 1:10000.

Para cada muestra de suelo, se pesaron 100 gr., y cada muestra fue tamizada cuidadosamente, posteriormente se pesó 1 gr. de cada muestra y fue colocado en un mortero con 10 ml. de agua purificada convirtiéndose en una dilución p/v 1:10, para después tomar 1 ml. y colocarlo en un tubo de ensayo con 9 ml. de agua purificada obteniendo una dilución 1:100, se repitió este proceso hasta obtener una dilución 1:10000.

De las diluciones 1:1000 y 1:10000, de cada muestra de hojas y suelo, se tomaron 500 μ l y fueron colocados en el centro de cajas de Petri conteniendo medios, agar dextrosa Sabouraud, Mycosel y semilla de niger, y fueron

extendidos en la superficie de la placa. Enseguida, las cajas de Petri fueron incubadas a 37° C, durante cinco a siete días hasta observar desarrollo de colonias.

8.3.2 Guano de *Columba* spp.

Las muestras de excretas de palomas fueron sembradas mediante estría cruzada en cajas de Petri con agar dextrosa Sabouraud, Mycosel y semilla de niger, directamente con el hisopo, conteniendo la muestra en medio de transporte Stuart. Todas las cajas fueron incubadas a 37° C, durante cinco a siete días hasta observar desarrollo de colonias.

8.4 Caracterización e identificación taxonómica

Después de la incubación a 37 °C de todas las muestras, se identificaron las colonias presuntivas de *Cryptococcus* spp. Con base en las características coloniales, se realizó una prueba presuntiva, a través de la observación microscópica de cada muestra, con azul de algodón para comprobar que las colonias eran de levaduras. Una vez comprobado que se trataba de levaduras, se realizó una caracterización macroscópica colonial considerando, el color de la colonia, su forma, tamaño, consistencia, elevación y margen. Asimismo, se observaron las características microscópicas, a través de la utilización de tinta china, para evidenciar la cápsula de polisacárido característica de estas levaduras.

Con base en los resultados y auxiliados por el libro *The Yeast: A Taxonomic Study* de Kurtzman, Fell y Boekhout del 2010 se podrá llegar a una identificación taxonómica.

9. RESULTADOS

9.1 Árboles de *Eucalyptus* spp.

Se realizó una georreferenciación para poder conocer la cantidad y ubicación de los individuos de árboles de *Eucalyptus* spp. presentes dentro de Ciudad Universitaria, obteniendo un total de 968 individuos (Figura 9).

Distribución de los arboles de eucalipto ubicados dentro de Ciudad Universitaria

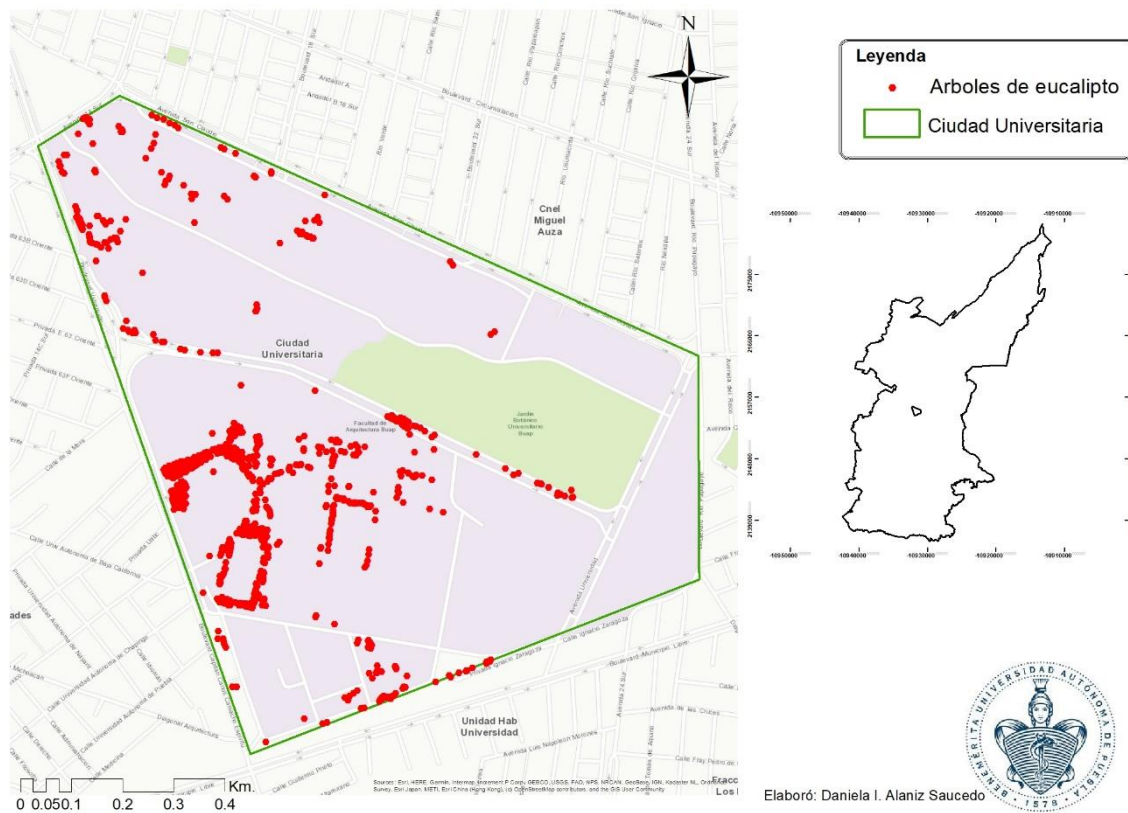


Figura 9. Mapa de la distribución de los individuos de árboles de eucalipto ubicados dentro de Ciudad Universitaria. *Elaboración propia.*

Al momento de realizar la georreferenciación de todos los árboles se logró observar que al menos el 90% de los árboles dentro de Ciudad Universitaria

contaban con una plaga en casi todas sus hojas. Al ser llevadas al laboratorio, se observó que las hojas presentan una cápsula cristalina pegajosa y en el interior de ésta un animal muy pequeño; de acuerdo a la bibliografía consultada, identificamos que estas estructuras pertenecen a un artrópodo psilido llamado *Glycaspis brimblecombei* Moore el cual es una plaga muy común que se presenta en los árboles de eucalipto, esta cápsula cristalina es la pupa de las ninfas de esta especie, que posteriormente pasan a ser un individuo adulto (Figura 10).



Figura 10. Árboles de *Eucalyptus* spp. infestados con plaga. **A)** hojas del árbol eucalipto infestadas con plaga, **B)** Psilido *Glycaspis brimblecombei* Moore adulto sobre hojas de eucalipto, **C)** pupas de las ninfas del psilido, **D)** acercamiento a la ninfa y la cápsula que forman para realizar la metamorfosis sencilla del psilido.

Como se puede observar en la Figura 11, las cajas de Petri con las muestras de las hojas adultas sembradas son las que presentan mayor presencia de crecimiento, con 148 UFC, en comparación con las imágenes de las cajas Petri con las muestras de las hojas jóvenes donde se observa la presencia de 316 UFC, al realizar la observación microscópica de las UFC, encontramos que la mayoría de ellas correspondían a bacterias, mientras que algunas pertenecen al género levaduriforme *Rhodotorula* y el resto a hongos filamentosos (Figura 11).

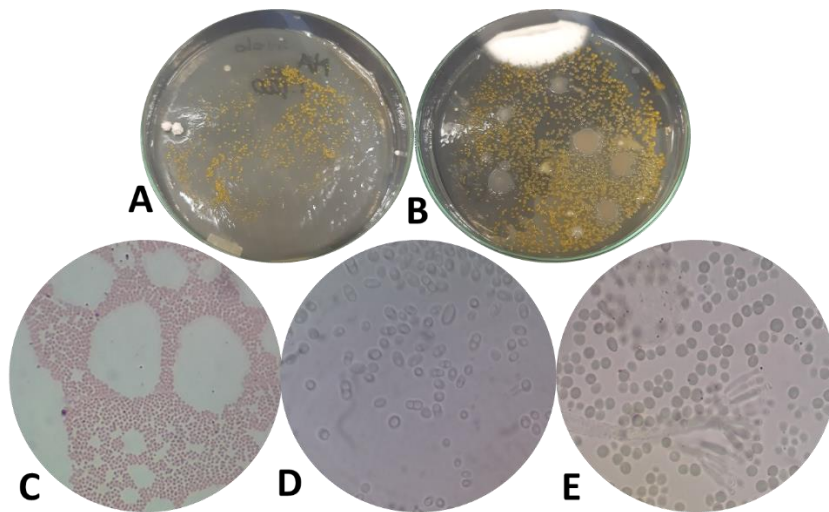


Figura 11. Muestras de las hojas adultas de *Eucalyptus* spp sembradas en cajas de Petri. **A)** Cajas con muestras de hojas adultas con menor presencia de UFC, **B)** Cajas con muestras de hojas jóvenes con mayor presencia de UFC, **C)** Bacterias del grupo bacilos Gram (-) encontradas en las muestras de hojas jóvenes y adultas, **D)** Células levaduriformes encontradas en las muestras de hojas jóvenes y adultas, **E)** Hongos filamentosos encontrados en las muestras de hojas jóvenes y adultas. *Elaboración propia.*

Con base en los resultados de las UFC, se eligieron las hojas jóvenes de los árboles de eucalipto, para determinar la presencia de especies del género *Cryptococcus* en los siguientes muestreos (Figura 12).

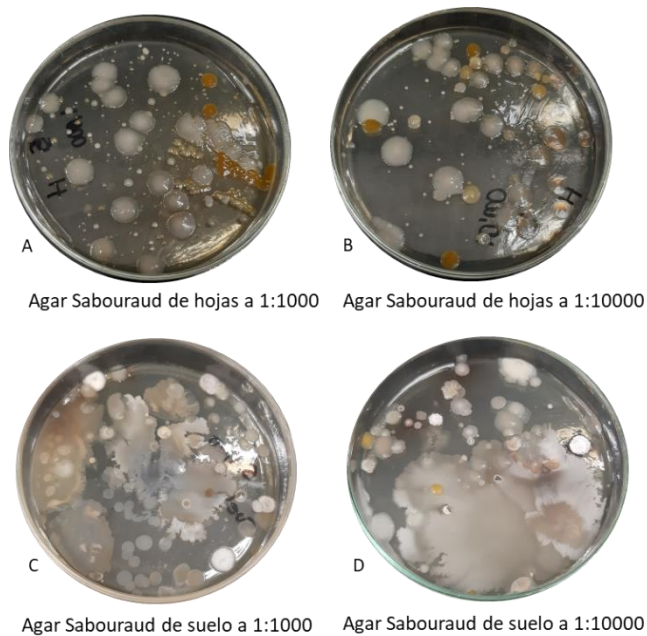


Figura 12. Muestras de suelo y hojas sembradas en cajas de Petri con agar Sabouraud, correspondientes a las diluciones 1:1000 y 1:10000. *Elaboración propia.*

Al realizar la comparación entre las diluciones, se observó que el medio de cultivo agar Sabouraud, fue el que presentó un mayor número de UFC, (79 UFC en la dilución 1:1,000 y 32 UFC en la dilución 1:10,000) en las muestras de hojas, mientras que en las muestras de suelo, se obtuvieron 113 UFC en la dilución 1:1,000 y 87 UFC en la dilución 1:10,000. Las muestras de hojas y de suelo, sembradas en cajas de Petri con agar Mycosel, no presentaron desarrollo de ninguna colonia (Figura 13).

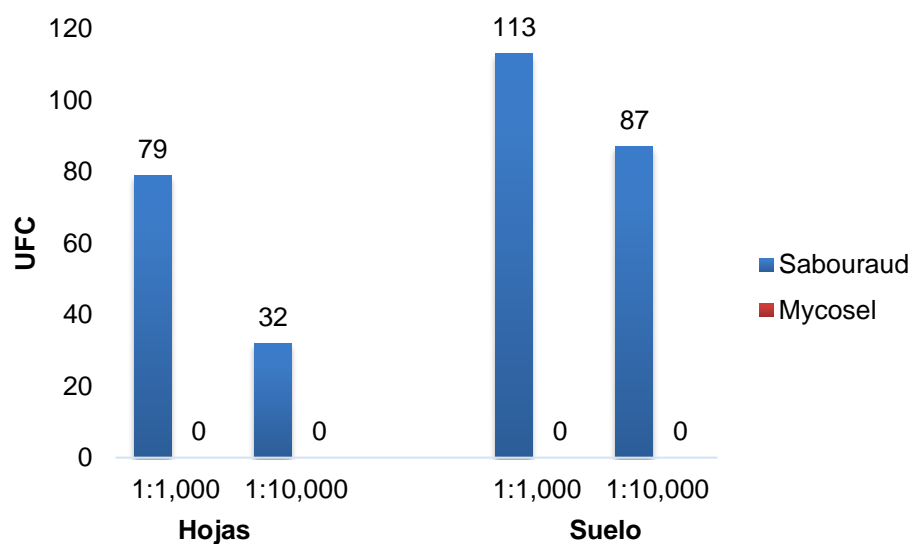


Figura 13. UFC obtenidas de las muestras de hojas y suelos sembradas en Sabouraud y Mycosel. Se cuantificaron de las UFC, obtenidas de las muestras de hojas y suelos sembradas en Sabouraud y Mycosel utilizando las diluciones 1:1,000 y 1:10,000. *Elaboración propia.*

Los microorganismos identificados en estas muestras de hojas y suelo de los árboles de eucalipto, obtenidos en agar Sabouraud, fueron las bacterias, en las muestras de hojas fue de 100%, mientras que en las muestras de suelo se obtuvo un 38%. Los hongos filamentosos tuvieron más presencia en las muestras de suelo con 73%, en comparación con las muestras de hojas con 53% y por último, las levaduras fueron las que presentaron la menor presencia (33% en las muestras de hojas y 50% en las muestras de suelo). Cabe destacar, que tanto en el medio agar Sabouraud como en Mycosel, no se aisló ninguna colonia perteneciente al género *Cryptococcus* (Figura 14).

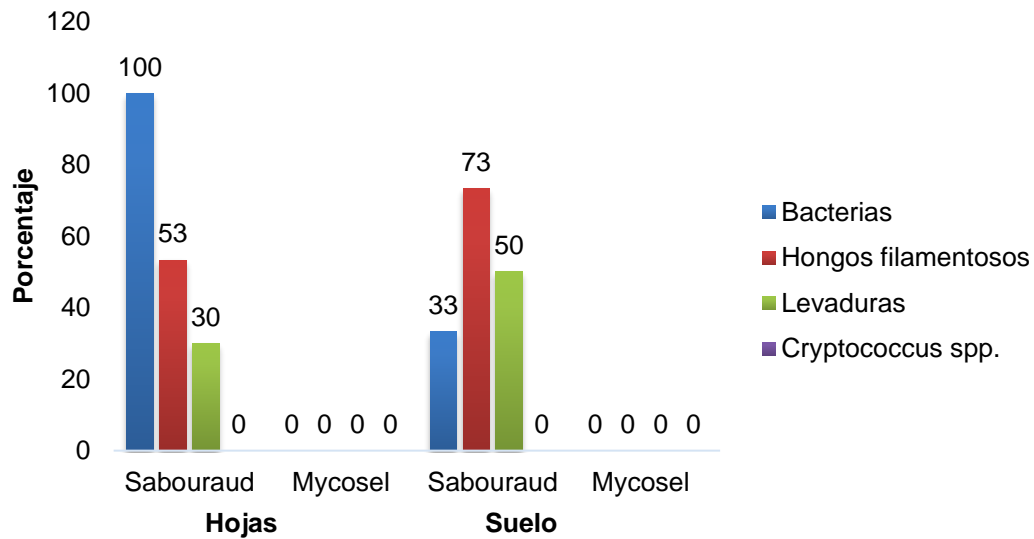


Figura 14 Porcentaje de cada grupo de microorganismos identificados en medio agar Sabouraud y Mycosel. *Elaboración propia.*

El agar semilla de niger (agar *Guizotia abyssinica*) es considerado un excelente medio diferencial para el aislamiento primario, separación inmediata e identificación presuntiva de colonias pertenecientes al grupo de *Cryptococcus* spp., particularmente para especies de *C. neoformans* sin embargo varios autores han observado que otras especies de *Cryptococcus*, son capaces de crecer en este medio selectivo sobre otros grupos de microorganismos (Oh y Hwang, 2005; Teodoro *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2016; Pakshir *et al.*, 2018). Por esta razón, y con base en los resultados negativos que se obtuvieron, se tomó la decisión de utilizar además de agar Sabouraud y Mycosell el agar selectivo semilla de niger.

De las nuevas muestras recolectadas de suelo y hojas de árbol de eucalipto el agar Sabouraud fue en donde se presentaron un mayor crecimiento de colonias sobre las muestras de suelo (354 UFC en la dilución 1:1,000 y 217 UFC en la dilución 1:10,000 y 245 UFC en la dilución 1:1,000 y 172 UFC de la dilución 1:10,000, respectivamente); mientras que en el caso del agar Mycosel sólo se presentaron UFC en las muestras de suelo (146 UFC en la dilución 1:1,000 y 28

UFC en la dilución 1:10,000) y por último en agar semilla de niger, las muestras de suelo fueron la que presentaron mayor crecimiento de UFC (61 UFC en la dilución 1:1,000 y 38 UFC en la dilución 1:10,000) en comparación con las muestras de hojas (8 UFC en la dilución 1:1,000 y 1 UFC en la dilución 1:10,000) (Figura 16).

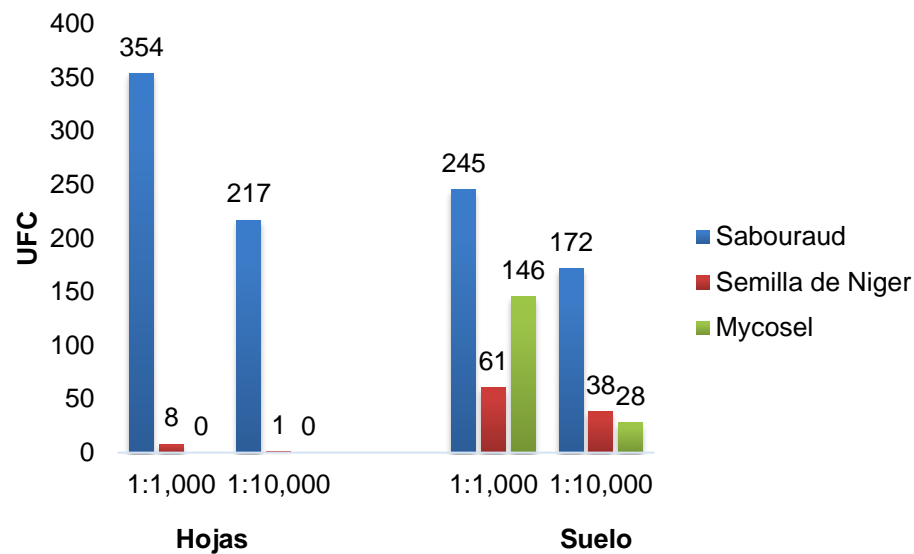


Figura 15. UFC obtenidas de las muestras de suelo y hojas de árbol de eucalipto en tres medios de cultivo, utilizando las diluciones 1:1,000 y 1:10,000. *Elaboración propia.*

En cuanto a los grupos de microorganismos que se encontraron aislados de las muestras de suelo y hojas de árbol de eucalipto fueron los grupos bacterianos y los hongos filamentosos los que predominaron en agar Sabouraud (100%) seguido de las levaduras (68% en las muestras de hojas y 86% en las muestras de suelo), mientras que en agar Mycosel para las muestras de hojas se representaron mayormente las levaduras en un 45%, seguido por los grupos bacterianos (36%), al igual que en las muestras de suelo en donde mayormente se presentaron las levaduras en un 55%, seguido de los hongos filamentosos (36%) y por último los grupos bacterianos (14%). Por último, en el agar Semilla de niger tanto para las muestras de hojas y suelo solo hubo presencia de

hongos filamentosos. Cabe destacar que hasta el momento no se ha logrado aislar colonias pertenecientes a *Cryptococcus* spp (Figura 16).

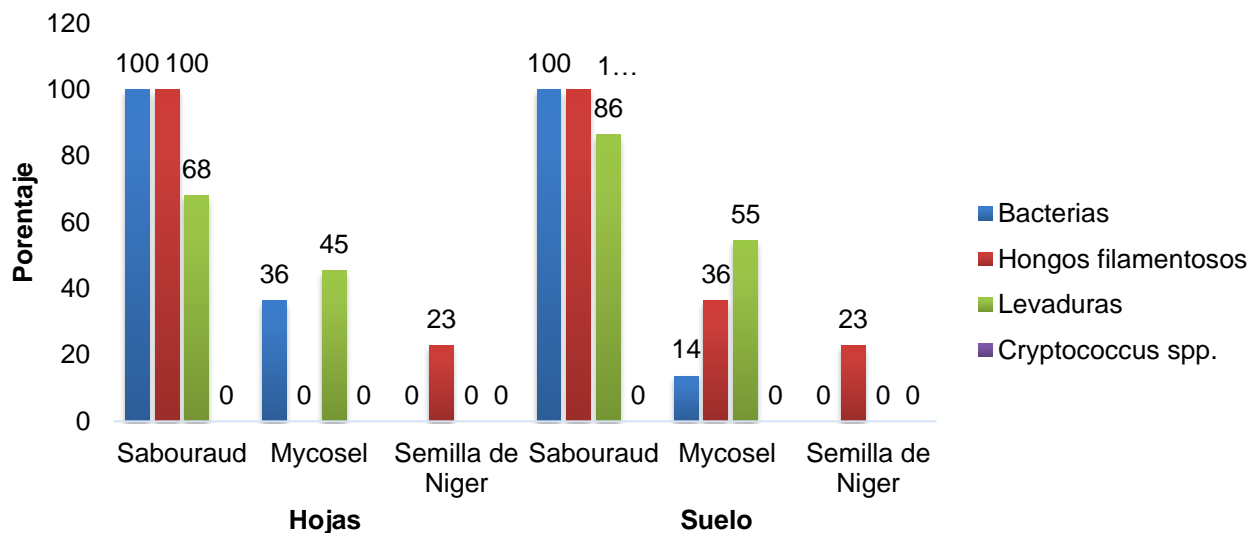


Figura 16. Porcentaje de cada grupo de microorganismos identificados en los tres medios de cultivo utilizados, desarrollados a partir de las muestras de hojas de eucalipto y de suelo. *Elaboración propia.*

9.2 Guano de *Columba* spp.

Las muestras de guano de paloma fueron directamente sembradas en tres medios de cultivo, Sabouraud, Mycosel y semilla de niger (Figura 17). Las muestras de guano de paloma obtenidas del Parque de Dolores sembradas en agar Sabouraud y semilla de niger desarrollaron 592 UFC y 370 UFC, respectivamente, mientras que en las cajas de agar Mycosel se desarrolló una menor cantidad de UFC (218); en las muestras obtenidas del Parque del Carmen, sembradas en agar Sabouraud y semilla de niger, se 521 UFC y 244 UFC, respectivamente, mientras que en agar Mycosel la cantidad fue de 48 UFC (Figura 18).

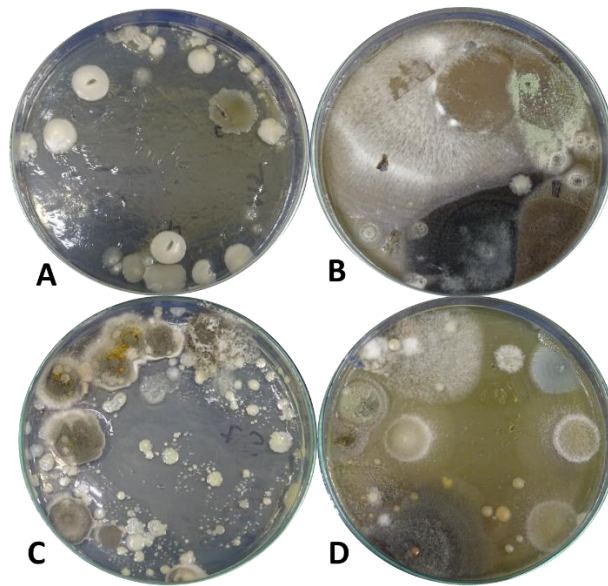


Figura 17. Muestras de excretas de paloma después de siete días de incubación. **A)** Agar Sabouraud con crecimiento de bacterias y levaduras; **B)** agar semilla de niger con crecimiento, principalmente de hongos filamentosos; **C)** agar Sabouraud con crecimiento de bacterias y hongos filamentosos; **D)** agar semilla de niger con crecimiento hongos filamentosos y levaduras. *Elaboración propia.*

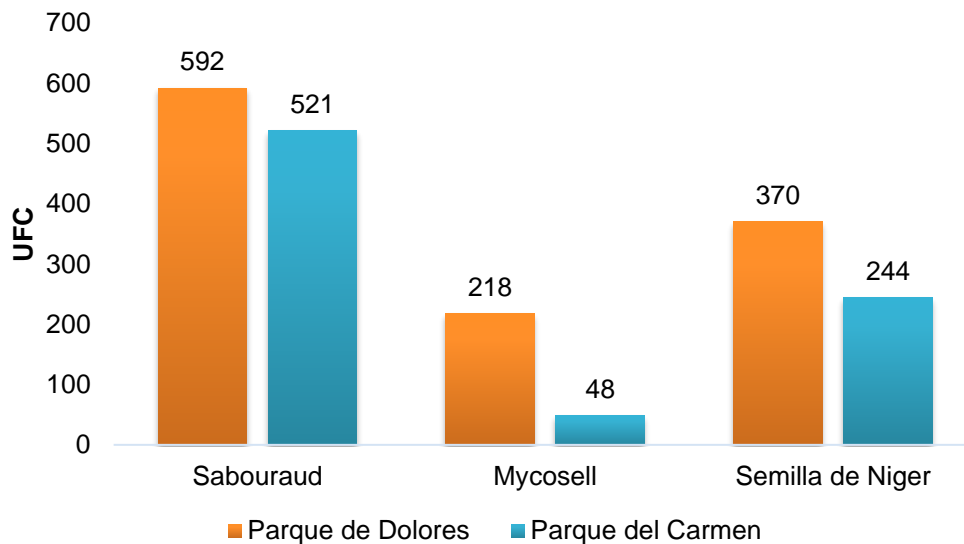


Figura 18. UFC identificadas en las 22 muestras de guano de paloma recolectadas en Parque de Dolores y 22 muestras del Parque del Carmen, sembradas en los tres medios utilizados: Sabouraud, Semilla de niger y Mycosel. *Elaboración propia.*

Después del periodo de incubación de las muestras de excretas de paloma, se identificaron colonias de hongos filamentosos, bacterias y levaduras, posteriormente, la observación microscópica de las colonias permitió evidenciar colonias presuntivas de *Cryptococcus* spp. En el medio agar Sabouraud, se desarrollaron bacterias y hongos filamentosos (100%), mientras que sólo en un 52%, se observó la presencia de levaduras y un 11% correspondieron a *Cryptococcus* spp. En el medio agar semilla de niger, sólo se desarrollaron hongos filamentosos, en un 30% y *Cryptococcus* spp. en un 25%, del total de las muestras obtenidas, cabe mencionar que bacterias y otras levaduras no crecieron en este medio. Por último, el agar Mycosel fue el que presentó un menor crecimiento de microorganismos, el grupo bacteriano con un 30% y el grupo levaduriforme con 18% (Figura 19).

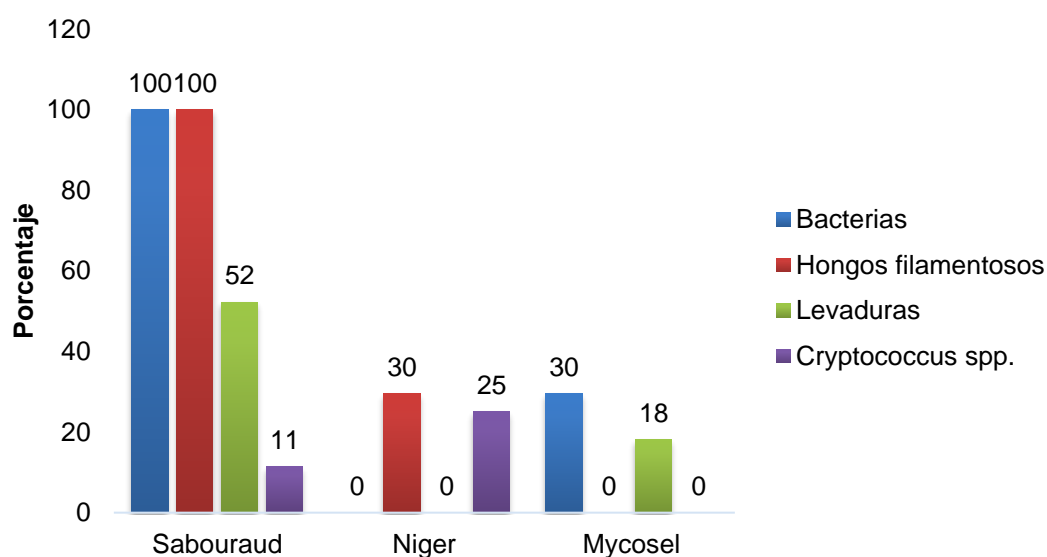


Figura 19. Porcentaje de cada grupo de microorganismos identificados en los tres medios de cultivo utilizados, desarrollados a partir de muestras de guano de paloma. *Elaboración propia.*

9.3 Caracterización de *Cryptococcus* spp.

En total se procesaron un total de 144 muestras para lograr aislar alguna especie de *Cryptococcus* spp. (Árbol de *Eucalyptus* spp.: 48 muestras de hojas

y 48 muestras de suelo y Guano de *Columba* spp.: 48 hisopados) de los cuales solo en guano de *Columba* spp se obtuvieron aislados del género *Cryptococcus* en los agares de Sabouraud y Semilla de niger, ocho y 14 aislamientos respectivamente.

Tabla 5. Aislados de *Cryptococcus* spp. que se obtuvieron en los dos reservorios naturales (*Eucalyptus* spp. y *Columba* spp.), en tres medios de cultivo. *Elaboración propia.*

Aislamiento de <i>Cryptococcus</i> spp. en sus reservorios ambientales			
	Arboles de <i>Eucalyptus</i> spp.		Guano de <i>Columba</i> spp.
	Hojas	Suelo	
Agar Sabouraud	0	0	8
Agar Mycosel	0	0	0
Agar semilla de niger	0	0	14
Total de aislamientos	0	0	22

Los aislados presuntivos de *Cryptococcus* spp., correspondientes a colonias levaduriformes con aspecto cremoso y blanquecino, se observaron al microscopio con tinta china y se evidenció la presencia de una cápsula que rodea a las células levaduriformes y se corroboró morfológicamente que las levaduras correspondían a *Cryptococcus* spp. (Figura 20).

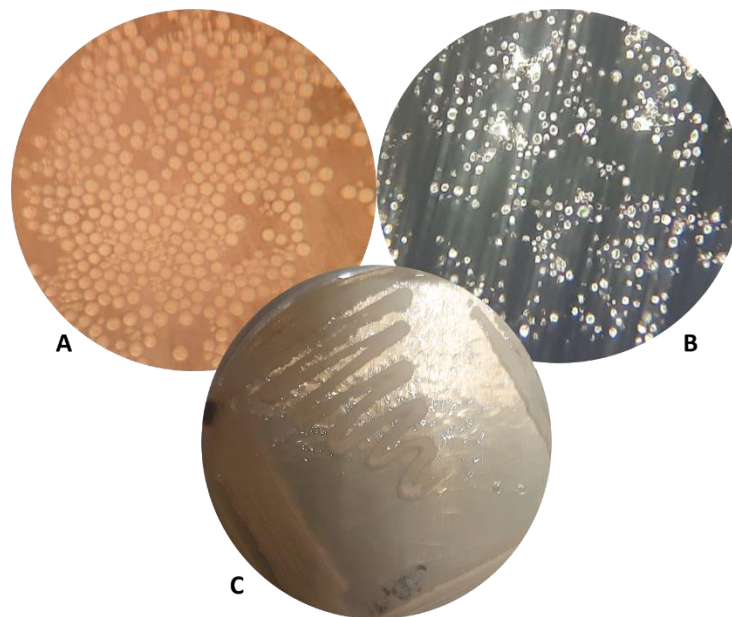


Figura 20. Observación en el microscopio de contraste de fases las colonias que morfológicamente pertenecen al género de *Cryptococcus* spp. **A)** observación a 40X sin tinción. **B)** observación a 40X de las células levaduriformes con tinta china. **C)** crecimiento de una de las cepas del género *Cryptococcus*. *Elaboración propia*.

9.4 Impacto en la salud

A lo largo de las últimas dos décadas la criptococosis ha sido la segunda infección micótica más reportada en individuos con VIH/SIDA y la tercera infección micótica invasiva en individuos que han pasado por el proceso de trasplante de órganos (Barbosa-Zamora *et al.*, 2016). La meningoencefalitis criptococócica es la manifestación clínica más frecuente y ha incrementado su incidencia en los últimos años en pacientes inmunocomprometidos, particularmente en los que padecen SIDA (Alonso-Martínez *et al.*, 2013). Algunos estudios han reportado que la incidencia de criptococosis en individuos que no son portadores de VIH/SIDA es de aproximadamente 0.2%-0.8% siendo más frecuente en las mujeres en una relación aproximada de 2:1 sin embargo en grupos de alto riesgo (como por ejemplos los individuos portadores de VIH/SIDA) predomina en los hombres en una relación aproximada de hasta 4:1 (Maziarz y Perfect, 2016).

Entre los principales factores de riesgo para adquirir la infección por *Cryptococcus* figuran: antecedentes de infección por el virus de inmunodeficiencia humana (78,1 %), uso de esteroides (4,1 %), enfermedad autoinmune (2,3 %), tumor sólido o malignidad (1,9 %), trasplante (1,3 %), diabetes mellitus (1,1 %), cirrosis hepática (0,9 %), insuficiencia renal crónica (0,3 %) y causa no establecida (13,2 %).⁵

La incidencia de criptococosis aumentó en el inicio del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en la década de 1980. Tras la llegada de la terapia antirretroviral altamente efectiva (TARGA), a partir de mediados de 1990, se observó que la frecuencia por este padecimiento comenzó a disminuir, principalmente en países desarrollados; un estudio realizado por Estados Unidos demostró en el año 2003, que la incidencia disminuyó entre 2.4%-6.6% durante el periodo 1992-1993, a 0.2%-0.7% en el año 2000 (Mirza *et al.*, 2003), de la misma manera, en Francia realizaron otra comparación de la incidencia observando resultados de disminución de hasta el 46% (Dromer *et al.*, 2004). Sin embargo, en países sin acceso a TARGA la incidencia de criptococosis es aún alta. Actualmente, a nivel mundial se estima que se llegan a 220,000 casos anuales de meningitis ocasionada por *Cryptococcus* convirtiéndose en un total de 181,000 fallecidos, la mayoría de los casos registrados provienen de África Subsahariana (CDC, 2020).

Es importante saber que, en México la frecuencia de criptococosis va en aumento. Desafortunadamente existen pocos estudios tanto epidemiológicos como clínicos a pesar de que entre el 10-15% de los individuos con SIDA, llegan a desarrollar esta micosis. Castañón-Olivares *et al.*, (2000) realizaron un estudio reportando la frecuencia de estas especies y sus variedades en México y comparándolos con países de Latinoamérica; se evidenció que son los hombres los más afectados, seguido de las personas que se encuentran en la tercera edad y la cuarta edad (87.3%, 33.8% y 37.5%, respectivamente), además, la frecuencia de los aislamientos de *C. neoformans var. neoformans*

(cn) y *C. gattii* (cg) que se obtuvieron (86.7% y 10.4%, respectivamente) fueron comparadas con países como: Argentina (cn 97.6% y cg 2.4%), Brasil (cn 83.3%, cg 15.8%), Cuba (cn 97.6%, cg 2.4%), Paraguay (cn 0%, cg 100.0%), Puerto Rico (cn 100.0%, cg 0%) y Venezuela (cn 66.7%, cg 29.6%) observando que las frecuencias de México se encuentran en el rango de porcentaje similar con el resto de los países.

10. DISCUSIÓN

El aumento en la incidencia de la criptococosis a nivel mundial en las últimas décadas, da conocimiento sobre la presencia de estas levaduras en el medio ambiente. El complejo de especies *Cryptococcus neoformans*-*C. gattii* comprende a un grupo de levaduras patógenas que pueden causar una infección cutánea, pulmonar y más frecuente afectar el sistema nervio central provocando una meningoencefalitis criptocócica, principalmente en las personas inmunosuprimidas; estas especies habitan en el medio ambiente y se encuentran asociadas a las excretas de las palomas y árboles de eucalipto respectivamente (Hull y Heitman, 2002).

10.1 Árboles de *Eucalyptus* spp.

Las especies del género *Eucalyptus*, han provocado grandes polémicas a nivel mundial, este género, nativo de Australia, fue introducido en México para la reforestación en zonas degradadas y con climas semiáridos, en la creación de áreas verdes, parques y jardines, también como arbolado de alineación en avenidas y calles, así como en plantaciones forestales (García, 2003).

Los árboles de eucalipto han sido considerados como reservorios de especies del género *Cryptococcus* desde 1982, existen reportes de diferentes partes del mundo, incluido México, en los cuales, las especies *C. gattii* y *C. laurentiis* han sido aisladas en hojas, suelo, flores y ramas de estos árboles (Ellis y Pfeiffer, 1990; Argüero *et al.*, 1999; Castañón-Olivares *et al.*, 2000; Escandón *et al.*, 2005; Castañón-Olivares *et al.*, 2007; Ramírez Félix, 2007; Springer y Chaturvedi, 2010; Cattana *et al.*, 2014; Pakshir *et al.*, 2018). Asimismo, otros estudios, señalan en sus metodologías, muestras obtenidas en más de 100 individuos de árboles, en contraste con nuestro estudio, en el cual el número de individuos muestreados fue mucho menor, Además, estos estudios incluyeron otras partes vegetativas como flores, ramas y corteza, que en estudios previos

no se habían considerado para aumentar las posibilidades de aislamientos (Argüero *et al.*, 1999; Castañeda y Castañeda, 2001; Pakshir *et al.*, 2018).

En nuestro estudio, los resultados fueron negativos, no se corroboró a *Eucalyptus* como reservorio de *Cryptococcus*, aunque también se intentó obtener aislados a partir de muestras de suelo, sin embargo, los hongos filamentosos fueron los más abundantes. Quizá nuestros resultados negativos, puedan ser explicados por lo descrito por Castañón-Olivares *et al.* (2007), quienes mencionan que lograron aislamientos de *Cryptococcus* spp., a partir de muestras de hojas, particularmente de eucaliptos sanos.

Nosotros encontramos que al menos el 90% de los árboles que se encuentran ubicados dentro de Ciudad Universitaria, que fue el sitio de muestreo, presentan daño en la mayoría de sus hojas, provocado por la conchuela del eucalipto (*Glycaspis brimblecombei* (Hemíptera: Psylloidea: Spondylaspididae), convirtiéndose en un problema ecológico de grandes dimensiones al no tener enemigos naturales, ocasionando la pérdida de follaje, disminución en el crecimiento, muerte en puntas y ramas e inclusive susceptibilidad a otras enfermedades llegando a causar la muerte del árbol (Cibrián *et al.*, 2001)., lo que quizá esté relacionado con la nula presencia de *Cryptococcus*.

10.2 Guano de *Columba* spp.

Por otro lado, las palomas abundan en las grandes ciudades, especialmente en plazas, parques y jardines. El problema con estas aves es que los lugares que eligen para hacer sus nidos son por lo general inaccesibles para cualquier persona, de manera que la acumulación de sus excretas, en las cuales se puede encontrar *C. neoformans* u otros microorganismos (González-Acuña *et al.*, 2007), puedan ser dispersadas y llegar hasta un huésped, que puede ser infectado o causar enfermedad.

Las excretas de palomas son consideradas un reservorio de especies de *Cryptococcus* spp., y se ha planteado que puede ser debido a que la temperatura de las aves es muy elevada, lo que impide el crecimiento del hongo, por lo cual es expulsado en las excretas, y al disminuir la temperatura, es capaz de proliferar y ser diseminado por el viento, una vez que las excretas se desecan (Vallejo *et al.*, 2016). En este estudio se obtuvieron varios aislados de *Cryptococcus*, a partir de excretas de palomas (*Columba* spp.), corroborando que las excretas de esta ave son un reservorio natural para el hongo, como ha sido descrito por otros autores (Agha Kuchak Afshari *et al.*, 2012; Granados y Castañeda, 2005; Ribas *et al.*, 2011; Vallejo *et al.*, 2016). Sin embargo, el número de muestras analizadas en estos trabajos ha sido superior a 100, y el número de aislados ha alcanzado hasta 40, sin embargo, es importante mencionar que algunos de los sitios seleccionados fueron azoteas donde existen palomares, árboles y edificios donde se acumulan una gran cantidad de estas aves, mientras que en nuestro caso optamos por seleccionar parque públicos, en donde además de observar la presencia significativa de excretas de palomas, también existe una interacción entre las personas que van a pasar el tiempo y personas que laboran en los parques.

En cuanto a las tomas de muestras en estudios previos optaron por obtener la excreta y ser transportadas a los laboratorios (Canónico-González *et al.*, 2013; Teodoro *et al.*, 2013; Xavier *et al.*, 2013; Varelas *et al.*, 2017; Caicedo Bejarano y Álvarez, 2020) mientras que nosotros por cuestiones de seguridad se tomó la decisión de solo tomar un hisopado de la excreta con un medio de transporte y posteriormente ser llevada al laboratorio para su procesamiento.

10.3 Caracterización fenotípica

El género *Cryptococcus* presenta colonias redondas de color crema o blancas cuando se encuentran en agar solido Sabouraud con consistencia generalmente cremosa o mucoide y en agar Semilla niger generalmente

presentan una pigmentación café debido a la capacidad de producir fenoloxidasa. En cuanto a las características microscópicas presenta hongos levaduriformes esféricos u ovoides constituidas por células, cada célula presenta una capsula de polisacáridos que es observada al microscopio con tinta china como un halo que la rodea (Kwon-Chung, 2010; Valdés *et al.*, 2003; Ramírez, 2007; Pal, 2015; Varelas *et al.*, 2017).

Es este estudio, los aislados identificados como *Cryptococcus* spp., mostraron colonias de color blanco, con consistencia cremosa en agar Sabouraud y cuando se resembro en agar semilla de niger, las colonias desarrollaron un color café; en cuanto a las observaciones bajo microscopio con preparación en tinta china se observaron células redondas con un halo evidente en cada una, coincidiendo esta descripción con las características fenotípicas reportadas en especies del género *Cryptococcus*.

11. CONCLUSIONES

Al realizar una exploración de campo por toda Ciudad Universitaria se contabilizaron un total de 968 árboles de *Eucalyptus* de los cuales un 90% de ellos se encuentran afectados en sus hojas por la plaga del psilido llamado *Glycaspis brimblecombei* Moore

Se determinó que debido a la contaminación de los árboles de *Eucalyptus*, el medio de cultivo Sabouraud y Mycosel no fueron suficientes para lograr aislamientos del género *Cryptococcus*, por lo cual se utilizó el medio de cultivo Semilla de niger.

En las muestras de hojas y suelo de árboles de *Eucalyptus*, no se logró ningún aislamiento positivo de especies del género *Cryptococcus*, por lo que no logramos establecer ninguna relación entre *Cryptococcus* y los árboles de *Eucalyptus* como lo indican estudios previos.

En las muestras de guano de *Columba* spp., se identificaron colonias positivas sugerentes del género *Cryptococcus* (en el 11% de las muestras), por lo cual se puede concluir que si existe una relación entre el guano de *Columba* spp y las especies del género *Cryptococcus* y que estas aves son consideradas como un reservorio tal como lo mencionan estudios previos.

A pesar de existir pocos reportes sobre casos de criptococosis en México su frecuencia va en aumento según reportes previos en los cuales las frecuencias comparadas con otros países de Latinoamérica son muy similares además de ser los hombres los más afectados por esta enfermedad.

12. RECOMENDACIONES

Los resultados de este estudio establecen una base para continuar con investigaciones que ayudarán a determinar la presencia de especies del género *Cryptococcus* en reservorios naturales dentro del municipio de Puebla y así mismo lograr crear una perspectiva social sobre la relación entre estos microorganismos y la salud pública.

Con base en los resultados obtenidos en arboles de *Eucalyptus* spp. y tomando en cuenta la bibliografía reportada, en lugar de utilizar los árboles que se encuentran dentro de Ciudad Universitaria con la gran cantidad de plaga que presentan, se recomienda elegir otro sitio de muestreo para tener más oportunidades de aislamientos de alguna especie del género *Cryptococcus* en este reservorio.

Debido a que existen reportes por criptococosis en los hospitales de Puebla, poder realizar pruebas de detección de *Cryptococcus* en personas que tengan alguna asociación con los reservorios de estos microorganismos, así como aplicar encuestas que nos den datos sobre sus actividades y conocimientos sobre alguna posible asociación con estos reservorios.

Aumentar el número de muestreos para evidenciar la presencia de especies del género *Cryptococcus* en sus reservorios naturales, así como, también realizar identificaciones bioquímicas, moleculares y pruebas de sensibilidad antifúngica para conocer más a este microorganismo importante dentro de la salud pública.

13. LITERATURA CITADA

- Agha Kuchak Afshari, S., Shokohi, T., Aghili, R., & Badali, H. (2012). Epidemiology and molecular characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from pigeon excreta in Mazandaran province, northern Iran. *Journal de Mycologie Medicale*, 22(2), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2012.02.002>
- Alonso-Martínez, D., Ramiro-Guerrero, E., & Espino-López, E. (2013). Criptococosis meníngea en un paciente inmunocompetente. *Medicina Interna de Mexico*, 29(2), 210–212.
- Alvarez, C., Salim, R., & Runco, R. (2010). Presencia de *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas urbanas en San Miguel De Tucumán - Argentina. *Boletín Micológico*, 25, 29–35.
- Álvarez Lam, I., Velázquez Acosta, J. C., Ponce Bittar, J., & Gaya, J. A. (2001). Criptococosis infantil: Presentación de 3 casos. *Rev Cubana Pediatr*, 73(1), 55–59.
- Araújo Júnior, E., Táparo, C., Uchida, C., & Marinho, M. (2016). *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 67(4), 1003–1008.
- Argüero Licea, Bertha; Garza Graza, Diana; Flores Urbieta, Victor; Cervantes Olivares, R. A. (1999). Aislamiento y caracterización de *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* a partir de muestras de *Eucalyptus camaldulensis* en la ciudad de México. *Revista Iberoamericana de Micología*, 16, 40–42.
- Barbosa-Zamora, A., De La Herrán-Millán, P., & Bonifaz, A. (2016). Criptococosis cutánea: una revisión. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 14(4), 330–340.
- Caicedo Bejarano, L. D., & Álvarez, M. I. (2020). Crecimiento del complejo *Cryptococcus neoformans*/ *Cryptococcus gattii* en extractos de excretas de palomas. *Entramado*, 16(1), 218–229.
- Canónico-González, Y., Adame-Rodríguez, J. M., Mercado-Hernández, R., & Aréchiga-Carvajal, E. T. (2013). *Cryptococcus* spp. isolation from excreta of pigeons (*Columba livia*) in and around Monterrey, Mexico. *SpringerPlus*, 2(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-632>
- Castañeda, A., & Castañeda, E. (2001). Aislamiento de especies de *Cryptococcus* asociadas con *Eucalyptus* en un parque de Bogotá. *Biomedica*, 21, 75–78.

- Castañón-Olivares, L. R., 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. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(1), 35–40.
- Castañón-Olivares, L., Sánchez-Paredes, E., Arreguín-Espinosa, R., Ruiz-Palacios y Santos, G., Carmona, A., & López-Martínez, R. (2007). Aislamiento de *Cryptococcus albidus* en árboles de eucalipto. *Revista Mexicana de Micología*, 25, 21–25.
- Cattana, M. E., Sosa, M. D. L. Á., Fernández, M., Rojas, F., Mangiaterra, M., & Giusiano, G. (2014). Native trees of the Northeast Argentine : Natural hosts of the *Cryptococcus neoformans* – *Cryptococcus gattii* species complex. *Revista Iberoamericana de Micología*, 31(3), 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.06.005>
- Centro de Monitoreo de la Calidad del Aire del Estado de Querétaro (CeMCAQ). (2017) *Material particulado*. <http://www.cemcaq.mx/contaminacion/particulas-pm>
- Curo, M., Salinas, M., & Casquero, J. (2005a). Aire De Los Palomares Del Perímetro Urbano De Ica , 2002. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 22(4), 262–266. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.168>
- Curo, M., Salinas, M., & Casquero, J. (2005b). *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas, suelo y aire de los palomares del perímetro urbano de ICA, 2002. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 22(4), 262–266. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.168>
- Dromer, F., Mathoulin-Pélissier, S., Fontanet, A., Ronin, O., Dupont, B., & Lortholary, O. (2004). Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): Comparison of the pre- and post-HAART eras. *Aids*, 18(3), 555–562. <https://doi.org/10.1097/00002030-200402200-00024>
- Duncan, C., Schwantje, H., Stephen, C., Campbell, J., & Bartlett, K. (2006). *Cryptococcus gattii* in Wildlife of Vancouver Island, British Columbia, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(1), 175–178. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.1.175>
- Ellis, D. H., & Pfeiffer, T. J. (1990). Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(7), 1642–1644.
- Escandón, P., Quintero, E., Granados, D., Huérfano, S., Ruiz, A., & Castañeda, E. (2005). Aislamiento de *Cryptococcus gattii* serotipo B a partir de detritos de *Eucalyptus* spp. en Colombia. *Biomédica*, 25, 390–397.

- Fang, W., Fa, Z., & Liao, W. (2015). Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in China. *Fungal Genetics and Biology*, 78, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.017>
- Fonseca, Á., Boekhout, T., & Fell, J. W. (2011). *Cryptococcus* Vuillemin (1901). In *The Yeasts: A Taxonomic Study* (Vol. 3). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00138-5>
- Granados, D. P., & Castañeda, E. (2005). Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microbial Ecology*, 49(2), 282–290. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0236-y>
- Huamán, A., Béjar, V., Guevara, J., Sevilla, R., Tapia, M., Valencia, E., ... Abanto, P. (2018). *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en Lima Metropolitana. *Revista Medica Herediana*, 29, 85–89.
- Hull, C. M., & Heitman, J. (2002). Genetics of *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Genetics*, 36(1), 557–615. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.36.052402.152652>
- Kidd, S. E., Hagen, F., Tschärke, R. L., Huynh, M., Bartlett, K. H., Fyfe, M., ... Meyer, W. (2004). A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(49), 17258–17263. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402981101>
- Kwon-Chung, K. J., Boekhout, T., Fell, J. W., & Diaz, M. (2002). (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *TAXON*, 51, 804–806.
- Maziarz, E. K., & Perfect, J. R. (2016). Cryptococcosis. *Infect Dis Clin N Am*, 30(1), 179–206. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.006>
- McDonald, T., Wiesner, D. L., & Nielsen, K. (2012). *Cryptococcus*. *Current Biology*, 22(14), R554–R555. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.040>
- Mirza, S. A., Phelan, M., Rimland, D., Graviss, E., Hamill, R., Brandt, M. E., ... Hajjeh, R. A. (2003). The changing epidemiology of cryptococcosis: An update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. *Clinical Infectious Diseases*, 36(6), 789–794. <https://doi.org/10.1086/368091>
- Oh, K. S., & Hwang, S. M. (2005). Isolation and Characterization of

- Cryptococcus neoformans* from Environmental Sources in Busan. *Mycobiology*, 33(4), 188–193. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2005.33.4.188>
- Pakshir, K., Fakhim, H., Vaezi, A., Meis, J. F., Mahmoodi, M., Zomorodian, K., Badali, H. (2018). Molecular epidemiology of environmental *Cryptococcus* species isolates based on amplified fragment length polymorphism. *Journal de Mycologie Médicale*. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.09.005>
- Pal, M. (2014). *Cryptococcus gattii*: an emerging global mycotic pathogen of humans and animals. *Journal of Mycopathological Research*, Vol. 52, pp. 1–6.
- Quintero, E., Castañeda, E., & Ruiz, A. (2005). Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca-Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22(2), 93–98. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(05\)70015-2](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(05)70015-2)
- Ramírez Félix, C. (2007). Aislamiento y determinación de *cryptococcus neoformans* var. *gattii* a partir de muestras de eucaliptos en Ciudad Juárez. *Ciencia En La Frontera: Revista de Ciencia y Tecnología de La UACJ*, IV(1), 42–44.
- Ribas, R. C., Baeza, L. C., & Ribeiro, F. H. M. (2011). Isolation of *Cryptococcus* spp. in excrements of pigeons (*Columba* sp.) in the Maringá city, Pr, Brazil. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*, 15(1), 45–50.
- Romero Placeres, M., Diego Olite, F., & Álvarez Toste, M. (2006). La contaminación del aire: su repercusión como problema de salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 44(2), 1–14.
- Sánchez-Monedero, M. A., Roig, A., Cayuela, M. L., & Stentiford, E. I. (2006). Emisión de bioaerosoles asociada a la gestión de residuos orgánicos. Emission of bioaerosols associated to organic waste management. *Ingeniería*, 1, 39–47.
- Spina-Tensini, T., Muro, M. D., Queiroz-Telles, F., Strozzi, I., Moraes, S. T., Petterle, R. R., ... de Almeida, S. M. (2017). Geographic distribution of patients affected by *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complexes meningitis, pigeon and tree populations in Southern Brazil. *Mycoses*, 60(1), 51–58. <https://doi.org/10.1111/myc.12550>
- Springer, D. J., & Chaturvedi, V. (2010). Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 14–20. <https://doi.org/10.3201/eid1601.090369>
- Srikanta, D., Santiago-Tirado, F. H., & Doering, T. L. (2014). *Cryptococcus*

neoformans: Historical curiosity to modern pathogen. *NIH Public Access*, 31(2), 47–60. <https://doi.org/10.1002/yea.2997>.*Cryptococcus*

Tello, C. M., Gutiérrez, E., Béjar, V., Galarza, C., Ramos, W., & Ortega-Loayza, A. G. (2013). Criptococosis. *Rev. Méd. Risaralda*, 19(2), 147–153. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v19n2/v19n2a08.pdf>

Teodoro, V. L. I., Gullo, F. P., Sardi, J. de C. O., Torres, E. M., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2013). Environmental isolation, biochemical identification, and antifungal drug susceptibility of *Cryptococcus* species. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(6), 759–764. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0025-2013>

Vallejo, D. A., Benavides, C. J., Chaves, C. A., Morillo, M. I., & Castillo, A. M. (2016). Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en el casco urbano del municipio de Pasto, Colombia. *Biosalud*, 15(1), 62–71. <https://doi.org/10.17151/biosa.2016.15.1.7>

Varelas, B. ., Rivera, A. ., Crocker, R. ., & Fernández, D. (2017). Estudio preliminar de la identificación de *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas en la zona metropolitana de Guadalajara Jalisco. *CIARTEC LAMAR*, 1(1), 1–6.

Xavier, T. F., Auxilia, a, Kannan, M., Rose, a F., & Kumar, S. R. S. (2013). Isolation and identification of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings in Tiruchirappalli district of Tamil Nadu, South India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(11), 404–409.