
GUÍA PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*

DIRECCION REDES EN SALUD PÚBLICA

SUBDIRECCIÓN LABORATORIO NACIONAL DE
REFERENCIA

GRUPO DE MICROBIOLOGÍA

2019

Dirección

Martha Lucia Ospina Martínez
Directora General Instituto Nacional de Salud

Coordinación

Astrid Carolina Flórez Sánchez
Directora Técnica (E)
Redes en Salud Pública

Clara del Pilar Zambrano Hernández
Subdirectora
Laboratorio Nacional de Referencia

Revisión

Patricia Escandón
Grupo de Microbiología
Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica
Dirección de Investigación en Salud Pública

Efraín Andrés Montilla
Grupo de Microbiología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

Elaborado por

Diana Susana Lizarazo Vásquez
Grupo de Microbiología
Subdirección Laboratorio Nacional de Referencia
Dirección Redes en Salud Pública

TABLA DE CONTENIDO

OBJETIVOS	4
ALCANCE	4
DEFINICIONES, SIGLAS ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	4
1. GENERALIDADES	6
1.1. Agente etiológico.....	6
1.2. Modo de transmisión	7
1.3. Prevención.....	7
2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO	7
2.1. Bioseguridad:.....	7
2.2. Toma de muestras:.....	8
2.2.1. Estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR).....	8
2.2.2. Suero sanguíneo o suero hemático	9
2.3. Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte:	9
2.3.1. Muestras de LCR y suero	9
2.3.2. Aislamiento del agente etiológico	9
2.4. Documentación requerida:	10
2.5. Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico:	10
2.5.1. Examen directo.....	10
2.5.2. Cultivo	11
2.5.3. Pruebas bioquímicas.....	11
2.5.4. Pruebas inmunológicas:.....	12
3. CONTROL DE CALIDAD.	12
4. VIGILANCIA POR LABORATORIO DE <i>Cryptococcus neoformans</i> y <i>Cryptococcus gattii</i>	12
5. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA EL EVENTO	13
5.1. Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR)	13
5.2. Funciones del laboratorio de Salud Pública (LSP).....	13
5.3. Funciones de los laboratorios públicos y privados o referentes para el evento en el nivel municipal y/o local según corresponda.....	13
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

OBJETIVOS

Describir los lineamientos y el proceso de vigilancia por laboratorio de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.

Establecer los procesos de obtención, conservación y transporte de las muestras para la detección de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.

Describir los fundamentos técnico-científicos de los métodos de ensayos empleados para el diagnóstico por laboratorio del *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.

Describir los criterios técnico-operativos para la participación en el programa interlaboratorio de control de calidad para la evaluación del desempeño directo.

Precisar cómo se articula la red nacional de laboratorios para la vigilancia por laboratorio de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, así como describir las funciones y responsabilidades en cada uno de los niveles.

ALCANCE

La presente guía aplica para la vigilancia por laboratorio de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* en diferentes matrices y métodos con los cuales se detectan en el laboratorio nacional de referencia del INS.

DEFINICIONES, SIGLAS ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Criptococcosis: la criptococosis es una micosis sistémica causada por un hongo levaduriforme encapsulado denominado *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, la cual afecta a pacientes inmunosuprimidos e inmunocompetentes.

Criptococosis pulmonar: Es frecuentemente asintomática, las manifestaciones clínicas e inmunológicas son inespecíficas. Los pacientes sintomáticos presentan tos, dolor torácico, expectoración y a veces fiebre; son raras las formas graves con insuficiencia respiratoria, las que se ven más frecuentemente en pacientes inmunosuprimidos. Las imágenes muestran múltiples nódulos, nódulos solitarios o masas pulmonares; también se puede presentar con menor frecuencia el derrame pleural, la linfadenopatía hilar, la opacidad reticulonodular difusa y las lesiones endobronquiales con obstrucción de la vía aérea y colapso pulmonar.^{1,2} El diagnóstico diferencial es amplio, especialmente con enfermedades pulmonares crónicas como la tuberculosis y las neoplasias. En pacientes con VIH/sida la afección pulmonar es más frecuente. Con frecuencia los pacientes afectados por *C. gattii* presentan masas pulmonares denominadas criptococomas.

Criptococosis del sistema nervioso central (SNC): Se presenta como meningitis, meningoencefalitis, lesiones pseudotumorales o criptococomas. La meningitis es la forma más frecuente y la mayoría de los casos tiene un curso subagudo. Se caracteriza por cefalea de gran

intensidad acompañada de náuseas y vómitos, también se pueden presentar otros síntomas que son variables, pero con frecuencia se observa fiebre y alteración del estado en general, las alteraciones visuales (oscurecimiento visual y pérdida de la visión). Los signos clínicos neurológicos más frecuentes son la alteración de la conciencia, la rigidez nuchal y los signos meníngeos de Kernig y Brudzinski, además de anomalías en el fondo del ojo, especialmente el papiledema y las hemorragias retinianas debidas a la hipertensión intracraneana y en otros casos por lesión directa del nervio óptico. La forma meningoencefálica, si está asociada al sida, es de curso rápido y muchas veces fulminante. Se manifiesta con deterioro rápido de la conciencia hasta llegar al coma, con escasos signos meníngeos, alteración del estado general con fiebre y a menudo convulsiones.³

Criptococomas: son masas que producen síntomas y signos neurológicos focales según el sitio afectado del encéfalo y causan el síndrome de hipertensión intracraneana y convulsiones, su evolución es comúnmente crónica. *C. gattii* produce usualmente criptococomas pulmonares y encefálicos

Criptococosis de otros órganos: Esta micosis se puede diseminar a órganos o tejidos diferentes al SNC, especialmente la piel; esta diseminación es más común en pacientes inmunosuprimidos, principalmente aquellos infectados con el VIH/sida.² También se puede presentar en huesos, articulaciones, corazón, musculo esquelético, aparato digestivo, aparato genitourinario, senos y sistema hematopoyético.⁴

A.G.S: Agar Glucosado de Sabouraud

A. Ch: Agar Chocolate

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LSP: Laboratorio de Salud Pública

LSPD: Laboratorio de Salud Pública Departamental

EFI: Enfermedad Fúngica Invasora

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés)

AGA: Agar Guizottia abyssinica o de semillas de Alpiste Negro

CGB: Canavanina Glicina- Azul de Bromotimol

1. GENERALIDADES

1.1. Agente etiológico

La criptococosis es una enfermedad infecciosa causada por el complejo de especies *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*.^{5,6} En 1983 Kutzing postuló el término *Cryptococcus* para nombrar el género, de acuerdo con el origen griego de la palabra, el cual significa literalmente (esfera oculta) debido a que las especies que pertenecen a este género se caracterizan por presentar blastoconidias encapsuladas. Las blastoconidias de *C. neoformans* y *C. gattii* oscilan entre 5-7µm y crecen a las 48-72 horas en medios de cultivo como el agar glucosado de Sabouraud incubado entre 25°C - 37°C, con el aspecto de levadura, algunas veces mucoides, dado por la producción del material capsular.⁷

La cápsula se compone principalmente de dos polisacáridos, glucuronoxilimanano (GXM) en un 90% y galactoxilomanano (GalXM) en un 7% además de un fragmento más pequeño de monoproteínas (MP).⁵ Durante varias décadas, los agentes causales de la criptococosis se habían agrupado en dos variedades y cinco serotipos, los cuales eran identificadas por reacción de aglutinación del polisacárido capsular: *C. neoformans* var. *grubii*, serotipo A, *C. neoformans* var. *neoformans* serotipo D y el híbrido entre los serotipos A y D; y *C. neoformans* var. *gattii*, serotipos B y C.^{8,9} *C. neoformans* tiene una distribución ubicua en el ambiente y se encuentra en altas concentraciones en los excrementos de aves, especialmente la paloma común, mientras que *C. gattii* se ha aislado principalmente con diferentes especies de árboles, más nunca ha sido recuperado a partir de excrementos de aves.^{10,11,12}

Actualmente *C. neoformans* y *C. gattii* están sólidamente clasificadas como especies separadas, y además de los cuatro serotipos, se han reconocido dos variedades y ocho tipos moleculares principales por medio de diferentes técnicas moleculares, incluidas huella molecular por PCR,¹³ polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés Amplified Length Polymorphism), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés Restriction Fragment Length Polymorphism), tipificación de secuencias Multi-locus (MLST, por sus siglas en inglés de Multilocus Sequence Typing)¹⁴; estas pruebas han determinado 8 genotipos principales; para *C. neoformans* var. *grubii* tenemos el genotipo VNI/AFLP1, VNII/ VNIB/AFLP1A, VNII/AFLP1B para *C. neoformans* var. *neoformans*, el genotipo VNIV/AFLP2 y para el híbrido AD el genotipo VNIII/ AFLP3. Para *C. gattii* tenemos para el serotipo C, los genotipos VGI/ AFLP4, VGII/AFLP6, VGIV/AFLP10 y para el serotipo B el VGIII/ AFLP5 y VGIV/AFLP7¹⁵ y más recientemente por la secuenciación del genoma completo en un número creciente de aislamientos.^{16,17} Aunque algunos grupos han propuesto que *C. neoformans* puede ser dividido en dos especies y *C. gattii* en 5 especies diferentes, esta propuesta aún no ha sido aceptada por la comunidad en general con el ánimo de no crear confusión.¹⁸

En países con altas tasas de incidencia de infección por el VIH/sida, la principal causa de meningitis del adulto es la criptococosis¹⁹, siendo una micosis oportunista importante en esta población, teniendo en cuenta que estos pacientes son sometidos a regímenes inmunosupresores de variada naturaleza, al igual que aquellos sometidos a trasplantes de órganos. En las personas aparentemente inmunocompetentes, la criptococosis tiene una incidencia importante, siendo de particular interés que un número considerable de casos en esta

población son causados por *C. gattii*. La mortalidad por criptococosis meníngea es alta, inclusive con la mejor terapia disponible.

1.2. Modo de transmisión

La exposición principalmente se genera a través de la inhalación (aerosol) de tierra contaminada y no directamente de animales.²⁰

1.3. Prevención

Con el fin de prevenir la aparición de la infección por *Cryptococcus* se debe:

- Uso de terapia antirretroviral en pacientes VIH
- Identificar a los pacientes de alto riesgo.
- Incluir en los protocolos el diagnóstico temprano de la enfermedad para disminuir su impacto
- Reconocer las fuentes que pueden transmitir la infección. Minimizar la exposición a las esporas fúngicas y propender por la pureza y limpieza del aire mediante la implementación de las recomendaciones de control ambiental y prevención dirigidas a los pacientes de alto riesgo, en caso de encontrarse hospitalizados, (utilización de filtros HEPA, por ejemplo).
- Mantener un alto nivel de sospecha ante los signos y síntomas en los pacientes de riesgo.
- Conocer y aplicar los protocolos de tratamiento y prevención.²¹

2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO

2.1. Bioseguridad:

Este microorganismo pertenece al grupo de riesgo 2 (microorganismos que causan enfermedad de buen pronóstico, frente a los que existe tratamiento y que en general no se transmiten por vía aérea y no es fácil su difusión en la comunidad). Se debe trabajar en un laboratorio de nivel de contención II, garantizando los procesos de verificación y certificación de las mismas y empleando las precauciones de barrera o bioseguridad (batas desechables, gafas de protección y respiradores o caretas N95) siempre y cuando el procedimiento tenga el potencial de generar aerosoles. Se debe tener en cuenta que las muestras clínicas, los fluidos corporales y los tejidos humanos y animales pueden ser positivos para el virus de la hepatitis B, VIH, otros agentes patógenos de transmisión sanguínea y *Mycobacterium tuberculosis*. En el interior de la cámara de bioseguridad se debe contar con bolígrafos y marcadores de uso exclusivo en cabina y guardián para descartar material como puntas, asas desechables y material corto punzante.

Usar guantes descartables de látex o nitrilo durante todo el procesamiento del agente infeccioso. El personal de laboratorio se debe quitar los guantes cuando éstos se contaminan por derrames o salpicaduras, o cuando se ha terminado el trabajo con materiales infecciosos. No se debe utilizar guantes fuera del laboratorio. No se debe utilizar el teléfono ni abrir las puertas con guantes utilizados en pruebas de laboratorio. Se deben desechar todos los guantes usados, colocarlos junto con otros materiales desechables y llevarlos a autoclave. El personal de laboratorio se debe lavar las manos inmediatamente después de haberse quitado los guantes.

Emplear asas desechables. Nunca queme las asas metálicas antes de ser desinfectadas con hipoclorito, de esa manera evita la formación de aerosoles.

Procedimientos como centrifugación y agitación en mezclador vortex deben realizarse en recipientes cerrados o tubos sellados con el fin de evitar aerosoles.

Al iniciar y terminar el proceso se deben limpiar las superficies y los equipos con hipoclorito de sodio diluido en agua al 1% (1:100), luego con alcohol isopropílico al 70%, para inactivar el cloro y evitar la corrosión de la superficie; cuando se presenten derrames limpiar con hipoclorito de sodio al 10% (1:10)

2.2. Toma de muestras:

La cantidad de la muestra enviada (2ml) de LCR o suero debe permitir la ejecución de todas las pruebas solicitadas o de las pruebas que realiza el laboratorio para la identificación (examen directo, cultivos, pruebas inmunológicas); se debe conservar una muestra de respaldo en caso de ser necesario repetir algún procedimiento.

2.2.1. Estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR)

La muestra de elección para el diagnóstico de la criptococosis es el LCR, la cual presenta anomalías en la mayoría de los pacientes con infección, tales como presión elevada, leucocitos aumentados, proteínas elevadas y glucosa baja. Debe realizarse punción lumbar para realizar estudio citoquímico y bacteriológico del LCR, lo que permite confirmar el diagnóstico, determinar el agente causante y analizar factores pronósticos (ver tabla 1). La punción deberá hacerse lo antes posible, una vez que se establece la sospecha clínica y preferiblemente, antes de instaurar el tratamiento antifúngico. Sin embargo, NO DEBE RETRASAR la instauración del tratamiento antimicótico.

Parámetro	LCR normal	LCR con meningitis por <i>Cryptococcus</i> spp.	
Aspecto	Claro	Turbio, amarillento, purulento	
Tinción de Gram	Negativa	Levaduras	<i>Cryptococcus</i> spp.
Tinción con Tinta China	Negativa	Levaduras encapsuladas	<i>Cryptococcus</i> spp.
Células	<10 cel/mm ³	>10 cel/mm ³ con predominio linfocitario.	
Proteínas	<100 mg/dl	>100 mg/dl	
Glucosa	>40 mg/dl	<40 mg/dl	
Cultivo	Negativo	Positivo	

Nota: El transporte de la muestra al laboratorio del hospital debe realizarse lo más pronto posible, a temperatura ambiente, y almacenar a la misma temperatura o a 30°C. Se debe procesar en menos de 24h.

2.2.2. Suero sanguíneo o suero hemático

La muestra de elección es el suero, que se obtiene por punción venosa en tubo sin anticoagulante. La coagulación normal y espontánea de la sangre ocurre entre 30 y 60 minutos a temperatura ambiente (22 a 25°C); se debe permitir la coagulación completa de la sangre antes de la centrifugación; si no se hace de esta forma, la fibrina puede ocasionar interferencias en algunos instrumentos (lectura, aspiración o pipeteo de muestras) Faltan referencias de todo lo anterior

Una vez que el suero ha sido separado de las células rojas de la sangre, la muestra es estable a temperatura ambiente durante ocho horas y hasta 48 horas a 4°C. Después de 48 horas la muestra de suero debe ser congelada a -20° C.

2.3. Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte:

Los laboratorios pueden remitir el Laboratorio Nacional de Referencia muestra de suero o LCR para su análisis, o también pueden hacer el envío del aislamiento para su confirmación y estudio.

2.3.1. Muestras de LCR y suero

La muestra de LCR y de suero de un paciente sospechoso de enfermedad invasora por *Cryptococcus* spp se deben enviar en un tubo (preferiblemente tapa rosca) al Laboratorio Nacional de Referencia (Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud) teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones:

Los laboratorios de Salud Pública Departamentales (LSPD) o clientes particulares, deben enviar como mínimo 1.5 ml de LCR o de suero refrigerados de 5 ± 3 °C. Las muestras deben ingresar debidamente marcadas. El transporte de la muestra debe realizarse rápidamente en un tubo de tapa rosca, en un embalaje triple correctamente marcado y etiquetado (PI650 si se transporte por vía aérea, categoría B)

Si la muestra no se procesa dentro de un plazo de 24 horas después de su recepción en el laboratorio de referencia, se debe conservar congelada a -20 ± 5 °C.

2.3.2. Aislamiento del agente etiológico

El aislamiento de *Cryptococcus* spp., recuperado de fluidos corporales estériles debe ser enviado en medio de transporte Amies o Cary Blair, útil especialmente para el envío de patógenos cumpliendo las siguientes indicaciones:

A partir de un cultivo puro de 24 a 48 horas de incubación a 35°C con una atmósfera aeróbica, recoger todo el crecimiento con el escobillón que trae el medio de transporte, colocar el escobillón en el medio de transporte e identificar el medio de transporte con los siguientes datos: nombre del paciente, No de Identificación y fecha de recogida del aislamiento. La temperatura del envío de la cepa es a temperatura ambiente $18 \pm 10^\circ\text{C}$

El transporte debe cumplir con las condiciones mínimas de bioseguridad para reducir los posibles riesgos de contaminación. Las cepas deben ir en triple embalaje como categoría B cumpliendo la normativa IATA y rotuladas con etiquetas que identifiquen la presencia de sustancias infecciosas.

2.4. Documentación requerida:

Toda muestra debe ser enviada con una carta de remisión, resumen de la historia clínica del paciente, ficha de envío de aislamientos y la Encuesta Nacional sobre la Criptococosis en Colombia, completamente diligenciada. El formato de la encuesta se encuentra en el anexo 1.

2.5. Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico:

2.5.1. Examen directo

La muestra de LCR se considera la muestra de elección para el diagnóstico de la criptococosis meníngea. Su examen directo permite la visualización directa de levaduras en el LCR entre lámina y laminilla mediante la técnica de exclusión de tinta china; las levaduras están provistas de pared bien definida y de una capsula refringente. La tinta China no tiene como objeto la tinción de las levaduras, sino que da un contraste oscuro a la matriz o fondo, por lo que los microorganismos sin teñir dejan ver las estructuras características del microorganismo. Esta técnica tiene una sensibilidad del 30% - 50% en casos de meningitis criptocócica en pacientes sin sida y hasta un 80% en pacientes con sida.²² Las levaduras también se pueden observar mediante esta técnica en muestras de esputo, lavado broncoalveolar, orina, biopsias, sangre, médula ósea, exsudados de úlceras, material purulento y secreción prostática.

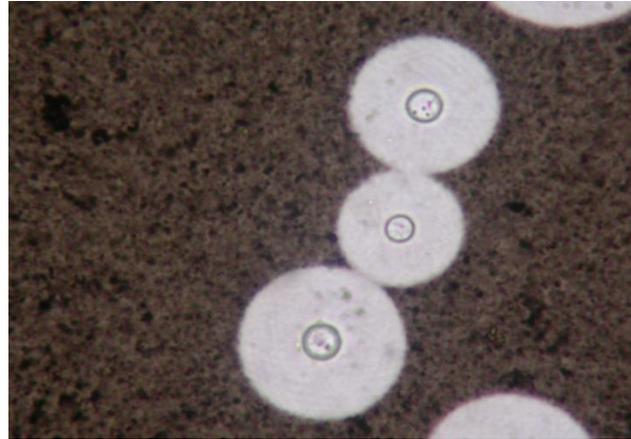


Figura 1: Preparación con tinta china que ilustra células levaduriformes esféricas de tamaño irregular, encapsuladas, de *Cryptococcus neoformans*. Fuente: Grupo de Microbiología, INS

2.5.2.Cultivo

C. neoformans y *C.gattii* pueden crecer fácilmente a partir de las muestras biológicas sembradas en agar glucosado de Sabouraud sin cicloheximida o en los medios comúnmente empleados en bacteriología para la siembra de LCR, después de 24 a 48h de incubación a 27°C a 30°C bajo condiciones aeróbicas. Los hemocultivos se deben sembrar en medios comerciales. En estos medios las colonias adquieren la morfología típica de una levadura, caracterizada por presentar colonias color crema, de textura suave a mucóide.

Para distinguir las especies de *Cryptococcus* de otras levaduras las muestras se pueden sembrar en medios selectivos como agar **AGA** donde las colonias de esta levadura se observan de color marrón debido a la acción de la fenoloxidasas con producción de melanina.²¹

2.5.3.Pruebas bioquímicas

- Ureasa: esta determinación es importante para la diferenciación de *Candida* spp y *Cryptococcus* spp. ya que *Cryptococcus* spp cataliza la hidrólisis de urea a amoníaco y carbamato, esta actividad mejora la habilidad de *C. neoformans* para invadir el SNC (sistema nervioso central)
- Agar Canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB): *C. gattii* crece y hace virar a azul el medio, debido a la alcalinización por el amoníaco liberado durante la degradación de la glicina; en cambio *C. neoformans* no crece en este medio debido a la susceptibilidad a

la canavanina y la incapacidad de asimilar la glicina, permaneciendo el medio de color verde. ²¹ Esta prueba debe realizarse una vez el test de la ureasa ha sido reportado como positivo.

2.5.4. Pruebas inmunológicas:

- Con estas pruebas se pueden detectar el antígeno polisacárido capsular de *C. neoformans* y *C. gattii*, en suero y LCR.
- Las pruebas empleadas son aglutinación de partículas de látex recubiertas con anticuerpos policlonales dirigidos contra la cápsula criptocócica. La detección del antígeno polisacárido es considerada la prueba diagnóstica de elección, debido a su alta sensibilidad 93%-100% y especificidad 93%-98%
- Esta prueba se usa con valor pronóstico, para correlacionar el aumento o disminución de los títulos de anticuerpos durante el curso de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, fundamentalmente en pacientes sin sida. ²³

3. CONTROL DE CALIDAD.

El Grupo de Microbiología realiza la Evaluación Externa del Desempeño en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos (EED-B-RA). El programa está dirigido a todos los laboratorios de carácter público, privado o mixto, constituidos en empresas por sí mismo, o que pertenezcan a entidades territoriales de Salud Pública, que tenga dentro de su prestación de servicios, el análisis microbiológico bacteriano

4. VIGILANCIA POR LABORATORIO DE *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*

Consiste en confirmar el microorganismo de los aislamientos recibidos utilizando los diferentes métodos de diagnóstico realizados por el laboratorio de Micología del INS; además del análisis de la información obtenida a través de la Encuesta Nacional sobre la Criptococosis, el cual fue creada para identificar las características demográficas, clínicas y epidemiológicas con el fin de conocer la procedencia de la población afectada por la criptococosis y conocer los factores de riesgo que ayuden a describir su circulación en variables relacionadas con sus características genotípicas, su estacionalidad y los sitios en donde circula con el fin de suministrar información que permita orientar las acciones de prevención en especial primaria y secundaria, así como estrategias de control.

5. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA EL EVENTO

5.1. Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia (LNR)

- El Grupo de Microbiología realizará la confirmación y tipificación de todos los aislamientos de *Cryptococcus* spp., obtenidos de muestras que sean enviados por los LSP del país
- Apoyar a los LSPD con asesoría técnica.
- Realizar la Evaluación Externa del Desempeño en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos (EED-B-RA).
- Fortalecer la red nacional de laboratorios para la identificación de *Cryptococcus* spp.

5.2. Funciones del laboratorio de Salud Pública (LSP)

- Realizar cultivo y aislamiento de *Cryptococcus* spp. a partir de la identificación realizada por el prestador.
- Identificar mediante pruebas convencionales o identificación por sistemas semi-automatizados (Vitek, Phoenix, Microscan)
- Participar en la Evaluación Externa del Desempeño en Bacteriología y Resistencia a los Antimicrobianos (EED-B-RA).
- Mantener una base de datos actualizada con los aislamientos recibidos por municipios y los resultados, luego del procesamiento de los mismos.
- Retroalimentar los resultados de los casos a las IPS, direcciones locales y departamentales de salud para realizar las acciones necesarias con el paciente y ajustar los casos en el sistema de vigilancia.

5.3. Funciones de los laboratorios públicos y privados o referentes para el evento en el nivel municipal y/o local según corresponda

- Realizar los ensayos establecidos en la clasificación única de procedimientos en salud – CUPS para la identificación de hongos.
- Los aislamientos deben ir acompañados con la encuesta epidemiológica sobre la Criptococosis en Colombia completamente diligenciada.
- Hacer la notificación del caso según sea su presentación, de forma inmediata al área de epidemiología.
- De ser necesario, pueden solicitar apoyo técnico para el análisis de los casos a las autoridades locales, departamentales o nacionales, prestando toda la colaboración y poniendo a disposición la información necesaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yu, J. Q., Tang, K. J., Xu, B. L., Xie, C. M., & Light, R. W. (2012). Pulmonary cryptococcosis in non-AIDS patients. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16(6), 531-539.
2. Chang, C. C., Sorrell, T. C., & Chen, S. A. (2015, October). Pulmonary cryptococcosis. In *Seminars in respiratory and critical care medicine* (Vol. 36, No. 05, pp. 681-691). Thieme Medical Publishers.
3. Félix, P. R. L. (2002). Criptococosis del sistema nervioso central. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 3(1), 34-36.
4. Castañeda, E., & Lizarazo, J. (2012). Protocolo de estudio y manejo de los pacientes con criptococosis. *Infectio*, 16(3S).
5. Kwon-Chung, K. J., Fraser, J. A., Doering, T. L., Wang, Z. A., Janbon, G., Idnurm, A., & Bahn, Y. S. (2014). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(7), a019760.
6. Kwon-Chung, K. J., Bennett, J. E., Wickes, B. L., Meyer, W., Cuomo, C. A., Wollenburg, K. R., ... & Cogliati, M. (2017). The case for adopting the "species complex" nomenclature for the etiologic agents of cryptococcosis. *MSphere*, 2(1), e00357-16.
7. Bose, I., Reese, A. J., Ory, J. J., Janbon, G., & Doering, T. L. (2003). A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*, 2(4), 655-663.
8. Cattana, M. E., Tracogna, M. F., Fernández, M. S., Rey, M. C. C., Sosa, M. A., & Giusiano, G. E. (2013). Genotipificación de aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* obtenidos en el Hospital «Dr. Julio C. Perrando», de la ciudad de Resistencia (Chaco, Argentina). *Revista argentina de microbiología*, 45(2), 89-92.
9. Josep M^a Torres Rodriguez. (2002). Epidemiología de la Cryptococosis en España. Caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans*.
10. Emmons, C. W. (1951). Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *Journal of bacteriology*, 62(6), 685.
11. Firacative, C., Torres, G., Rodríguez, M. C., & Escandón, P. (2011). First environmental isolation of *Cryptococcus gattii* serotype B, from Cúcuta, Colombia. *Biomedica*, 31(1), 118-123.
12. Lazera, M. S., Cavalcanti, M. S., Londero, A. T., Trilles, L., Nishikawa, M. M., & Wanke, B. (2000). Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical mycology*, 38(5), 379-383.

13. Meyer, W., & Mitchell, T. G. (1995). Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis*, 16(1), 1648-1656.
14. Meyer, W., Aanensen, D. M., Boekhout, T., Cogliati, M., Diaz, M. R., Esposto, M. C., & Litvintseva, A. P. (2009). Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Medical mycology*, 47(6), 561-570.
15. Escandón P, Montilla A. Tipificación molecular de aislamientos del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. *Infectio* 2010; 14(S2): S127-S130
16. D'Souza, C. A., Kronstad, J. W., Taylor, G., Warren, R., Yuen, M., Hu, G., & Lee, N. (2011). Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *MBio*, 2(1), e00342-10.
17. Loftus, B. J., Fung, E., Roncaglia, P., Rowley, D., Amedeo, P., Bruno, D., & Allen, J. E. (2005). The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*, 307(5713), 1321-1324
18. Hagen F, Lumbsch T, Arsenijevic V, Badali H, Bertout S, Billmyre B, et al. Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus*. e00238-17
19. GenusRajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., ... & Boulware, D. R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet infectious diseases*, 17(8), 873-881.
20. Lizarazo, J., Linares, M., de Bedout, C., Restrepo, Á., Agudelo, C. I., & Castañeda, E. (2007). Results of nine years of the clinical and epidemiological survey on cryptococcosis in Colombia, 1997-2005. *Biomedica*, 27(1), 94-109.
21. Evaluación, Prevención y Profilaxis de la Enfermedad Fungica Invasora Pilar Rivas, Javier Pemán, Guillermo Quindós, Miguel Salavert. Separata 10 pags 239-240. 2014
22. Tello, M., Gutiérrez, E., Béjar, V., Galarza, C., Ramos, W., & Ortega-Loayza, A. G. (2013). Cryptococcosis. *Revista Médica de Risaralda*, 19(2), 147-153.
23. Lizarazo, J., & Castañeda, E. (2012). Consideraciones sobre la criptococosis en los pacientes con SIDA. *Infectio*, 16(3S).