



Universidad Científica del Sur

Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“PRESENCIA DE *Cryptococcus neoformans* EN HECES DE PALOMAS
MENSAJERAS Y DE CASTILLA (*Columba livia domestica*) DE LA
CIUDAD DE LIMA, PERÚ”

Tesis para Optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

RICARDO ERNESTO TIMMERMANN FLORES

BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

LIMA - PERÚ

2017

AGRADECIMIENTO

Al profesor Siever Morales Cauti, por su dedicación y amistad, por las continuas revisiones y críticas constructivas, por la ayuda y motivación constantes a lo largo de todo el trabajo de tesis.

Al profesor Eglinton Rubén Villacaqui Ayllón, por su amistad y ayuda incondicional, por su interés en la presente tesis desde sus inicios, y por su constante apoyo a lo largo del desarrollo del estudio.

Al profesor Raúl Zegarra Valdivia, por su amistad y siempre buena disposición para ayudar a que el trabajo de tesis culmine de la mejor manera.

A los dirigentes, personal administrativo y de laboratorio, profesores y compañeros de estudios de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por todo lo compartido y aprendido.

A los señores colombófilos de la Asociación Peruana de Colombófilos – APCO, Pablo Timmermann, Fernando Cisneros, Iván Rondón, y Rodrigo Gonzáles Torres, por abrir las puertas de sus palomares para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

ÍNDICE

| | Página |
|--|---------------|
| RESUMEN | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| I. INTRODUCCIÓN | 7 |
| II. MARCO TEÓRICO | 9 |
| 2.1 Biología de <i>Cryptococcus neoformans</i> | 9 |
| 2.1.1 Taxonomía de <i>Cryptococcus neoformans</i> | 13 |
| 2.1.2 Patogenia de <i>Cryptococcus neoformans</i> | 13 |
| 2.1.3 Tratamiento de la criptococosis | 16 |
| 2.2 La <i>Columba livia domestica</i> | 17 |
| 2.2.1 La paloma mensajera | 17 |
| 2.2.2 La paloma de Castilla | 19 |
| 2.3 El ser humano en riesgo | 20 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| 3.1 LOCALIZACIÓN Y AMBIENTE | 22 |
| 3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA | 24 |
| 3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL | 26 |
| 3.4 ANÁLISIS DE DATOS | 26 |
| 3.5 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Cryptococcus neoformans</i> | 26 |
| 3.5.1 Toma de Muestras | 26 |
| 3.5.2 Procesamiento de muestras | 27 |
| 3.5.3 Siembra en tubos | 27 |

| | | |
|---|--|----|
| 3.5.4 | Identificación macroscópica | 27 |
| 3.5.4.1 | Observación macroscópica de colonias y crecimiento a 37 °C | 27 |
| 3.5.4.2 | Observación de la cápsula en tinta china | 28 |
| 3.5.5 | Identificación bioquímica | 28 |
| 3.5.5.1 | Prueba de la enzima ureasa | 28 |
| 3.5.5.2 | Prueba de asimilación de carbohidratos | 29 |
| 3.5.5.3 | Prueba de reducción de nitratos | 29 |
| 3.5.5.4 | Prueba de la enzima fenoloxidasa | 30 |
| 3.5.5.5 | Siembra en Agar | 30 |
| IV. RESULTADOS | | 32 |
| V. DISCUSIÓN | | 36 |
| VI. CONCLUSIONES | | 40 |
| VII. RECOMENDACIONES | | 41 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | | 42 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Número | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1. | <i>Cryptococcus neoformans</i> en tinta china. | 10 |
| 2. | Características físicas de la paloma mensajera. | 18 |
| 3. | Características físicas de la paloma de Castilla. | 20 |
| 4. | Mapa de ubicación de los puntos de toma de muestra. | 23 |
| 5. | Curva de distribución beta pert para la presencia de <i>Cryptococcus neoformans</i> en heces de palomas domésticas (<i>Columba livia domestica</i>) evaluadas durante el muestreo 2,015 – 2,016. | 34 |
| 6. | Curva de distribución beta pert para la presencia de <i>Cryptococcus neoformans</i> en heces de palomas de Castilla (<i>Columba livia domestica</i>) evaluadas durante el muestreo 2,015 – 2,016. | 35 |

ÍNDICE DE CUADROS

| Número | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1. | Proporción hallada de muestras positivas a <i>Cryptococcus neoformans</i> según lugar de muestreo por tipo de paloma evaluada. | 33 |

RESUMEN

El hongo *Cryptococcus neoformans* es el agente causal de la criptococosis, enfermedad fúngica de importancia tanto en salud pública como animal. El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas domésticas (*Columba livia domestica*) en lugares públicos de la ciudad de Lima, Perú en el período comprendido entre octubre de 2015 y enero de 2016. Se recolectó muestras de heces secas en palomares de palomas mensajeras criadas por colombófilos y heces secas de palomas de Castilla (animales de vida libre). Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de microbiología de la Universidad Científica del Sur, se incubaron en estufa a 37 °C por 2 a 10 días, y se identificó al hongo en estado de levadura por pruebas físicas: evaluación macroscópica de colonias en agar Sabraud dextrosa con cloranfenicol y visualización de cápsula con tinta china; y bioquímicas: prueba de ureasa, asimilación de azúcares, reducción rápida de nitrato, prueba de fenoloxidasa y siembra en agar CGB. Se determinó una proporción de muestras positivas a *Cryptococcus neoformans* en heces de ambos tipos de palomas evaluadas de 5.16% (16/310) con un IC_{95%}: 2.7% - 7.62%. En el grupo de heces de palomas de Castilla se determinó una proporción de 8.89% (16/180) con un IC_{95%}: 4.73% - 13.05% y en el grupo de palomas mensajeras, una proporción de 0% (0/130) de muestras positivas a *Cryptococcus neoformans*. Adicionalmente se realizó una simulación estocástica Beta Pert (@Risk 5.5®), determinando intervalos más ajustados de presencia mínima y máxima para ambos tipos de palomas (4.74% y 5.46%), y para palomas de Castilla (8.26% y 9.52%).

Palabras clave: *Cryptococcus neoformans*, heces de paloma, palomas mensajeras, palomas de Castilla.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is the causative agent of cryptococcosis, an important fungus disease in both public and animal health. The objective of this study was to determine the presence of *Cryptococcus neoformans* in droppings of domestic pigeons (*Columba livia domestica*) from the city of Lima, Peru in the period between October 2015 and January 2016. Samples were collected from dry feces of racing pigeons bred by pigeon fanciers and dry feces from feral pigeons (free-living pigeons). Samples were processed in the laboratory of microbiology from the Scientific University of the South (Universidad Científica del Sur). Samples were kept in a microbiological incubator at 37°C for 2 to 10 days. The fungus was identified by physical tests: macroscopic evaluation of colonies in Sabraud dextrose agar with chloramphenicol and visualization of capsule using India ink. The biochemical tests performed were: urease test, sugar assimilation, rapid reduction of nitrate, fenoloxidase test and seeding in CGB agar. The stool proportion of positive samples to *Cryptococcus neoformans* in both types of pigeons evaluated was 5.16% (16/310) with a 95% CI: 2.7% - 7.62%. In the group of feral pigeon's feces, a proportion of 8.89% (16/180) was determined with a 95% CI: 4.73% - 13.05%. In the group of racing pigeons' feces, a proportion of 0% (0/130) of positive samples to *Cryptococcus neoformans* was determined. In addition, a Beta Pert (@Risk 5.5®) stochastic simulation was performed, determining more tight intervals of minimum and maximum presence in both types of pigeons (4.74% and 5.46%), and in the group of feral pigeons (8.26% and 9.52%).

Key words: *Cryptococcus neoformans*, pigeon droppings, racing pigeons, feral pigeons.

I. INTRODUCCIÓN

La criptococosis es una enfermedad infecciosa producida por el hongo *Cryptococcus neoformans*, patógeno oportunista que ingresa por vía aérea a los pulmones y afecta tanto al hombre como a los animales (Acha y Szyfres, 2001). Este hongo es prácticamente incapaz de causar enfermedad en un ser humano inmunológicamente competente; sin embargo, cuando el sistema inmune del individuo está comprometido, la inhalación del hongo puede producir neumonía y migrar al sistema nervioso central, causando meningoencefalitis (Konstad *et al.*, 2011). Esta enfermedad ha emergido paralelamente a la epidemia del VIH/SIDA, afectando también a grupos de personas con tratamiento inmunosupresor por trasplante de órganos, enfermedades inmunosupresoras congénitas o terapias anticancerígenas, siendo una importante causa de mortalidad. Al respecto se ha estimado que entre el 70% y 90% de pacientes con sida desarrollan enfermedades neurológicas, y se calcula una tasa de 1 millón de nuevos casos de criptococosis por año, con una mortalidad anual de más de 650,000 personas alrededor del mundo.

La criptococosis puede tratarse con antibióticos y antifúngicos, como anfotericina B, flucitosina y fluconazol. Estos fármacos se usan para combatir severas infecciones del cerebro y pulmones. La terapia antifúngica se extiende usualmente hasta que las muestras de líquido cefalorraquídeo sean negativas a la presencia del hongo en pacientes con infecciones cerebrales y las lesiones en pulmones hayan reducido su tamaño en respuesta a

la terapia. En el caso de pacientes inmunodeprimidos el tratamiento con fluconazol dura en promedio dos años, pudiendo ser de por vida.

Se ha detectado *Cryptococcus neoformans* en lugares frecuentados por palomas en varios países del mundo, incluyendo países de América, como Argentina, Brasil, Canadá, Colombia, Estados Unidos, México, Perú y Venezuela (**Curo, 2005; Cermeño et al., 2006; Lin y Heitman, 2006**). La ciudad de Lima tiene una población importante de palomas domésticas asilvestradas (o de Castilla) cerca de centros poblados, anidando en edificios como iglesias, centros empresariales e incluso hospitales; así como palomas criadas en palomares, pudiendo significar un riesgo para la salud.

En la ciudad de Lima aún no se ha reportado investigaciones acerca del tema. Por tal motivo el presente estudio plantea como objetivo la determinación de la presencia o no de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas mensajeras y de Castilla (*Columba livia domestica*), de tal manera que se puedan establecer mejores medidas de control de la transmisión de la enfermedad y un manejo más eficaz de los animales por parte de las instituciones públicas y criadores particulares, buscando conservar la salud de las personas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 BIOLOGÍA DE *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans es un basidiomiceto perteneciente a la familia Tremellaceae. Estas levaduras encapsuladas (Figura 1) miden entre 4 a 6 μm de diámetro, mostrando gran heterogeneidad en tamaño en muestras clínicas (Levitz, 1991). Su descubrimiento data de más de un siglo atrás, donde fue aislado de jugo de durazno (Sanfelice, 1894) y de la tibia de un paciente humano (Busse, 1894; Buschke, 1895).

Basándose en la reacción de aglutinación de la cápsula, se consideraron inicialmente cuatro serotipos: A, B, C, D y un híbrido AD (Belay *et al.*, 1996). Posteriormente gracias a pruebas bioquímicas, estudios moleculares, diferencias fenotípicas y secuencias genómicas, se encontraron diferencias significativas entre los serotipos, por lo que se ha podido clasificar a este organismo en dos variedades y una especie hermana (sibling species): *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* correspondiente al serotipo D; *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* correspondiente al serotipo A (Belay *et al.*, 1996; Franzot *et al.*, 1999); y *Cryptococcus gattii* correspondiente a los serotipos B y C (Kwon-Chung, 2002).



Figura 1: *Cryptococcus neoformans* en tinta china. Fuente propia.

Adicionalmente *C. neoformans* se ha dividido en nueve tipos moleculares: El serotipo A produce patrones: VNI, VNII o VNB (aislado hasta el momento únicamente en Botswana) (Litvintseva *et al.*, 2006); el híbrido AD produce el tipo molecular VNIII; el serotipo B produce los patrones VGI, VGII, VGIII; mientras que el serotipo C produce los patrones VGIII o VGIV (Lin y Heitman, 2006). Como basidiomiceto con sistema de apareamiento bipolar, *C. neoformans* contiene sólo un locus MAT. Este apareamiento ocurre en dos alelos idiomórficos, correspondiente a los dos tipos opuestos de apareamiento: a o α . A pesar de existir la capacidad de reproducirse sexual o asexualmente, la mayoría de aislamientos de *C. neoformans* alrededor del mundo corresponden a células haploides de tipo de apareamiento α (Brandt *et al.*, 1996; Franzot *et al.*, 1997; Halliday y Carter, 2003).

De acuerdo a su ciclo de vida, *C. neoformans* puede adoptar diferentes formas en la naturaleza: las clamidiosporas, células de pared gruesa con citoplasma condensado que se forma dentro de las hifas, pueden servir como estructuras que promueven una sobrevivencia en el largo plazo, pero no de herramienta de dispersión debido a sus conexión física con el micelio. Estas estructuras han demostrado conferir resistencia ante depredadores como amoebas (Lin y Heitman, 2006).

En el caso de aislamientos clínicos y medioambientales en aire, suelo y heces, la forma más encontrada es una levadura encapsulada y redonda, pudiendo encontrarse también en forma de basidiosporas (**Lin y Heitman, 2006**). Estas basidiosporas miden aproximadamente 2 μm , tamaño suficiente para evadir el efecto de arrastre de las células ciliadas del aparato respiratorio. Las levaduras, por otro lado, miden en promedio 5 μm de diámetro, sin embargo debido a factores como falta de nutrientes y de humedad, la cápsula se reduce llegando a medir 3 μm , tamaño suficiente como para ser inhaladas y depositadas en los alveolos pulmonares. Preparados de esporas de *C. neoformans* han reportado ser cien veces más virulentos que preparados de levaduras; de hecho, se ha demostrado que se requiere un número considerablemente menor de esporas que de levaduras para causar criptococosis en ratones (**Sukroongreung et al., 1998**). Adicionalmente las basidiosporas son más resistentes a la desecación y fácilmente de incorporarse al viento, mientras que las levaduras tienen menor resistencia a condiciones ambientales como privación de nutrientes y baja humedad (**Nucci et al. 2010**). Bajo estas características se sostiene la hipótesis de que la forma infectiva de *C. neoformans* son las basidiosporas.

Debido a su distribución mundial en el ambiente, *C. neoformans* var. *grubii* y *C. neoformans* var. *neoformans* son los agentes principales en la criptococosis en pacientes con sida; sin embargo *C. gattii* es el causante del 70% a 80% de criptococosis en pacientes inmunodeprimidos en zonas tropicales y subtropicales, especialmente en Australia y Papua Nueva Guinea, dada su condición de especie endémica de estos lugares (**Lin y Heitman, 2006**).

Si bien la criptococosis ocurre tanto en humanos como en animales (**Chen et al., 2003**), no se ha documentado la transmisión de la enfermedad entre especies; siendo las principales fuentes reportadas como transmisoras de *Cryptococcus neoformans*: suelos contaminados con guano de paloma, heces de canarios domésticos y pollos (**Criseo et al., 1995; Horta et al., 2002; Kurori et al., 2004; Curo, 2005**), árboles de eucalipto y madera en descomposición (**Callejas et al, 1998**).

En el caso de los humanos, la infección por *Cryptococcus neoformans* se adquiere por inhalación del hongo que está presente en el medio ambiente (**Granados y Castañeda,**

2005) y puede colonizar el aparato respiratorio sin causar síntomas en el hospedero. Una vez ocurrida la infección, el hongo puede ser eliminado o entrar en un estado de latencia por varios años, para luego reactivarse cuando el sistema inmune esté afectado (**Dromer, 1992; García-Hermoso, 1999; Alanio et al., 2015**).

Debido a que en el medio ambiente existen diferentes cepas de *C. neoformans*, es posible que un individuo inhale simultáneamente varias cepas en una primera infección. Respecto de esto existen varios reportes donde se propone por un lado la infección por una cepa única, más virulenta que las demás inhaladas, y por lo tanto predominante; y por el otro la infección mixta, donde se hace referencia de tropismo hacia ciertos tejidos según la cepa (**Brandt et al., 1996**).

La criptococosis no se desarrolla exclusivamente en humanos, pueden existir también infecciones en animales, tanto silvestres como domésticos (**Lin y Heitman, 2006**). Las presentaciones clínicas en animales difieren de los humanos, encontrándose que en gatos las infecciones son cutáneas, como en varios casos reportados en humanos (**Courville et al., 2002**), o del aparato respiratorio superior (**Krockenberger et al., 2002**). En cabras se aisló *C. neoformans* en muestras de pulmón con enfermedad pulmonar severa (**Baró et al., 1998**); mientras que en perros la criptococosis tiende a ser diseminada, involucrando al sistema nervioso y ojos, con signos clínicos asociados a meningoencefalitis, neuritis óptica y corioretinitis granulomatosa (**Lin y Heitman, 2006**).

En los animales de granja se han reportado casos en ganado bovino y caprino (**Baró et al., 1998**) asociados a mastitis y neumonía; mientras que en los equinos los signos clínicos se manifiestan en crecimientos obstructivos en los ollares. Se han reportado casos en animales silvestres como koalas, donde las infecciones fueron principalmente subclínicas (**Krockenberger, 2002**) y cutáneas en la periferia de la nariz (**Lin y Heitman, 2006**).

2.1.1 Taxonomía de *Cryptococcus neoformans*

| | |
|----------|---|
| Reino: | Fungi |
| Phylum: | Basidiomycota |
| Orden: | Tremellales |
| Familia: | Tremellaceae |
| Género: | <i>Cryptococcus</i> |
| Especie: | <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> |

Adicionalmente, encontramos las siguiente especies: *C. neoformans* var. *grubii*, *C. gattii*, *C. albidus*, *C. laurentii*, y aproximadamente, otras 35 especies más que continuamente se están reclasificando. Se han registrado casos raros provocados por *Cryptococcus albidus*, *C. laurentii* y *C. uniguttulatus*. Formalmente se reconoce a *C. neoformans* y *C. gattii* como los agentes etiológicos de la criptococosis en mamíferos (Vásquez-Tsuji *et al.*, 2005).

2.1.2 Patogenia de *Cryptococcus neoformans*

Los hongos patógenos, muchas veces toman ventaja del estado alterado del huésped. Esta situación es dramáticamente ilustrada por el hongo *Cryptococcus neoformans*, microorganismo oportunista que aprovecha situaciones de inmunodepresión y así causar enfermedad (Levitz, 1991; Abadi *et al.*, 1999; Konstad *et al.*, 2011).

Las partículas aéreas consistentes en basidiosporas y levaduras que se han desecado son la mayor fuente de infecciones respiratorias por *C. neoformans* en los seres humanos (Granados y Castañeda, 2005; Alanio *et al.*, 2015), sin embargo pueden ocurrir infecciones primarias en otros órganos (Courville *et. al.*, 2002). Así como en la histoplasmosis, aspergilosis y coccidiomicosis, la criptococosis empieza con el ingreso de esporas o células que se depositan en los alveolos pulmonares (Lin y Heitman, 2006). *C. neoformans* interactúa con diferentes tejidos y tipos celulares, incluyendo amebas, nemátodos y células del sistema inmune innato, pudiendo proliferar y sobrevivir por largo

tiempo en medio intracelular. Estudios epidemiológicos de años anteriores y el hallazgo de levaduras de *C. neoformans* de bajo metabolismo en ensayos recientes sugieren la capacidad de este hongo de entrar en estado de dormancia (**Alanio et al., 2015**); de hecho en los pacientes no inmunodeprimidos la afectación puede progresar, regresar espontáneamente o permanecer estable durante períodos largos de tiempo sin presentar síntoma. En los pacientes inmunodeprimidos, la afectación puede ser desde asintomática a grave, teniéndose que sólo el 5-25% de los enfermos de sida presenta tos y disnea, y en pocas ocasiones existe dolor pleural y alteraciones radiológicas. La mortalidad puede llegar al 42% en este tipo de pacientes (**Miró et al., 1997**).

Las basidiosporas (1-2 μm) y las levaduras deshidratadas ($\sim 3 \mu\text{m}$) son consideradas la principal fuente de infección de *C. neoformans*, debido a que su tamaño inferior comparado al de las levaduras activas (4-10 μm) facilita la entrada profunda y su depósito en los alveolos pulmonares (**Konstad, et al., 2011**). Sin embargo, en modelos de infección en ratones de laboratorio se ha logrado infectar los pulmones con esporas y células tipo levaduras, encontrándose que la producción de levaduras recolectadas a los tres y cinco días de infección fue diez veces mayor en pulmones de ratones infectados con levaduras (**Velagapudi et al., 2009**).

Como factores de virulencia de *C. neoformans* tenemos su cápsula de polisacáridos (**Cherniak y Sunstrom, 1994; Bose et al., 2003**) y su capacidad de producir melanina a partir compuestos fenólicos como las catecolaminas dopamina, epinefrina y norepinefrina, mediante la actividad de la enzima asociada a la pared celular, fenoloxidasa (**Williamson, 1994; Butler, 1998; Canelo y Casquero, 2000; Zhu et al., 2001**). *Cryptococcus neoformans* es la única levadura patógena capaz de realizar dicho metabolismo, lo que le permite crecer en medios ácidos (**García-Rivera et al., 2005**). Estas células ricas en melanina son más resistentes a ser fagocitadas por macrófagos (**Wang et al., 1995**); de hecho, cepas de *C. neoformans* incapaces de producir melanina fueron significativamente menos virulentas en modelos de infección en ratones (**Salas et al., 1996**).

La infección inicial ocurre muchas veces en la niñez (**Goldman et al., 2001**), y los síntomas pueden ser: dolor de cabeza, náuseas, mareos, rigidez de cuello, fiebre, visión borrosa y alteración del estado mental del individuo afectado; también puede no producir síntomas. Las levaduras en el alveolo pulmonar son controladas por el sistema inmune con la formación de granulomas e inmunidad adaptativa produciendo anticuerpos contra proteínas de *C. neoformans*. Desde este punto, como se ha demostrado en estudios epidemiológicos (**Droner et al., 1992, García-Hermoso et al., 1999; Chen et al., 2000**) la levadura se mantiene invisible y la infección es latente hasta que ocurra una inmunodepresión. Una vez ocurrida la inmunodepresión, la levadura se reactiva y replica en los pulmones causando infección pulmonar y neumonía, diseminándose desde ahí por el torrente sanguíneo hacia otros órganos incluyendo el sistema nervioso central, causando meningoencefalitis (**Konstad, et al., 2011**).

Se ha encontrado que la resistencia a la infección parece depender de la activación de los macrófagos y neutrófilos por los linfocitos más sensibilizados, siendo además necesaria una buena respuesta humoral con anticuerpos opsonizantes (**Miró et al., 1997**). Por otro lado en el caso de pacientes inmunocomprometidos el hongo no encuentra resistencia; y el tropismo por el sistema nervioso central (SNC) puede explicarse por tres principales motivos: la capacidad del hongo de transformar neurotransmisores en melanina; por la protección que provee la barrera hematoencefálica (BHE), donde la respuesta inmune del hospedero es notablemente menor a la del resto del organismo; y a la capacidad de *C. neoformans* de mantenerse y multiplicarse en ambientes hipóxicos (1% O₂ y 5% CO₂ a 37°C) similares a condiciones cerebrales (**Lin y Heitman, 2006**).

En condiciones experimentales *C. neoformans* se adhiere a células pulmonares y gliales, así como a células endoteliales de capilares del SNC. *C. neoformans* logra desencadenar la formación de protrusiones similares a microvellosidades desde la capa de células de la microvasculatura endotelial, generando una vía transcelular sin alterar la integridad de la capa de células, originando subsecuentemente una invasión de las meninges (**Chang et al., 2004**). Otro mecanismo de ingreso al SNC observado es el llamado “Caballo de Troya”, donde se internaliza a *C. neoformans* en células circulantes mononucleadas que podrían facilitar el ingreso del patógeno a través de la BHE promoviendo de esta manera el

desarrollo de una meningitis y colonización del parénquima cerebral (**Lin y Heitman, 2006**).

Las manifestaciones clínicas varían en función del tipo de enfermo. La aparición de la enfermedad suele ser aguda en pacientes con sida, en tratamiento con corticoides o que sufren neoplasias hematológicas, mientras que en los restantes suele presentarse de una forma más crónica (**Miró et al., 1997**). La mayoría de los pacientes presenta signos inespecíficos de fiebre, malestar general y cefalea. Los hallazgos físicos tampoco aportan mucho, porque los signos meníngeos son poco frecuentes, al igual que los signos neurológicos focales o las convulsiones.

2.1.3 Tratamiento de la criptococosis

El tipo de tratamiento dependerá del compromiso del sistema nervioso central (SNC) del paciente. En casos donde no hay compromiso del SNC suele utilizarse fluconazol vía oral 400 mg diariamente por 12 semanas. En casos donde haya compromiso del SNC (ocurrencia en pacientes con VIH principalmente) se indica una primera fase de inducción con anfotericina B vía endovenosa (EV) a dosis de 0,7 mg/kg diario combinado con 5-fluocitosina EV a dosis de 100 mg/ kg para lograr una esterilización más rápida del LCR. Estos fármacos se dividen en cuatro dosis por dos semanas, seguidos por una fase de mantenimiento con fluconazol 400 mg a 800 mg vía oral (VO) diarios por un mínimo de 8 semanas (**Perfect et al., 2010**).

En el caso de pacientes negativos a VIH y que presentan compromiso del SNC se prolonga fase de inducción por 4 semanas. En pacientes en los cuales el LCR se torna estéril a las dos semanas podría sustituirse el anfotericina B por anfotericina B liposomal las últimas dos semanas. De no lograrse la esterilización del LCR y el paciente presentara complicaciones neurológicas, la fase de inducción se debe prolongar por 6 semanas (**Castañeda y Lizarado, 2012**).

En los pacientes con VIH que han completado las 10 semanas de tratamiento se administran dosis de fluconazol de 200 mg por día de manera indefinida o hasta que se produzca una mejora de su inmunidad (**Kaplan et. al, 2009**).

2.2 La *Columba livia domestica*

La paloma (*Columba livia domestica*) fue una de las primeras especies animales en ser domesticadas por el hombre; el dato más antiguo que apoya esta teoría son pinturas murales en la región de Mesopotamia en el año 3000 a.C. En dicha época la importancia principal de las palomas fue la de fuente de alimento, y luego, el uso de sus heces como abono.

El ancestro de la paloma doméstica, la llamada paloma de las rocas, tiene como hábitat la zona mediterránea (norte de África y sur de Europa), y el Medio Oriente. Culturas ancestrales como la persa, mesopotamia, egipcia, griega y romana, que se desarrollaron en estas zonas llevaron a la paloma doméstica hasta los lugares donde se expandían sus territorios. Más tarde la paloma llegó junto con el hombre a América, Oceanía y regiones antes inexploradas de Asia. Hoy en día la paloma doméstica es un ave cosmopolita, encontrándose en todas aquellas regiones del mundo donde haya llegado el hombre; sin embargo escasean en zonas polares, desiertos y en áreas en las que la población humana no es elevada (**Timmermann, 2016**).

2.2.1 La paloma mensajera

La paloma mensajera (Figura 2) es una de las 1106 razas de palomas reconocidas en el mundo (**Timmermann, 2016**). Se originó alrededor del año 1800 a partir de palomas procedentes de Persia, Bélgica e Inglaterra. Se formaron dos líneas, una en Bélgica y otra en Inglaterra con influencia de la mensajera persa (Persian carrier) y la mensajera alemana (German homers), obteniéndose la paloma más rápida que haya existido. El peso de estas palomas oscila entre los 397 g y 524 g. No debe tener ornamentos. Se exige que tenga un plumaje liso y patas libres de plumas. Existen todos los colores y patrones. Cualquier otro accesorio es indeseado. El uso primordial que se le dio a estos animales desde sus inicios fue el de enviar mensajes desde lugares alejados hasta su palomar. El uso de palomas fue constante para el envío de titulares de diarios y transacciones financieras en Europa hasta la invención del telégrafo (**Blechman, 2006**).

Las palomas mensajeras son consideradas animales deportivos cuya característica principal es un regreso rápido al palomar después de una suelta a distancia. La psiquis que caracteriza a esta raza es la necesidad de volver a su palomar; una vez dentro son mantenidas ahí hasta la próxima suelta. Esta necesidad natural de volver a su palomar, muy diferente a las palomas de Castilla (**Edrich y Keeton, 1977**), es satisfecha por la habilidad de estos animales de usar cinco herramientas estudiadas científicamente: orientación por la posición del sol; memorización de objetos en la ruta; detección de partículas de olor en el aire; orientación por el uso de magnetorreceptores en bordes del pico; y elaboración de rutas habituales desde puntos conocidos (**Biro et al., 2007; Fleissner et al., 2003; Gagliardo et al., 2002; Meade et al., 2005; Cook et al., 2005**). Estos animales son mantenidos en palomares de carrera toda su vida y están sujetos a un manejo zootécnico y sanitario. Al ser el elemento central de un deporte (las carreras de palomas), las aves se ejercitan diariamente en vuelos sobre el palomar o a través de sueltas desde distancias alejadas realizadas por parte de los criadores (colombófilos).

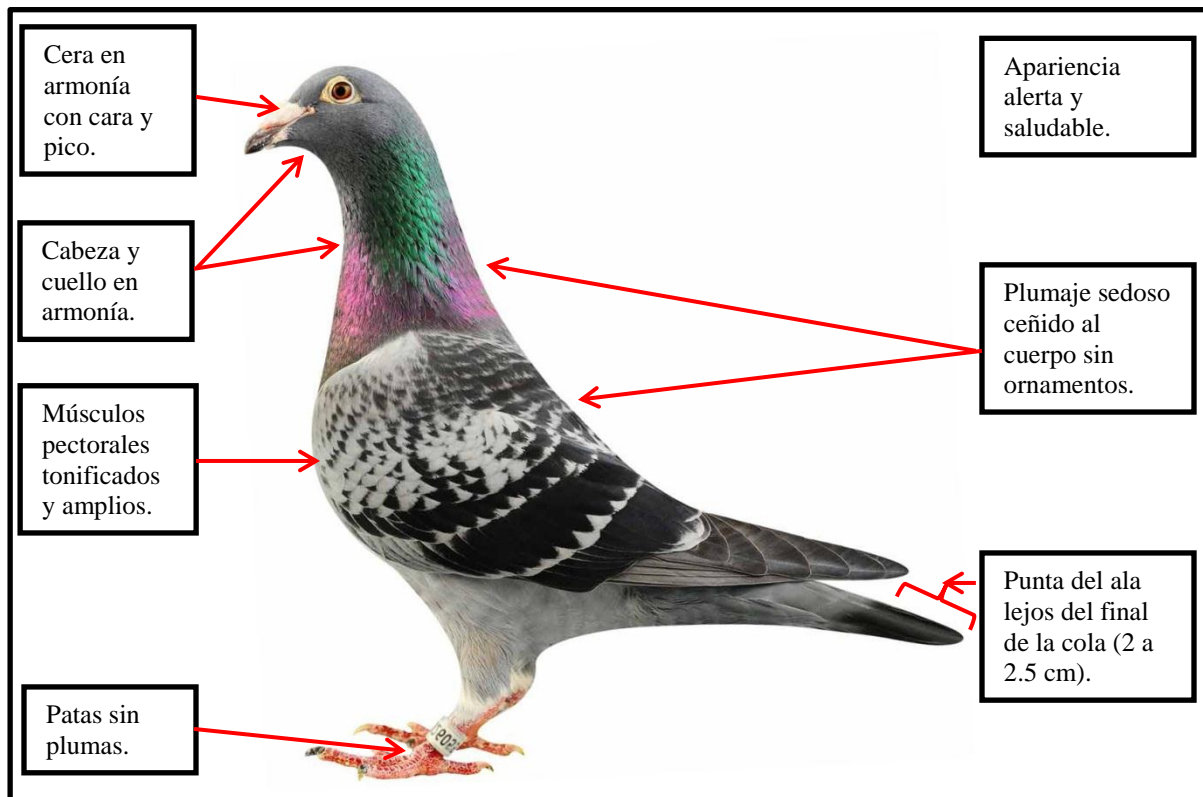


Figura 2: Características físicas de la paloma mensajera.

2.2.2 La paloma de Castilla

Como consecuencia de la domesticación de la paloma de las rocas (*Columba livia*) se forma la paloma doméstica (*Columba livia domestica*) y sus diferentes razas. Este animal está distribuido por todo el mundo debido a la colonización de nuevas tierras principalmente por parte de países europeos (**Blechman, 2006**). Así como en otras especies de animales domésticos, el proceso de cruce y selección derivó en la formación de razas. Estas razas de palomas tuvieron diferentes fines, como: animales de consumo, animales de exhibición, y animales de uso deportivo (**Timmermann, 2016**). A consecuencia de escapes de animales de sus palomares y las cruces de estos, se obtienen las palomas de “Castilla” (Figura 3) o de catedral, animales de origen doméstico que están en vida libre en las ciudades (condición de asilvestrados).

Las palomas de Castilla tienen un comportamiento heredado de su ancestro, la paloma de las rocas, que consiste en anidar en lugares altos donde existan grietas en las que puedan posarse y anidar, comportamiento que difiere del de las palomas mensajeras (**Edrich y Keeton, 1977**). Su calidad de animal doméstico es un factor importante para que estas aves busquen alimento cerca del hombre; así como la arquitectura de las grandes iglesias de plazas centrales donde las palomas pueden descansar y anidar (**Rose et al. 2006**).

Las palomas de Castilla no se alimentan únicamente en el lugar cercano a la zona de anidación, en cambio pueden viajar 2 kilómetros hasta lugares fuentes de alimento, con una distancia máxima de viaje de 25 kilómetros (**Rose et al., 2006**). Estos animales tienen la capacidad de reconocer los múltiples lugares de fuente de alimento y analizar la población de palomas de cada uno de éstos, situándose en el lugar más conveniente, resultando en una distribución homogénea en cada uno de los sitios de alimentación, de manera que la competencia se hace menor (**Lefebvre, 1983**).

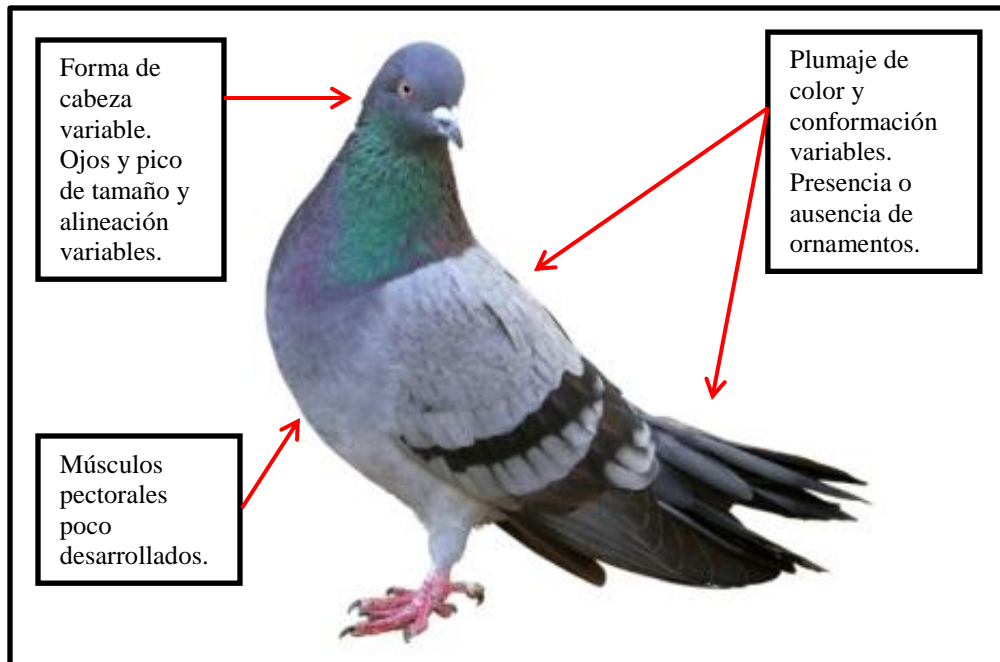


Figura 3: Características físicas de la paloma de Castilla. Fuente: Thinkstock.

2.4 EL SER HUMANO EN RIESGO

La criptococosis ha sido relacionada con la epidemia del VIH desde los primeros casos reportados (**Kronstad *et al.*, 2011**). Entre los años 1992 y 1994 se realizó un estudio en 1083 casos de criptococosis, encontrándose que el 86% de individuos que presentaron la enfermedad, eran también portadores del virus del VIH (**Hajjeh *et al.*, 1999**).

En este mismo estudio se encontró que entre las personas no infectadas con el virus del VIH la incidencia de criptococosis tuvo un rango de 0.2 a 0.9/100,000. Por otro lado, el análisis de casos y controles (158 casos y 423 controles) reveló que el fumar y ocupaciones al aire libre tuvo una asociación significativa de aumento del riesgo de contraer la enfermedad; mientras que personas que tuvieron terapia antifúngica con fluconazol tuvieron menor riesgo de infección.

La criptococosis no se relaciona únicamente con personas infectadas con el virus del sida, sino que también a individuos inmunodeprimidos por diversas situaciones, como: bajo terapias de corticoides para mantener órganos trasplantados, pacientes con tratamientos

antineoplásicos, o simplemente personas con niveles de linfocitos CD4 por debajo de 100 células por mm^3 (CDC, 2010).

Sumado a estos factores de riesgo relacionados al individuo, están los factores relacionados al ambiente, es decir, visitar o vivir cerca de lugares donde se acumulen heces de aves, especialmente domésticas (palomas asilvestradas o en palomares con baja frecuencia de limpieza, canarios y aves de corral) (Criseo *et al.*, 1995; Kuroki *et al.*, 2004) aumenta la probabilidad de inhalar partículas aéreas del hongo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN Y AMBIENTE

Esta investigación se llevó a cabo en lugares públicos de varios distritos de la provincia y departamento de Lima, donde se congregan grandes cantidades de palomas domésticas de vida libre (*Columba livia domestica*), así como en palomares de la Asociación Peruana de Colombófilos – APCO (Figura 4), en los que se crían palomas mensajeras (*Columba livia domestica*).

La provincia de Lima tiene una extensión de 2812 km² y está localizada a orillas del Océano Pacífico, a los 12°02'35" Latitud Sur y 77°01'41" Longitud Oeste. Limita por el Este con las estribaciones de la Cordillera de los Andes y por el Oeste con el Océano Pacífico. La altitud es de 154 m.s.n.m., en promedio, con una temperatura mínima de 13 °C y una máxima de 30 °C y una humedad relativa promedio de 88%. Se puede dividir el año en dos estaciones: verano de diciembre a abril e invierno de junio a octubre, siendo mayo y noviembre meses transicionales (MINAM, 2016).

Los lugares de toma de muestras de heces de palomas de Castilla fueron espacios públicos donde palomas domésticas de vida libre acuden a comer durante ciertas horas del día, y

otras anidan también ahí. Los lugares fueron principalmente frontis e interiores de iglesias del distrito de Cercado de Lima, a los que se denominó: Iglesia 1, Iglesia 2, Iglesia 3, e Iglesia 4. El quinto espacio público fue una granja interactiva, ubicada en el distrito de Pachacámac, donde se tiene casilleros de ladrillo a manera de nidas donde las palomas pernoctan y se reproducen, al que se denominó “Lugar público 1”. Por otro lado, las muestras de heces de palomas mensajeras fueron tomadas de palomares especializados de la Asociación Peruana de Colombófilos – APCO, ubicados en domicilios privados en zonas urbanas, distribuidos de la siguiente manera: Palomar 1, 3 y 4 en el distrito de Santiago de Surco; y el palomar 2 ubicado en el distrito de Miraflores.



Figura 4: Mapa de ubicación de los puntos de toma de muestra.
Fuente: Elaboración propia.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

La especie en estudio fue la paloma doméstica (*Columba livia domestica*). Dentro de esta especie se estudiaron dos poblaciones diferentes: por un lado las palomas mensajeras, criadas en palomares de carrera normalmente edificados en el mismo domicilio de los criadores, animales con un manejo zootécnico y sanitario; y por otro lado las palomas domésticas en estado de asilvestradas (o de Castilla), animales de vida libre cuyo crecimiento poblacional no es determinado por un criador, sino por los recursos que éstos encuentren.

Estas dos poblaciones se clasificaron en: (a) la población no finita de palomas de Castilla, de donde se tomaron muestras de heces del suelo donde anidan; y (b) la población finita de palomas de la Asociación Peruana de Colombófilos – APCO de donde se tomaron muestras de suelo y nidales del palomar de carrera.

Para determinar el tamaño de la muestra de estudio se toma la referencia del trabajo de determinación de presencia de *C. neoformans* en la ciudad de Ica (**Curo et al., 2005**) en el que se obtuvo como resultado 12.5%, teniendo en la fórmula:

- **Población no finita**

$$n = \frac{Z^2 \frac{\alpha}{2} p(1 - p)}{E^2}$$

Donde:

n: Tamaño mínimo de muestra.

p: Proporción de ocurrencia del evento del estudio.

1 – p: Proporción de ocurrencia del evento del estudio.

E: Error muestras admisible (5%)

Z: Valor del nivel de confianza al 95%

$$n = \frac{(1.96)^2 \times 0.125(1-0.125)}{(0.05)^2} = 168.07, \text{ que equivale a } 169.$$

Resultan 169 muestras como mínimo, sin embargo se tomó 180 muestras por oportunidad y disponibilidad de recursos. El muestreo fue realizado en lugares públicos de la ciudad de Lima, principalmente iglesias del centro histórico, denominadas “Iglesia” seguida del número correspondiente, y un centro de esparcimiento para niños denominado “Lugar público” ubicado en el distrito de Pachacámac. El número de muestras por espacio público fue calculado por amplitud de área del muestreo, y la distribución de la toma de muestras fue la siguiente: Iglesia 1 (n=30), Iglesia 2 (n=40), Iglesia 3 (n=12), Iglesia 4 (n=30) y Lugar público 1 (n=68). El tipo de muestreo fue dirigido por ubicación y se tomó heces de suelo y nidos de palomas. Las heces escogidas fueron secas, condición que favorece la presencia del hongo.

En el caso de la población finita (palomas mensajeras), se contó con cuatro palomares, cuyas poblaciones fueron: Palomar 1 (N=300), palomar 2 (N=23), palomar 3 (N=46), y palomar 4 (N=50), teniendo la siguiente fórmula.

- **Población finita:**

$$n = \frac{NZ^2pq}{d^2(N - 1) + Z^2pq}$$

Donde:

n: Tamaño mínimo de muestra.

N: Tamaño de la población de estudio.

p: Proporción de ocurrencia del evento del estudio.

1 – p: Proporción de ocurrencia del evento del estudio.

d: Error muestras admisible (5%)

Z: Valor del nivel de confianza al 95%

$$n = \frac{(1.96)^2 \times 0.125(1-0.125)(419)}{(419-1)(0.05)^2 + (1.96)^2 \times 0.125(1-0.125)} = 120.15, \text{ que equivale a } 121.$$

Resultan 121 muestras como mínimo, siendo el tamaño de muestra ajustado de 123. Por razones de oportunidad de toma de muestras, el tamaño de muestra obtenido fue de 130. El tipo de muestreo fue dirigido por ubicación y se tomó muestras de heces del suelo y nidos

de palomas. Las heces escogidas fueron secas, condición que favorece la presencia del hongo.

Los palomares muestreados 1, 3 y 4 estaban ubicados en el distrito de Santiago de Surco, mientras que el “Palomar 2” en el distrito de Miraflores. El número de muestras tomadas de cada palomar correspondió al número de palomas del mismo, teniendo: Palomar 1 (n=90), Palomar 2 (n=10), Palomar 3 (n=15), Palomar 4 (n=15).

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

La investigación es de tipo descriptiva, prospectiva, observacional y de orden transversal.

3.4 ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos se ingresaron en una planilla de Microsoft Excel® y se analizaron mediante estadística descriptiva, haciendo uso de tablas. Se hizo un análisis estocástico mediante distribución Beta Pert con uso de @Risk 5.5®.

3.5 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Cryptococcus neoformans*

3.5.1 Toma de Muestras

Las muestras de heces fueron tomadas del piso, nidales y paredes de palomares de la Asociación Peruana de Colómbófilos – APCO; así como del piso, zonas de descanso y nidales donde viven palomas de Castilla. Las muestras fueron colectadas en bolsas de cierre hermético de primer uso conteniendo cada una aproximadamente de 20 g a 100 g de heces secas. Se transportaron a temperatura ambiente, y fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Científica del Sur el mismo día.

Como medidas de seguridad, se usó la siguiente protección: mameluco descartable marca Dupont, para evitar transportar partículas contaminantes en la ropa; mascarillas

descartables marca Segre; así como guantes descartables marca TouchNTuff. Estos últimos fueron usados también durante el procesamiento de las muestras.

3.5.2 Procesamiento de muestras

Se procesó las muestras en base a la técnica descrita por Cermeño (2006), tomando 1 g de heces de cada muestra y se disolvieron en 10 ml de solución salina estéril al 0.85%. Se agitó la mezcla con ayuda de un agitador eléctrico por cinco minutos, dejando luego reposar por 30 minutos. Luego se tomó 0.1 ml del sobrenadante que se sembró en Agar Sabraud Dextrosa (ASD) con cloranfenicol en pico de flauta en tubos Falcon de 50 ml.

3.5.3 Siembra en tubos

Con una micropipeta se tomó 0.1 ml del sobrenadante y se sembró en tubos Falcon de 50 ml con Agar Sabraud Dextrosa (ASD) con cloranfenicol en posición de pico de flauta y se cultivó por dos a diez días en estufa a 37 °C (**Kaufmann y Merz, 1982; Casquero y Canelo, 2000**). Las colonias características se utilizaron para realizar en primer lugar las pruebas microscópicas y luego las pruebas bioquímicas correspondientes.

3.5.4 Identificación macroscópica

3.5.4.1 Observación macroscópica de colonias y crecimiento a 37 °C

El objetivo fue determinar si las colonias correspondían a cepas de levaduras, tomando las siguientes consideraciones: el medio de cultivo que se empleó para el aislamiento primario fue el Agar Sabraud Dextrosa (ASD) con cloranfenicol. Las colonias de levaduras elegidas crecieron a 37 °C, factor diferencial para *Cryptococcus neoformans* (**Perfect et al., 2010**); fueron ligeramente abombadas o planas, de consistencia mantecosa, lisas, con olor agradable y color blanco – crema, según lo recomendado por el Instituto Nacional de Salud - INS (2007).

3.5.4.2 Observación de la cápsula en tinta china

Es un método de contraste. Permitió visualizar la cápsula de polisacárido de *Cryptococcus neoformans*, mediante la presencia de un halo claro y nítido alrededor de la levadura. Microscópicamente las células de *Cryptococcus neoformans* se caracterizan por presentar una cápsula de polisacárido visible al examen directo con tinta china (INS, 2007). Se tomó una muestra de la colonia previamente observada macroscópicamente y se traspasó a una lámina portaobjeto. Se procedió a añadir unas gotas de tinta china y se visualizó al microscopio a un aumento de 100X.

3.5.5 Identificación bioquímica

Luego de identificar macroscópicamente el crecimiento de colonias blancas mucoides a los dos días de sembrado a 37 °C, y observar microscópicamente la cápsula por examen directo de contraste con tinta china, se procedió a la inoculación de las colonias de levaduras (positivas a la prueba de observación de la cápsula en tinta china) en diferentes medios e interpretación de las pruebas bioquímicas necesarias para la identificación microbiana, considerando positivos a *Cryptococcus neoformans* los resultados siguientes: positivo a reacción de ureasa, positivo a reacción fenoloxidasas; y negativo a los siguientes: negativo a la reducción de nitratos, negativo a cambio de color en agar Cavanina, Glinica, Azul de Bromotimol (CGB).

3.5.5.1 Prueba de la enzima ureasa

Es una de las pruebas más usadas en hospitales para diagnosticar criptococosis. Se basa en la capacidad de la levadura de producir la enzima ureasa, que transforma la urea en dióxido de carbono y amonio, incrementando el pH del medio y produciendo un cambio de color rojo-púrpura en el indicador rojo fenol (INS, 2007).

Se tomó una azada de las colonias positivas a la prueba de identificación de la cápsula en tinta china y se incubó en medio Christensen a 37 °C por 6 horas. En las muestras ureasa positivas se observó un cambio de color a rojo púrpura antes de las seis horas de incubación.

3.5.5.2 Prueba de asimilación de carbohidratos

Los patrones de asimilación de azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, galactosa y rafinosa) permiten identificar las diferentes especies como *Cryptococcus sp*, *Candida sp*, *Rhodotorula rubra*, *Trichosporon sp* *Geotrichum sp*.

Interpretación: positivo, viraje del color del medio de cultivo hacia el amarillo; negativo, no se produce viraje de color, permaneciendo el color del medio de cultivo en morado o púrpura (INS, 2007).

Una vez terminada la prueba de la enzima ureasa, se tomó una azada de las muestras que resultaron positivas (a la vez resultaron positivas a la prueba de identificación de la cápsula en tinta china) y se incubó en agar tres azúcares, glucosa, sacarosa y lactosa, resultando positivas a glucosa y sacarosa, y negativas a lactosa.

3.5.5.3 Prueba de reducción de nitratos

Prueba que consiste en determinar la capacidad que tienen algunas cepas de levaduras de producir nitritos a partir de nitratos (presencia de enzima nitrato reductasa). El hongo *C. neoformans* carece de esta enzima, por lo que el resultado negativo será compatible con este hongo.

Se cogió con ayuda de un hisopo colonias positivas a la prueba de identificación de la cápsula usando tinta china, aisladas de un cultivo de entre 2 y 10 días de crecimiento en ASD con cloranfenicol. El hisopo inoculado se presionó con firmeza contra el fondo de un tubo vacío para que se desprendan los microorganismos contenidos en la fibra de algodón. Luego se procedió a incubar el tubo con el hisopo a 45°C por diez minutos. Se sacó el hisopo y se agregó al tubo dos gotas de alfa – naftilamina (reactivo A) y dos gotas de ácido sulfanílico (reactivo B). El hisopo se reintrodujo en el tubo para que absorba los reactivos (INS, 2007).

El resultado de la prueba de reducción de nitratos fue negativo, dado que se mantuvo el color original blanquecino de las colonias.

3.5.5.4 Prueba de la enzima fenoloxidasa

Se midió la capacidad de *C. neoformans* de formar un pigmento marrón o negro denominado melanina, a partir de compuestos difenólicos. La producción de este pigmento mediante la prueba de L – DOPA (Sigma-Aldrich®) citrato férrico (**Chaskes, Edberg y Singer, 1981**), es realizada por la acción de la enzima fenoloxidasa. La reacción positiva se evidenció con la producción de un pigmento marrón oscuro o negro grisáceo sobre la colonia de *C. neoformans* (**Eisenman et al., 2007**).

Las colonias usadas en esta prueba fueron positivas a la identificación de la cápsula usando tinta china y a la prueba de la ureasa; y negativas a la prueba de asimilación de nitratos. El procedimiento consistió en inocular una azada de cada una de las colonias de levaduras sobre la superficie de cuadrados de 2 cm² de papel Whatman previamente esterilizado en autoclave. Se inoculó 2 a 3 gotas de la solución L-DOPA (3.0 mg/ml) citrato férrico en cada papel y se incubó a 28°C por un tiempo máximo de 18 horas, esperando la producción del pigmento (**Chaskes, Edberg y Singer, 1981**). Dado que *C. neoformans* es un hongo productor de la enzima fenoloxidasa, se consideró positivas a todas las muestras que produjeron una tinción marrón oscura dentro del tiempo programado de 18 horas.

3.5.5.5 Siembra en Agar CGB

Se realizó el experimento en medio canavanina glicina azul de bromotimol sódico (CGB) para diferenciar *Cryptococcus neoformans* de *Cryptococcus gattii* (**Kwon-Chung et al, 1981**), tomando una azada de las colonias y sembrándola en el medio CGB (Hardy Diagnostics®), incubándose a 28 °C por cinco días. Este medio emplea Glicina como única fuente de carbono y nitrógeno; la droga que ayuda a la tipificación de ambas variedades es el Sulfato de L-Canavanina y el indicador es el Azul de Bromotimol Sódico. La diferenciación bioquímica de *C. neoformans* y *C. gattii* con el uso del medio CGB se debe a que 28,0 a 33,0% del serotipo A es sensible a $\leq 5\text{mg/L}$ de canavanina y 100,0% del serotipo D es sensible a esta concentración de la droga. De los aislamientos del serotipo A resistentes a canavanina, 10,0 a 20,0% son capaces de asimilar la glicina; sin embargo,

éstos no crecen cuando son cultivados sobre el medio que contiene ambos compuestos. Solamente 11,0% de los aislamientos serotipo D utilizan la glicina, pero todos son sensibles a la canavanina; en cambio, 100,0% de las cepas de *C. gattii* (serotipos B y C) resisten la canavanina hasta o excediendo los 960 mg/l y asimilan la glicina (concentración de canavanina en el medio CGB: 30mg/l). Luego del metabolismo de este componente se forma amonio, el cual alcaliniza el medio haciendo virar el indicador hacia un color azul cobalto (Canelo *et al.*, 1999).

IV. RESULTADOS

Se evaluó 310 muestras de heces secas de palomas domésticas (*Columba livia domestica*) recolectadas en lugares públicos y palomares de la ciudad de Lima – Perú, durante el período de octubre de 2015 a enero de 2016. Se determinó una presencia de 5.16% (16/310) con un IC_{95%}: 2.7% - 7.62% de muestras positivas a *Cryptococcus neoformans*. Las muestras corresponden a dos grupos de palomas, palomas de Castilla y palomas mensajeras, en estos grupos de evaluación se determinó una proporción de 8.89% (16/180) con un IC_{95%}: 4.73% - 13.05% y de 0% (0/130) de muestras positivas a *Cryptococcus neoformans*, respectivamente (Cuadro 1). Para el muestreo se consideró lugares de muestreo según a el tipo de paloma: (1) grupo de palomas de Castilla en estado asilvestradas (n=180), cuyas excretas fueron recogidas de lugares públicos: Iglesia 1 (n=30), Iglesia 2 (n=40), Iglesia 3 (n=12), Iglesia 4 (n=30), Lugar público 1 (n=68); (2) palomas Mensajeras (n=130), cuyas excretas se recogieron estrictamente de los palomares donde se les cría: Palomar 1 (n=90), Palomar 2 (n= 10), Palomar 3 (n=15), Palomar 4 (n=15). El cuadro 1 muestra a detalle los resultados obtenidos.

Además, se realizó un modelo de distribución estocástica con el programa para análisis de riesgo @Risk 5.5® (1000 interacciones), con la intención de obtener una curva de distribución de la proporción de resultados positivos a *Cryptococcus neoformans*, bajo el supuesto que las condiciones en las que se realizó el muestreo se mantienen invariables. Se determinó un intervalo al 95% de muestras positivas de 4.74% y 5.46%, para los dos tipos de palomas evaluadas (Figura 5). Según el tipo de paloma evaluada la distribución estocástica determinó un rango de intervalo al 95% de muestras positivas de 8.26% y 9.52% (Figura 6). Para las palomas mensajeras no se determinó muestra positiva a *Cryptococcus neoformans*.

Cuadro 1. Proporción hallada de muestras positivas a *Cryptococcus neoformans* según lugar de muestreo por tipo de paloma evaluada.

| Tipo de Paloma | Lugar de muestreo | Positivo | Negativo | Total | Proporción | Intervalo de Confianza al 95% | |
|---------------------|-------------------|-----------|------------|------------|--------------|-------------------------------|--------------|
| | | | | | | Mínimo | Máximo |
| Palomas de Castilla | Iglesia 1 | 10 | 20 | 30 | 33.33% | 16.46% | 50.20% |
| | Iglesia 2 | 1 | 39 | 40 | 2.50% | 0.00% | 7.34% |
| | Iglesia 3 | 1 | 11 | 12 | 8.33% | 0.00% | 23.97% |
| | Iglesia 4 | 0 | 30 | 30 | 0.00% | 0.00% | 5.00%* |
| | Lugar público 1 | 4 | 64 | 68 | 5.88% | 0.29% | 11.47% |
| | Sub Total | 16 | 164 | 180 | 8.89% | 4.73% | 13.05% |
| Palomas Mensajeras | Palomar 1 | 0 | 90 | 90 | 0.00% | 0.00% | 5.00%* |
| | Palomar 2 | 0 | 10 | 10 | 0.00% | 0.00% | 5.00%* |
| | Palomar 3 | 0 | 15 | 15 | 0.00% | 0.00% | 5.00%* |
| | Palomar 4 | 0 | 15 | 15 | 0.00% | 0.00% | 5.00%* |
| | Sub Total | 0 | 130 | 130 | 0.00% | 0.00% | 5.00%* |
| TOTAL | | 16 | 294 | 310 | 5.16% | 2.70% | 7.62% |

$$X^2 = 12.1844 \quad p < 0.05$$

*Debido al margen de error de muestreo establecido, se considera un 5% como valor máximo.

Mediante la prueba de Chi cuadrado, se determinó asociación estadística significativa ($p < 0.05$) entre la presencia de *Cryptococcus neoformans* y las palomas de Castilla.

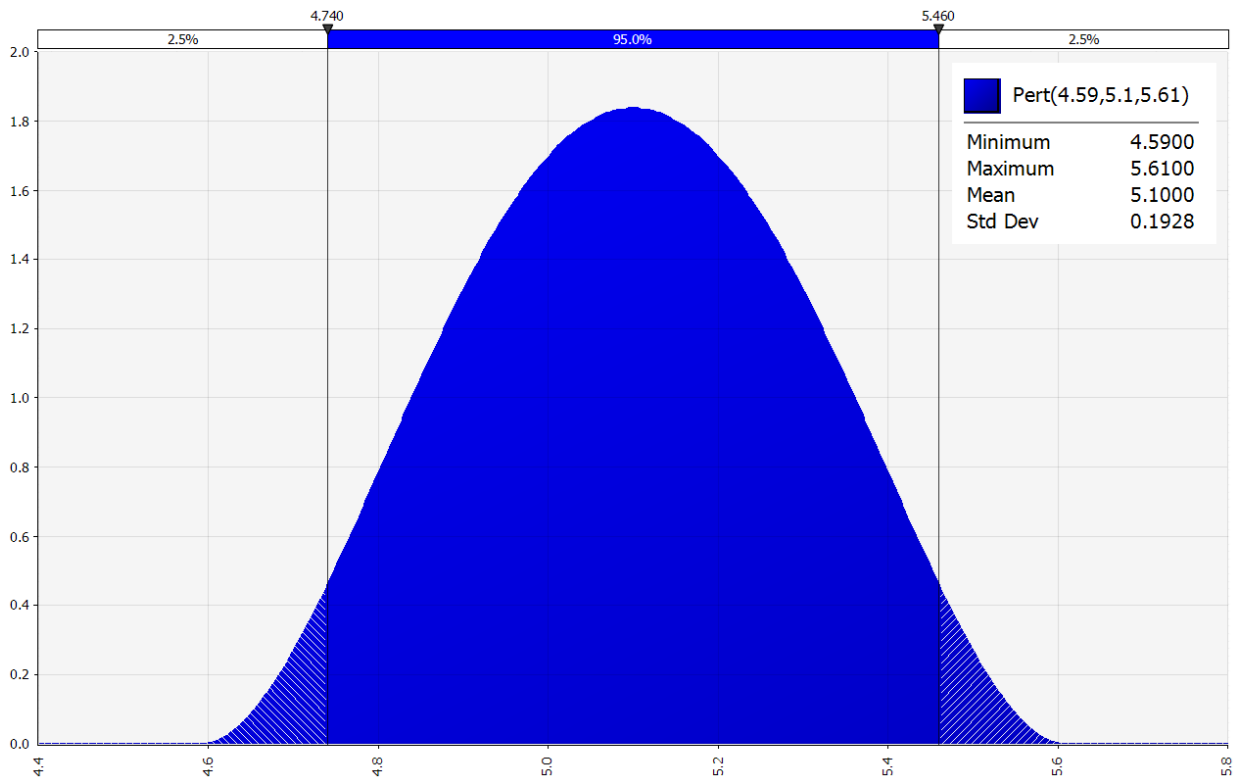


Figura 5. Curva de distribución beta pert para la proporción de *Cryptococcus neoformans* en heces secas de palomas domésticas (*Columba livia domestica*) durante el muestreo 2,015 – 2,016. Mediante el programa de análisis de riesgo @Risk 5.5 ® se realizaron 1000 interacciones, para establecer la presencia mínima y máxima, 4.74% y 5.46%, respectivamente.

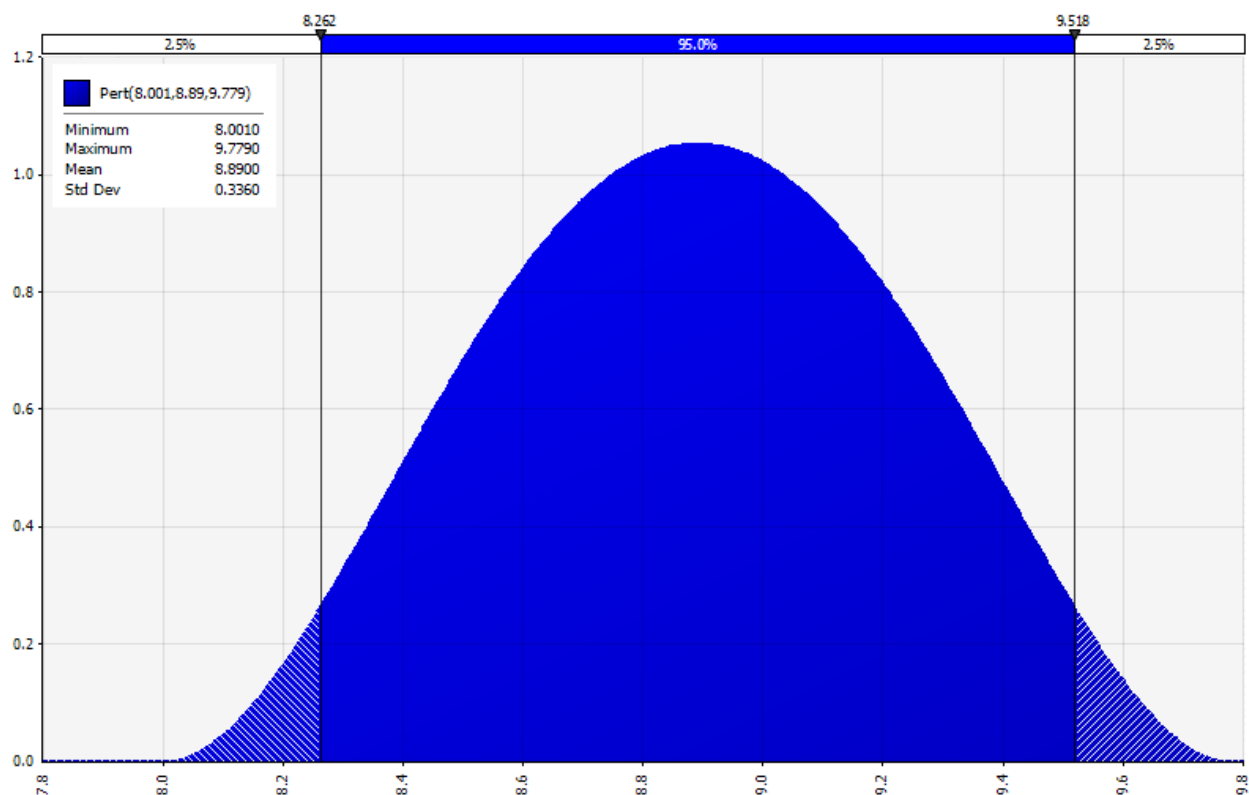


Figura 6. Curva de distribución beta pert para la proporción de *Cryptococcus neoformans* en heces secas de palomas de castilla (*Columba livia domestica*) durante el muestreo 2,015 – 2,016. Mediante el programa de análisis de riesgo @Risk 5.5® se realizaron 1000 interacciones, para establecer la presencia mínima y máxima, 8.26% y 9.52%, respectivamente.

V. DISCUSIÓN

El hongo *Cryptococcus neoformans*, aislado por primera vez de jugo de durazno por Sanfelice (1894), recién toma importancia en salud pública casi un siglo más tarde, en las décadas de 1980 y 1990 con la epidemia del virus del VIH, donde se le relacionó como agente oportunista en individuos que padecían de sida (Levitz, 1991), causando en ellos neumonía seguida de una meningoencefalitis (Konstad *et al.*, 2011). Actualmente, Lin y Heitman (2006), entre otros investigadores, relacionan a este hongo y la enfermedad que éste causa, criptococosis, con personas con compromiso del sistema inmune, no sólo enfermos de sida, sino también pacientes con corticoterapia por trasplantes de órganos y pacientes con enfermedades neoplásicas en tratamiento de quimioterapia.

De acuerdo con el Ministerio de Salud del Perú, se notificó más de 65000 casos de personas infectadas con VIH hasta el año 2016. El 67.55% de estos casos fueron reportados en el departamento de Lima y la Provincia Constitucional del Callao (MINSA, 2016). En Lima se concentra más del 30% de la población del Perú, población habituada a visitar plazas y parques donde habitan palomas de Castilla (también llamadas palomas de plaza o de catedral), animales relacionados a esta enfermedad en cuanto el hongo tiene predilección por desarrollarse en sus heces (así como en heces de otras especies de aves), y propagarse

en polvillo de este sustrato seco vía aérea, modo de infección principal de *Cryptococcus neoformans*. En este estudio se determinó una proporción de 8.9% (16/180) de muestras positivas al hongo en heces de palomas de Castilla de la ciudad de Lima, Perú; mientras que no se encontró a este hongo en heces de palomas mensajeras criadas en palomares de la Asociación Peruana de Colombófilos del Perú – APCO, recintos en los que se cumple un calendario de desinfección con una frecuencia de 7 días. Dicha desinfección consiste en la aplicación de amonio cuaternario, previa remoción de heces del suelo, paredes, posaderos y nidales de los palomares. Las muestras de heces fueron tomadas del suelo, nidales de palomares y lugares frecuentados por las palomas, así como en el estudio realizado por Curo (2005), donde se detectó una frecuencia de 12.5% (7/56) del hongo en excretas en palomares de palomas de Castilla en estado de asilvestradas del perímetro de la ciudad de Ica. Los resultados del estudio de Curo se asemejan a los obtenidos en el presente estudio, ya que en situaciones climáticas similares se halló al hongo en condiciones de protección de la luz dentro de palomares o nidales de la ciudad de Ica, como en el caso de las muestras positivas a *C. neoformans* dentro de las torres de la Iglesia 1.

Por otro lado, Cermeño (2006) encontró en el estado de Bolívar, Venezuela una frecuencia de 1.4% (1/74) de *C. neoformans* en heces de palomas en condiciones de clima tropical. La temperatura en el estado de Bolívar fluctúa entre los 23.8 °C y 28.2 °C, temperaturas superiores a las experimentadas en las fechas de toma de muestras del presente estudio (18 °C a 25 °C en los meses de setiembre a enero). Existe una marcada diferencia en la frecuencia encontrada entre el presente estudio y el de Cermeño que podría atribuirse a la diferencia de clima, principalmente a la precipitación anual, confiriendo mayor humedad en las heces de palomas del estado de Bolívar, por lo tanto una menor propagación del hongo. Sin embargo, el resultado también concuerda con los obtenidos en Lima, en el sentido que la única muestra positiva al hongo en mención del experimento de Cermeño fue obtenida de un lugar público abierto, como es el caso de las muestras positivas obtenidas en los frentes de las Iglesias 2 y 3, y nidos abiertos en el Lugar público 1.

Zarrini (2010) y Soltani (2013) también obtuvieron resultados positivos a *C. neoformans* en Irán. Estos dos estudios tuvieron un muestreo similar al del presente estudio en heces secas de palomas recolectadas en áreas públicas de las ciudades de Ahwaz e Isfahan, donde

determinaron frecuencias de 34% (22/65) y 2.5% (3/120) respectivamente. Zarrini usó las mismas técnicas diagnósticas aplicadas en el presente estudio más una prueba adicional, la prueba de asimilación de inositol, y obtuvo un resultado inesperadamente alto, en comparación con el resultado en Lima, y en otras ciudades como Ica, Bolívar, Isfahan y Nueva York. Este resultado puede atribuirse a las condiciones desérticas de la Ciudad de Ahwaz, con precipitaciones mensuales menores de 10 mm en verano y temperaturas promedio mínima de 19 °C y máxima de 32 °C, óptimas para el desarrollo del hongo; mientras que Soltani sólo usó las pruebas de observación del crecimiento de colonias en agar nutritivo, identificación de la cápsula en tinta china y una prueba RapID para levaduras, con un resultado menor al obtenido en la ciudad de Lima, pudiendo deberse a las temperaturas anuales promedio más bajas en Isfahan (mínima de 9 °C y máxima de 20 °C).

Si bien varias especies del género *Cryptococcus* tienen la habilidad de producir melanina, y crecer en un rango variado de temperatura, sólo dos de estas, *C. neoformans* y *C. gattii*, tienen la capacidad de crecer a temperaturas mayores de 35 °C, razón por la que el crecimiento estandarizado de laboratorio a 37 °C es una de las primeras pruebas diferenciales (**Perfect et al., 2010**); estos autores, aseguran que la máxima temperatura de desarrollo de *C. neoformans* es 40 °C, razón por la cual afecta principalmente a mamíferos y no causa enfermedad en las palomas cuya temperatura corporal promedio es de 41.2 °C. Existen diversas pruebas para la identificación de *C. neoformans*, desde cultivo e identificación, detección del antígeno capsular y diagnóstico molecular, siendo el cultivo y observación microscópica de la levadura métodos confirmatorios recomendados. Entre estos métodos podemos citar el cultivo e identificación, detección del antígeno capsular, diagnóstico molecular y la observación de colonias en agar selectivo (**Saldanha et al., 2009**).

Adicionalmente a estas pruebas estandarizadas, existe constante desarrollo de nuevos métodos para diagnosticar *C. neoformans*, como lo detalla De Paula Menezes (2011), quien usó Metildopa de fácil acceso y bajo costo en farmacias en Brasil. La Metildopa sirvió como sustrato para la producción de melanina, en reemplazo de L- DOPA, insumo de acceso limitado que en el Perú se consigue sólo importándolo.

Desde que Sanfelice (1894) encontró por primera vez *C. neoformans* en jugo de durazno, y posteriormente Emmons (1951) en heces de palomas, la ecología de *C. neoformans* ha sido largamente estudiada. El hongo se puede aislar prácticamente de cualquier lugar del medio ambiente, sin embargo múltiples estudios (Acha *et al.*, 2001; Isfahani *et al.*, 2001; Curo, 2004; Cermeño *et al.*, 2006; Zarrini *et al.*, 2010; Soltani *et al.*, 2013) han demostrado la relación entre la presencia de este hongo y las heces de las palomas de vida libre y su potencial riesgo para la salud pública. Este estudio planteó encontrar la presencia del hongo no sólo en heces secas de palomas de Castilla (de vida libre), sino también en heces secas de palomas mensajeras criadas en palomares con un manejo sanitario planificado que consiste en limpiezas semanales con amonio cuaternario, desinfectante probado por Krangvichain *et al.* (2016) de acción fungicida 100% eficaz contra *C. neoformans*. Los resultados positivos (sólo en heces de palomas de vida libre) se apoyan en los estudios epidemiológicos que sugieren que el asentamiento y crecimiento del hongo se dan en heces frescas, y la propagación del mismo se da en heces secas. Por otro lado, los resultados negativos de presencia del hongo en muestras de piso de palomares de palomas mensajeras sugiere que el manejo sanitario de limpieza y desinfección en estos recintos cada siete días no permite el crecimiento de *C. neoformans* en heces frescas y por lo tanto no propagarse en polvillo de las heces que se desecan. Este resultado negativo no sugiere, sin embargo, que dichos palomares estén exentos de crecimiento del hongo si se retirase el manejo de limpieza y desinfección.

Existen otros reservorios de este patógeno (Cafarchia *et al.*, 2006), como lo detallan Criseo *et al.* (1995), quienes hallaron presencia de *C. neoformans* en heces de canarios criados en el sur de Italia: 26.6% (48/180) de muestras fueron positivas; de las cuales 29.6% (32/108) fueron tomadas en heces de canarios de tienda de mascotas, y 22.2% (16/72) fueron tomadas de heces de canarios de hogares privados. Por otro lado, Kuroki *et al.* (2004) aislaron *C. neoformans* a partir de heces de gallinas de crianza de traspatio en Tailandia, con un frecuencia elevada de 24% (36/150) en temporada seca y 4% (6/150) en la temporada lluviosa. Los hallazgos de la frecuencia de *Cryptococcus neoformans* en heces de otras especies de aves domésticas fueron notablemente superiores a la media de resultados positivos encontrados en heces de palomas a nivel mundial.

VI. CONCLUSIÓN

- Existe presencia de *Cryptococcus neoformans* en heces secas de palomas domésticas (*Columba livia domestica*) con una prevalencia de 5.1% (16/130) con un IC_{95%}: 2.7% - 7.62%; correspondiendo a palomas de Castilla una prevalencia de 8.9% (16/180) con un IC_{95%}: 4.73% - 13.05%, y a palomas Mensajeras 0% (0/130) en Lima, Perú.

VII. RECOMENDACIONES

- Hacer un estudio de mayor dimensión en la ciudad de Lima, de manera que se pueda medir la prevalencia del hongo *Cryptococcus neoformans*.
- Considerar los resultados y discusión descritos en el presente estudio para elaborar programas de salud pública en relación a la restricción y manejo en la crianza de la paloma doméstica (*Columba livia domestica*).

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadi J, Nachman S, Kressel AB, Pirofski L. Cryptococcosis in children with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 1999;28:309–13.
- Acha P, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Volumen I. Bacteriosis y Micosis. Tercera edición. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud; 2001.
- Alanio A, Vernel-Pauillac F, Sturny-Leclère A, Dromer F. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: toward biological evidence of dormancy. *mBio* 2015;6(2).
- Antachopoulos C. 2010. Invasive fungal infections in congenital immunodeficiencies. *Clin Microbiol Infect.* 16:1335–42.
- Baro T, Torres-Rodriguez JM, Hermoso de Mendoza M, Morera Y, Alía C. First identification of autochthonous *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* isolated from goats with predominantly severe pulmonary disease in Spain. 1998;36(2):458-61.
- Bava AJ, Negroni R. Características epidemiológicas de 106 casos de criptococosis diagnosticados en la República Argentina entre 1981–1990. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1992;34:335–40,

- Bava AJ, Negroni R, Robles AM. Características epidemiológicas de 71 casos de criptococosis diagnósticos en diferentes centros asistenciales de la ciudad de Buenos Aires y sus alrededores durante 1991. *Infect Microbiol Clin* 1992;4:85–89.
- Belay T, Cherniak R, O’Neill EB, Kozel TR. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by dot enzyme assay. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34:466–70.
- Biro D; Freeman R; Meade J; Roberts S; Guilford T. Pigeons combine compass and landmark guidance in familiar route navigation. *PNAS.* 2007. 18:7471–76.
- Blechman A. Pigeons. 1st ed. New York: Grove Press Inc.; 2006.
- Bose I., Reese AJ., Ory JJ., Janbon G, Doering TL. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell.* 2003;2:655–63.
- Brandt ME, Hutwagner LC, Klug LA, Baughman WS, Rimland D, et al. Molecular subtype distribution of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34:912–17.
- Buschke A. Uber eine durch coccidien hervergerufene krankheit des menschen. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1895;21:14.
- Busse O. Uber parasitare zelleinschlusse und ihre zuchtung. *Zentralbl. Bakteriol.* 1894;16:175–80.
- Butler M J, Day AW. Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol.* 1998;44:1115–36.
- Cafarchia C, Camarda A, Romito D, Campolo M, Quaglia NC, Tullio D, et al. Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. *Mycopathologia.* 2006;161:229–34.
- Canelo C, Navarro A, Guevara M, Urcia F, Zurita S, Casquero J. Determinación de la variedad de cepas de *Cryptococcus neoformans* aisladas de pacientes con sida. *Rev Med Exp.* 1999; 15 (1-2) : 44-47.
- Canelo C, Casquero J. Fenoloxidasa modificada: clave para identificar cepas de *Cryptococcus neoformans*. *Rev Med Exp.* 2000;17:1-4.
- Casquero J, Guevara M, Urcia F. Guía de prácticas del curso «Enfermedades micóticas emergentes y reemergentes». Lima: Instituto Nacional de Salud; 2000.
- Castañeda E, Lizarazo J. Protocolo de estudio y manejo de los pacientes con criptococosis. *Infectio* 2012; 16 (Supl 3): 123-125.

- Centers for Disease Control and Prevention National Center for Emerging and Zoonotic Infectious. Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases. Cryptococcal screening program, training manual for healthcare providers. Atlanta: CDC; 2010.
- Cermeño JR, Hernández I, Cabello I, Orellán Y, Cermeño JJ, Albornoz R, Padrón E, Godoy G. *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* en excretas de palomas (*Columba livia*) en el Estado Bolívar, Venezuela. *Microbiología*. 2006;48(1).
- Chang YC, Stins MF, McCaffery MJ, Miller GF, Pare DR, et al. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infect. Immun*. 2004;72:4985–95
- Chaskes S, Edberg SC, Singer JM. A DL-DOPA drop test for the identification of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 1981;74:143–48.
- Chee HY, Lee KB. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from pigeon droppings in Seoul, Korea. *J Microbiol*. 2005;43:469–72.
- Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, et al. Epidemiology and host and variety dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. *Clin Infect Dis*. 2000;31:499–508.
- Cherniak R, Sundstrom JB. Polysaccharide antigens of the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun*. 1994;62:1507–12.
- Cook R, Levison D, Gillett S, Blaisdell A. Capacity and limits of associative memory in pigeons. *Psychon Bull Rev*. 2005;12(2):350-58.
- Costa AK, Sidrim JJ, Cordeiro RA, Brilhante RS, Monteiro AJ, Rocha MF. Urban pigeons (*Columba livia*) as a potential source of pathogenic yeasts: A focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. *Mycopathologia*. 2010;169:207–13.
- Courville P, Favennec L, Viacroze C, Barrel A, Young P, Abboud P, et al. Co-existent cutaneous cryptococcosis of the forearm and cutaneous alternariosis of the leg in patient with metastatic thymoma. *J Cutan Pathol*. 2002;29:55–8.
- Criseo G, Bolignano MS, De Leo F, Staib F. Evidence of canary droppings as an important reservoir of *Cryptococcus neoformans*. *Zentralbl Bakteri*. 1995;282(3):244-54.

- Curo M, Salinas M, Casquero J. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas, suelo y aire de los palomares del perímetro urbano de Ica. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2005;22(4).
- Currie BP, Casadevall A. Estimation of the prevalence of cryptococcal infection among patients infected with the human immunodeficiency virus in New York City. Clin Infect Dis. 1994;19:1029–33.
- De Paula Menezes R, Amante Penatti MP, Santos Pedroso R. Different culture media containing methyl dopa for melanin production by *Cryptococcus* species. Soc. Bras. Med. Trop. 2011;44(5).
- Doering T L, Nosanchuk J D, Roberts W K, Casadevall A. Melanin as a potential cryptococcal defence against microbicidal proteins. Med Mycol. 1999;37:175–81.
- Dromer F, Mathoulin-Pélissier S, Fontanet A, Ronin O, Dupont B, Lortholary O. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985–2001): Comparison of the pre- and post-HAART eras. AIDS. 2004;18:555–62.
- Dromer F, Ronin O, Dupont B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from an Asian patient in France: evidence for dormant infection in healthy subjects. J. Med. Vet. Mycol. 1992;30:395–97.
- Edrich W, Keeton . Z. Comparison of Homing Behavior in Feral and Homing Pigeons. Tierpsychol. 1977;44:389-401.
- Eisenman H, Mues M, Weber SE, Frases S, Chaskes S, Gerfen G, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. PubMed. 2007;153:3954–3962.
- Fleissner G, Holtkamp E, Hanzlik M, Winklhofer M, Fleissner G, Wiltshko W. Ultrastructural analysis of a putative magnetoreceptor in the beak of homing pigeons. 2003;458(4):350-60.
- Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. J. Clin. Microbiol. 1999;37:838–40.
- Gagliardo A, Buzynski C, Ioale P, Bingman V. Participation of the homing pigeon thalamofugal visual pathway in sun - compass associative learning. The Journal of Neuroscience. 2002;19(1):311-15.

- Gagliardo A, Ioale P, Savini M, Wild JM. Having the nerve to home: trigeminal magnetoreceptor versus olfactory mediation of homing in pigeons. *Journal of Experimental Biology*. 2006;209(15):2888-92.
- Garcia-Hermoso D, Janbon G, Dromer F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3204–09.
- Garcia-Rivera J, Eisenman HC, Nosanchuk JD, Aisen P, Zaragoza O, Moadel T, Dadachova E, Casadevall A. Comparative analysis of *Cryptococcus neoformans* acid-resistant particles generated from pigmented cells grown in different laccase substrates. *Fungal Genet Biol*. 2005;42(12):989-98.
- Goldman DL, Khine H, Abadi J, Lindenberg DJ, Pirofski La, Niang R, Casadevall A. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics*. *Pub Med*. 2001;107:5.
- Granados DP, Castaneda E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogota, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microb. Ecol*. 2005;49:282–90.
- Hajjeh RA, Conn LA, Stephens DS, Baughman W, Hamill R, Graviss E, et al. Cryptococcosis: Population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus–infected persons. *J Infect Dis*. 1999;179:449–54.
- Horta JA, Staats CC, Casali AK, Ribeiro AM, Schrank IS, Schrank A, et al. Epidemiological aspects of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. *Med Mycol*. 2002;40:565–71.
- Isfahani BN, Shadzi SH, Pour MC, Ilchi N. Isolation and detection of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings: Isfahan and its suburb province pigeon towers. *J Res Med Sci*. 2001;6:20–22.
- Kaplan JE, Benson C, Holmes KH, Brooks JT, Pau A, Masur H. Guidelines for prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep* 2009;58(RR-4):1-207.
- Kaufmann CS, Merz WG. Two rapid pigmentation test for identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 1982; 15(2): 339-41.

- Kaufman L., Blumer S. Cryptococcosis: the awakening giant. En: Pan American Health Organization. Proceedings of the Fourth International Conference on Mycoses: The Black and White Yeasts. Washington, D.C.: PAHO; 1978.
- Khosravi AR. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon (*Columbia livia*) droppings in northern Iran. *Mycopathologia*. 1997;139:93–95.
- Kohno S. Fungal infections in immunocompromised patients. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2000;41:71–76.
- Krangvichain P, Niyomtham W, Prapasarakul N. Occurrence and susceptibilities to disinfectants of *Cryptococcus neoformans* in fecal droppings from pigeons in Bangkok, Thailand. *J Vet Med Sci*. 2016;78(3): 391–396.
- Krockenberger MB, Canfield PJ, Barnes J, Vogelnest L, Connolly J, et al. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in the koala (*Phascolarctos cinereus*): serological evidence for subclinical cryptococcosis. *Med. Mycol*. 2002;40:273–82.
- Kronstad J, Griffiths E, Hu G, Jung W. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nature Review Microbiology*. 2011:23-32.
- Kuroki M, Phichaichumpon C, Yasuoka A, Chiranairadul P, Chosa T, Sirinirund P, Miyazaki T, Kakeya H, Higashiyama Y, Miyazaki Y, Ishida Y, Kohno S. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* from an endemic region of HIV-associated cryptococcosis in Thailand. *PubMed*. 2004;21(10):809-12.
- Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C) *J Clin Microbiol*. 1982;15:535–37.
- Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast. Res*. 2006;6:574–87.
- Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxonomy* 2002;51:804–06.
- Lefebvre L. Equilibrium distribution of feral pigeons at multiple food sources. *Behav Ecol Sociobiol*. 1983;12:11-17.
- Levitz S. The Ecology of *Cryptococcus neoformans* and the Epidemiology of Cryptococcosis. Oxford University Press Stable. *Reviews of Infectious Diseases*. 1991;13(6):1163-69.

- Lindell D, Ballinger M, McDonald R, Toews G, Huffnagle B. Immunologic homeostasis during infection: coexistence of strong pulmonary cell-mediated immunity to secondary *Cryptococcus neoformans* infection while the primary infection still persists at low levels in the lungs. *J Immunol.* 2006;177:4652-61.
- Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006;60:69-105.
- Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics.* 2006;172(4): 2223–38.
- Meade J, Biro D, Guilford, T. Homing pigeons develop local route stereotype. *Proc. R. Soc. B.* 2005;272:17–23.
- Ministerio de Salud del Perú. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Lima: INS; 2007.
- Ministerio del Ambiente del Perú. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú, SENAMHI. 2016 Dic [citado 2016 Dic 20]. Disponible en: <http://www.senamhi.gob.pe/?p=0100>.
- Miró JM, Mallolas J, Moreno A, Marco F, García F. Infecciones por *Cryptococcus neoformans* en pacientes infectados y no infectados por el VIH. *Rev Clin Esp.* 1997;197:49-59.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobon AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis.* 2010;51:561–70.
- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS.* 2009;23:525–30
- Perfect JR, Casadevall A. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2002;16:837–74.
- Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis* 2010;50(3):291-322.

- Krangvichain P, Niyomtham W, Prapasarakul N. Occurrence and susceptibilities to disinfectants of *Cryptococcus neoformans* in fecal droppings from pigeons in Bangkok, Thailand. *J Vet Med Sci.* 2016;78(3):391–96.
- Rose E, Nagel P, Haag-Wackernagel D. Spatio-temporal use of the urban habitat by feral pigeons (*Columba livia*). *Behav Ecol Sociobiol.* 2006;60(2):242-54.
- Salas SD, Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Williamson P R. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med.* 1996;184:377–86.
- Saldanha D, Prashanth HV, Shenoy S, Baliga S. Diagnostic Value of Latex Agglutination in Cryptococcal Meningitis. *J Lab Physicians.* 2009;1(2): 67–68.
- Sanfelice F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. *Ann. Igien.* 1894;4:463–95.
- Soltani M, Bayat M, Hashemi S, Zia M, Pestechian N. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and other opportunistic fungi from pigeon droppings. *J Res Med Sci.* 2013;18(1):56–60.
- Sukroongreung S, Kitiniyom K, Nilakul C, Tantimavanich S. Pathogenicity of basidiospores of *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans*. *Med. Mycol.* 1998;36:419–24.
- Timmermann R. Lineamientos zootécnicos para la crianza de la paloma mensajera (*Columbia livia domestica*) y lineamientos para el desarrollo de un colombódromo [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Zootecnia; 2016.
- Wang, Y., Aisen, P. & Casadevall, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence: mechanism of action. *Infect Immun.* 1995;63:3131–36.
- Velagapudi R., Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright J R, Heitman J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 2009;77:4345–4355.
- Williamson PR. Laccase and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Front Biosci.* 1997;2:99–107.
- Zarrini M, Jorfi M, Amirrajab N, Rostami M. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings in Ahwaz, Iran. *Turk J Med Sci.* 2010;40:306–13.

- Zhu X, Gibbons J, Garcia-Rivera J, Casadeval A, Williamson P. R. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall associated virulence factor. *Infect Immun.* 2001;69:5589–96.