



UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**“Detección de *Cryptococcus neoformans* en heces de *Columba livia*
(Paloma doméstica) presentes en dos hospitales de Lima
metropolitana”**

Tesis para optar el Título Profesional de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Héctor Eliseo Gárate Vilca

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA - PERÚ

2021

*Dedicado a mis padres, a mí hermano y a
Brenda, que me han acompañado durante
todo el camino*

Agradecido con la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y con el laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo. Gracias al Dr. Luis Jara Salazar y a la Dra. Beatriz Bustamante Rufino por brindarme todo su apoyo y paciencia durante la realización del proyecto de investigación. Igualmente, quedo muy agradecido con Rosario Velando, Susy Aranibar y Azucena Grigoletto del Laboratorio de Micología del IMT “Alexander von Humboldt”, UPCH, por la guía durante los meses de procesamiento de las muestras.

RESUMEN

En las últimas décadas la paloma doméstica ha aumentado en población junto al crecimiento urbano. Esto podría representar un problema para la salud pública ya que sus deyecciones pueden mantener viables microorganismos patógenos, como *Cryptococcus*. La criptococosis producida por *Cryptococcus neoformans* afecta a las poblaciones inmunosuprimidas. En ese sentido la acumulación de deyecciones de palomas en hospitales representaría un riesgo de contagio ya que actuaría como vehículo de transmisión. El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de *C. neoformans* en muestras fecales de aves presentes en hospitales de Lima, Perú. Para ello se tomaron muestras de heces cercanas a bandadas de palomas en dos hospitales del norte y centro de Lima. Las muestras fueron cultivadas en agar Nigger Seed y para confirmar la presencia de *C. neoformans* se observó la presencia de cápsula, además de la prueba de ureasa y crecimiento en agar canavanina glicina azul de bromotimol sódico para la diferenciación con *C. gattii*. Asimismo, se realizó la confirmación a nivel molecular mediante la técnica de PCR, además de un antifungigrama mediante la técnica de difusión en disco. De las 68 muestras colectadas, en el 8.8 % se aislaron cepas confirmadas de *Cryptococcus* spp., siendo todas ellas identificadas como *C. neoformans*. En total se identificaron 33 cepas positivas, siendo sólo el 78.8% confirmadas como *C. neoformans* por métodos moleculares. El 30.3% de las cepas resultaron resistentes para Fluconazol, 60.6% resistentes a Anfotericina B y 97% resistentes a Itraconazol. Todas cepas resultaron sensibles a Voriconazol. Las deyecciones de palomas dentro y fuera de nosocomios representan un potencial reservorio de *C. neoformans*, teniendo más del 50% de cepas encontradas con resistencia *in vitro* a más de un antifúngico empleado como terapia para la criptococosis.

Palabras clave: palomas, *Columbiformes*, *Cryptococcus neoformans*, reacción en cadena de la polimerasa

ABSTRACT

In recent decades, the domestic pigeon has increased in population along with demographic growth. This could represent a problem for public health since their droppings can carry pathogenic microorganisms, such as *Cryptococcus*. The cryptococcosis produced by *Cryptococcus neoformans* affects immunosuppressed populations. In that regards, the accumulation of pigeon droppings in hospitals represents a risk of contagion since they act as a transmission vehicle. The objective of the present study was detecting the presence of *C. neoformans* in fecal samples from birds existing in hospitals in Lima Peru. For this purpose, dry stool samples locating near to flocks of pigeons belonging to two hospitals in the north and center of Lima were taken. The samples were cultured on Nigger Seed agar; and, to confirm the presence of *C. neoformans*, the presence of capsules was observed, besides, the urease test and growth on canavanine glycine blue bromothymol sodium agar were carried out in order to differentiate from *C. gattii*. Likewise, confirmation at the molecular level was performed by using the PCR technique and an antifungigram was conducted by using the disk diffusion technique. Of the 68 samples collected, in 8.8% confirmed strains of *Cryptococcus* spp. were isolated, all of them identified as *C. neoformans*. A total of 33 positive strains were identified, with only 78.8% confirmed as *C. neoformans* by molecular methods.. The 30.3% of the strains were resistant to Fluconazole, 60.6% was resistant to Amphotericin B and 97% was resistant to Itraconazole. All strains were sensitive to Voriconazole. Pigeon droppings inside and outside hospitals represent a potential reservoir of *C. neoformans*, having more than 50% of strains found with resistance in vitro to more than one antifungal used as therapy for cryptococcosis.

Keywords: pigeons, Columbidae, *Cryptococcus neoformans*, polymerase chain reaction

INTRODUCCIÓN

La paloma doméstica (*Columba livia*) pertenece al orden *Columbiformes*, subfamilia *Columbinae*. Existen 47 géneros y 173 especies (Soto y Acosta, 2010), siendo *Zenaida meloda*, *C. livia*, *Z. auriculata* y *C. cruziana* las especies más abundantes en Lima, Perú (Nolazco, 2012). *C. livia* está dentro de las especies de aves más abundantes en parques públicos y jardines botánicos, encontrándose en más de 15 distritos de la capital (Nolazco, 2012). Uno de los factores que ha conllevado a su sobrepoblación es la conducta de alimentarlas en parques, plazas o viviendas. Además, la facilidad de acceder a agua y refugios complementan las condiciones idóneas para su proliferación (MINSA, 2015).

Las deyecciones de estos animales no solo contaminan y dañan infraestructuras, sino que también representan un potencial problema de salud pública. En este sentido, las excretas pueden actuar como medio ideal para que algunos agentes patógenos se mantengan viables en el medio ambiente. Además, el polvo de deyecciones secas podría actuar como vehículo para la propagación aérea de ciertos microorganismos (Rosario et al., 2008).

La criptococosis, psitacosis, salmonelosis, campilobacteriosis e histoplasmosis son algunas de las enfermedades asociadas a las deyecciones de palomas. La criptococosis es una micosis sistémica causada por *Cryptococcus* spp., el cual es un basidiomiceto levaduriforme encapsulado, de 2 a 20 µm de diámetro y de forma variable. Existen 39 especies, pero no todas son consideradas patógenas (Laskin et al., 2009). Las especies de *C. neoformans* y *C. gattii* son los aislados clínicos más comunes (Castañón-Olivares et al., 2000; Lizarazo et al., 2007). Estas especies presentan una cápsula de polisacárido y melanina en su pared celular, elementos que actúan como factores de virulencia (Murray et al., 2007). Otras especies reportadas corresponden a *C. laurenti* y *C. albidus* (Kordossis et al., 1998), sin embargo, se las considera como patógenos poco frecuentes en humanos (Castro-Lainez et al., 2019).

C. neoformans y *C. gattii* están ampliamente distribuidos, residiendo en diversos nichos ecológicos. *C. gattii* se ha asociado a regiones tropicales y subtropicales, pero recientemente se han identificado reservorios medioambientales en el norte de EEUU, Canadá y Europa septentrional (May, 2016). Mientras que *C. neoformans* se aísla de manera global, particularmente en suelos enriquecidos con excretas de aves (Rosario et al., 2008; May et al., 2016). Si bien se suelen encontrar en suelo contaminado, también se ha aislado a partir de nidos y excreciones de otras especies. Por otro lado, se ha logrado determinar que la levadura es saprofita del tubo digestivo de diversas aves, por lo que, las deyecciones actuarían como el principal hábitat para dicho patógeno (Rosario et al., 2008).

Se han clasificado las especies patógenas en un complejo de *C. neoformans* - *C. gattii* (Laskin et al., 2009; Hagen et al., 2015). Dentro del mismo se han clasificado nueve variedades genéticas y cinco serotipos (Laskin et al., 2009; Tapia y Correa, 2014). Dentro de *C. neoformans* se tienen dos variedades: *C. neoformans* variedad *grubii* (serotipo A), dividido en tres genotipos (AFLP1, AFLP1B, AFLP1A) y *C. neoformans* variedad *neoformans* (serotipo D), con un genotipo (AFLP2) (Laskin et al., 2009; Tapia y Correa, 2014). Además, se ha identificado un híbrido entre *C. neoformans* variedad *grubii* y *C. neoformans* variedad *neoformans*, denominado “*C. neoformans* intervary hybrid” (Serotipo AD), con un genotipo identificado (AFLP3) (Laskin et al., 2009; Hagen et al., 2015).

Por otro lado, *C. gattii* estaría clasificado en dos serotipos, B y C. Se han identificado cuatro grupos moleculares y cuatro genotipos: VGI/AFLP 4, VGIII/AFLP 5, VGIIa y b/AFLP 6 y VGIV/AFLP 7 (Laskin et al., 2009). Recientemente se ha añadido a VGIV/AFLP10 como genotipo (Hagen et al., 2015). Existen además híbridos entre el complejo *C. neoformans*/*C. gattii*, siendo estos *C. neoformans* var. *neoformans* con *C. gattii* (VGI/AFLP4), *C. neoformans* var. *grubii* con *C. gattii* (VGI/ AFLP4) y *C. neoformans* var. *grubii* con *C. gattii* (VGII/AFLP6) (Hagen et al., 2015).

La criptococosis causada por el complejo *C. neoformans* - *C. gattii* en pacientes inmunosuprimidos se evidencia con lesiones sistémicas como meningoencefalitis e infección en pulmones. La manifestación clínica en pacientes sin comorbilidad que comprometa su sistema inmune es ocasionada por la especie *C. gattii* (Bruner et al., 2018). Esta es la principal diferencia en la criptococosis producida por *C. neoformans*, siendo la infección por *C. gattii* generalmente reportada en pacientes inmunocompetentes, pero recientemente se ha asociado a afecciones crónicas como diabetes mellitus, entre otras (Bruner et al., 2018). Mientras que *C. neoformans* produce enfermedad en pacientes inmunosuprimidos y permanecería como nódulos pulmonares de infección latente en pacientes sanos (Helou et al., 1999).

La criptococosis es la infección fúngica más frecuente en pacientes con SIDA en Estados Unidos (Aguirrebengoa, 2004), ocurre entre el 6 al 10% de dichos pacientes (Nielsen et al., 2005). Se ha estimado a nivel mundial 957 900 casos de meningitis criptocócica durante el 2006 (Park et al., 2009) y 625,000 muertes por año (Kwon-Chung et al., 2017). Así mismo es fatal si no se recurre a tratamiento (Nielsen et al., 2005). Existen infecciones por otras especies, sin embargo, el 99% de infecciones en pacientes con VIH son causados por el *C. neoformans* var. *grubii* (Bovers et al., 2008).

En el Perú existen más de 120,389 casos notificados de VIH hasta el 2018, por lo que el *Cryptococcus* spp. representa un peligro potencial para dichos pacientes (MINSA, 2018), los cuales recurren a hospitales para consultas, tratamiento o internamiento. Además, la exposición prolongada a zonas con excretas de palomas como factor de riesgo en el contagio de criptococosis queda sugerido en varios estudios y reportes de caso. Por ejemplo, criptococosis agudas han sido reportadas en pacientes VIH+ luego de una exposición intensa a heces de palomas (Hajjeh, 1999; Lin et al., 2015).

Recientemente se ha publicado la presencia de *Cryptococcus* en muestras de heces de palomas domésticas en la Plazuela de la Iglesia de San Francisco y en los exteriores del

Hospital Nacional Dos de Mayo (Huamán et al., 2018). También, se han reportado cepas de *C. neoformans* en heces de palomas de la Basílica Catedral de Lima y el Convento de San Francisco de Asís ubicados en el centro de Lima (Inagaki et al., 2018). En otro estudio llevado a cabo en la ciudad de Ica, Perú, se encontró *C. neoformans* en áreas con alta concentración de palomas en la Facultad de Medicina de la Universidad San Luis Gonzaga y de la capilla del hospital Socorro (Curo et al., 2005).

El Hospital Nacional Dos de Mayo y en el Hospital Cayetano Heredia constituyen centros de salud de tercer nivel representativos del centro y norte de Lima, respectivamente. Además son altamente concurridos, teniendo incluso pabellones para internamiento de pacientes con VIH. Dado el aumento poblacional de palomas en la capital, es común observar su presencia dentro y en la periferia de hospitales, debido a la disponibilidad de refugio y fuentes de alimento. Son pocos los estudios en Lima sobre la presencia de *Cryptococcus* en deyecciones de aves residentes en estas instituciones, lo cual podría representar una fuente de contaminación, sobre todo para pacientes internados con alguna enfermedad inmunosupresora o con condiciones de extremo cuidado.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente estudio fue detectar *C. neoformans* a partir de heces de *C. livia* presentes en los interiores y exteriores de dos hospitales de Lima Metropolitana mediante la identificación con técnicas microbiológicas y moleculares, además de realizar un perfil de anti fúngicos en las cepas aisladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de Estudio

El estudio tuvo lugar en Lima Metropolitana, teniendo como puntos de muestreo el Hospital Nacional Dos de Mayo y el Hospital Cayetano Heredia, ubicados en los distritos de Cercado de Lima y San Martín de Porres, respectivamente. En cada centro de salud se identificaron áreas correspondientes a puntos de descanso de las parvadas de palomas (*C. livia*) con cúmulos de heces cercanos, teniendo en cuenta su cercanía a pabellones de pacientes VIH+.

2. Población de Estudio

El diseño del estudio fue descriptivo observacional y se realizó entre junio y setiembre del 2019. La población objetivo fueron cúmulos de heces secas de aves columbiformes adyacentes a parvadas de dicho orden, encontrados dentro y en la periferia de los dos hospitales en mención. No se interactuó directamente con las aves, únicamente se colectaron excretas acumuladas en superficies.

3. Muestreo

El muestreo se realizó por tres meses consecutivos llevando a cabo un total de cuatro muestreos (en intervalos de 15 días), colectando 17 puntos por cada muestreo, siendo 68 muestras en total. En el Hospital Nacional dos de Mayo se consideraron 7 puntos de muestra, 6 al interior de la institución y 1 a los alrededores. Para el Hospital Cayetano Heredia se consideraron 10 puntos de muestreo, 6 al interior y 4 en alrededores). Los puntos en el interior fueron áreas verdes, pasillos, rotondas o techos que estuvieran dentro del hospital y que tuvieran cumulo de excretas, no se colectaron muestras dentro de edificaciones. Por otro lado los puntos en el exterior fueron calles, jardineras y parques

colindantes al cerco perimetral de las instituciones. El detalle de las áreas delimitadas se grafica en el Anexo 1.

4. Recolección de Muestras

Se colectaron 10-20 g de excretas por punto de muestreo, considerando solo las muestras de heces secas a la intemperie en las zonas indicadas a las que se tuvo acceso. Se evitó coleccionar excretas con contaminación evidente de materia orgánica o con crecimiento de hongos en su superficie. Se contó con la indumentaria de protección adecuada (guardapolvos largos, mascarilla y guantes), una espátula de metal y frascos estériles limpios. Al momento del muestreo se registró además la temperatura y humedad ambiental empleando un termo higrómetro. Las muestras fueron transportadas en un cooler, a temperatura ambiente (20 °C), hasta su procesamiento en el laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt”, Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), Perú. El tiempo máximo entre la colección y el procesamiento de las muestras no superó las dos horas en ninguno de los muestreos. Las cepas que resultaran sugerentes de *C. neoformans* fueron replicadas para su confirmación a nivel molecular en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UPCH.

5. Aislamiento e Identificación Microbiológica

Para el procesamiento de las deyecciones se adaptó un protocolo usado en el 2012 para el aislamiento de *C. neoformans* (Trahtemberg et al., 2012). Una vez procesadas, las muestras fueron sembradas por diseminación en agar Niger Seed (a base de semilla de girasol) para incubarse luego entre 28 °C – 30 °C durante 14 días, con observación diaria. Las colonias sospechosas a *Cryptococcus* spp., lisas de textura mucóide y de color café (Tello et al., 2013), fueron nuevamente sembradas en agar Niger Seed durante 14 días para la obtención de colonias puras. Una vez obtenidas las colonias se procedió a

confirmar su género mediante la “prueba por tinta china” o TCH (Barcia-Castilla & Sánchez-Giler, 2016) y la prueba de hidrólisis de urea (MINSA, 2015), siendo confirmadas como *Cryptococcus* spp las que resultaron positivas. Asimismo, se realizó la prueba de canavanina glicina azul de bromotimol (CGB) (Araújo Júnior et al., 2015) para diferenciar entre *C. neoformans* y *C. gattii* a las cepas confirmadas como *Cryptococcus* spp.

6. Identificación Molecular de *C. neoformans*

Las colonias identificadas como *C. neoformans* fueron aisladas y resembradas en agar Sabouraud dextrosa. Para la extracción de DNA de las cepas se utilizó el protocolo “Boiling And Freeze Thawing” o “Hervir y congelar descongelar” (da Silva et al., 2012). Para esto se colocaron dos asadas de las colonias en agar en 1 ml de agua destilada estéril. La suspensión celular fue incubada aproximadamente a 100 °C durante 10 minutos, luego fue homogenizada empleando un vórtex. Acto seguido, la suspensión fue expuesta a temperatura de congelación (-18 °C) por 10 minutos y luego homogenizada. Este procedimiento se repitió tres veces con cada muestra. Finalmente, se centrifugó a 13000 RPM por 3 min y se recuperó el sobrenadante con el DNA. La cuantificación del DNA extraído se realizó mediante espectrofotometría con el uso de un equipo Nanodrop (Thermo Scientific, EEUU).

Para la realización de la PCR, se adaptó el protocolo usado por Hideo Aoki (Aoki et al., 1999) para la detección molecular de *C. neoformans*, utilizando una secuencia de oligonucleótidos, siendo: Forward: CTCTTGACGTTGGCTCTTTC y Reverse: CTACTGATGAAAACGCTG. La amplificación se hizo partiendo del preparado o mastermix con un volumen de 20 µl por reacción. En cada una se empleó Buffer SO4 (5µl/50 µl), 2 Mm de Magnesio, 0.2 mM de Dntp, 0.5 µM de cada cebador y 1.5U/50 µl de Taq polimerasa, además de 11.9 µl de agua grado molecular y 2 µl de DNA, con una

concentración promedio de 260.26 ng/μl. El protocolo de ciclaje para el termociclador (MJ Research PTC-200 Thermal Cycler, EEUU) fue el siguiente: desnaturalización a 93 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, hibridación a 60 °C por 1 min., 72 °C por 1 min con 30 s y una extensión final de 72 °C por 7 min. Se agregó además DNA control positivo de *C. neoformans* cepa ATCC 90112 y como control negativo una cepa de *C. gattii* ATCC 56992 y un blanco con agua molecular sin DNA. Los productos de PCR fueron colocados en un gel de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio (10 mg/μl). La electroforesis fue realizada en un buffer Tris-ácido acético-EDTA, con un voltaje de 90 V y 120 mA de amperaje durante 1 h. Para la visualización de los amplicones se colocó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta (DyNA Light, LABNET), comparándose con un marcador estándar Thermo Scientific SM0241 de tamaño molecular de 100 pares de bases (pb).

7. Susceptibilidad *in vitro* a Antifúngicos

Para el ensayo de sensibilidad, se adaptó el protocolo de la Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica (Pemán et al., 2001) y se analizó solo las cepas confirmadas como *C. neoformans* mediante pruebas microbiológicas. El medio de cultivo empleado para la prueba fue Müller-Hinton suplementado con 2% de glucosa. Las cepas fueron resembradas en Agar Sabouraud por 24 h antes de iniciar la preparación del inóculo. Se añadieron colonias frescas en tubos estériles con 4 ml de solución salina estéril (ClNa 0,85%) hasta obtener una densidad óptica de 0.5 en la escala de McFarland. Para esto se empleó un espectrofotómetro con longitud de onda fijada en 625 nm.

El inóculo fue sembrado en tres direcciones en cada placa empleando un hisopo estéril. Luego se dejó secar cerca de un mechero encendido durante 5 min para finalmente colocar los discos con anti fúngicos de Fluconazol (25 μg), Voriconazol (1 μg), Itraconazol (10 μg) y Anfotericina B (100 μg) (HIMEDIA, India) e incubar durante 48 h a 35 °C (Pfaller

et al., 2010). Se incluyó una cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 como control de calidad y se siguió el protocolo de lectura propuesto por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Pemán et al., 2001). Para la lectura de resultados se consideró el diámetro de los halos de inhibición alrededor del disco para determinar la susceptibilidad, siendo >10 mm susceptible (S) y <10 mm resistente (R) para anfotericina B; ≥20 mm (S), 19-12 mm intermedio (I) y ≤12 mm (R) para Itraconazol; ≥19 mm (S), 18-15 mm, (I) y ≤14 mm (R) para Fluconazol; ≥17mm (S), 14-18 mm (I) y ≤ 13mm (R) para Voriconazol (Pfaller et al., 2004, 2010; da Silva et al., 2012).

8. Análisis de Resultados

Los resultados se compilaron en cuadros usando estadística descriptiva, optando por usar medidas de resumen al trabajar con variables cuantitativas. En el primero se registró el número total de muestras colectadas en ambos hospitales, especificando el área donde fueron recogidas y cuantas muestras fueron colectadas por zona. En el segundo se indicaron las muestras resultaron positivas para *Cryptococcus* spp., expresando en porcentaje con respecto al total de muestras colectadas.

9. Consideraciones Éticas

Se contó con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, código de constancia 042-14-20. Así como con la aprobación del Comité Institucional de Ética de Investigación del Hospital Cayetano Heredia (Código 049-019) y del Comité de Ética del Hospital Nacional Dos de Mayo (Código de cargo 05361).

RESULTADOS

Se colectaron en total 68 muestras de excretas de paloma común dentro y en zonas aledañas a dos hospitales de Lima Metropolitana, repartidas en cuatro fechas de muestreo con 17 muestras (puntos) por fecha. El promedio de temperatura y humedad ambiental registrados en el Hospital Cayetano Heredia fue de 17.9 °C (± 1.44) y 75.1% (± 5.23), mientras que en el Hospital Nacional Dos de Mayo fue de 18.2 (± 1.88) y 73.7% (± 6.24).

El 14.7% de las muestras colectadas (10/68) resultaron sospechosas a *Cryptococcus* spp. a partir del crecimiento en el medio selectivo. Sólo el 8.8% del total de muestras fueron confirmadas con la presencia de *Cryptococcus* spp. mediante la prueba de TCH e hidrólisis de urea, asimismo, a nivel de especie como *C. neoformans* mediante la prueba de CGB. La frecuencia de muestras y cepas positivas encontradas por hospital se detalla en el Cuadro 1.

Cuatro de las muestras positivas fueron identificadas en el exterior del Hospital Nacional Dos de Mayo y dos al interior del Hospital Cayetano Heredia, una en el área de Neumología y otra en el estacionamiento-sótano (Anexo 1). No se aislaron cepas positivas en muestras colectadas en el interior del Hospital Nacional dos de Mayo.

Se aislaron un total de 91 cepas sugerentes a *C. neoformans*, pero sólo el 36.3% (33/91) fueron confirmadas mediante la prueba de CGB. De las 33 cepas confirmadas como *C. neoformans* por métodos microbiológicos, sólo el 78.8% (26/33) fueron identificadas por PCR. Siete cepas no fueron detectadas con la secuencia empleada en el PCR convencional (Figura 1).

Como hallazgo accidental se aislaron e identificaron 23 cepas de *Rhodotorula* spp., levadura ambiental con características fenotípicas semejantes a *C. neoformans*. Estas

cepas fueron se encontraron en el 5.9% de las muestras colectadas (4/68) en el Hospital Cayetano Heredia, tanto en las áreas interiores como exteriores.

Respecto a los resultados de susceptibilidad antifúngica, el 30.3% (10/33) de cepas confirmadas como *C. neoformans* resultaron resistentes para fluconazol, 60.6% (20/33) resistentes a anfotericina B y 97% (32/33) resistentes a Itraconazol. Todas las cepas resultaron sensibles a voriconazol (Cuadro 2).

Cuadro 1. Distribución porcentual (%) y frecuencia de muestras confirmadas y cepas positivas a *C. neoformans* en dos hospitales de Lima metropolitana

Lugar de muestreo	Muestras confirmadas ¹	Cepas %	
		Microbiología (+) ²	PCR (+) ³
Hospital Cayetano Heredia	5% (2/40)	25.6 (11/43)	54.5 (6/11)
Hospital Nacional Dos de Mayo	14.3% (4/28)	45.8 (22/48)	90.9 (20/22)

¹ Muestras confirmadas con presencia de *Cryptococcus* spp. (*C. neoformans*). Colonias positivas a tinta china, prueba de hidrólisis de urea y canavanina glicina azul de bromo timol.

² Cepas confirmadas como *C. neoformans* mediante prueba de CBG.

³ Cepas confirmadas como *C. neoformans* mediante PCR.

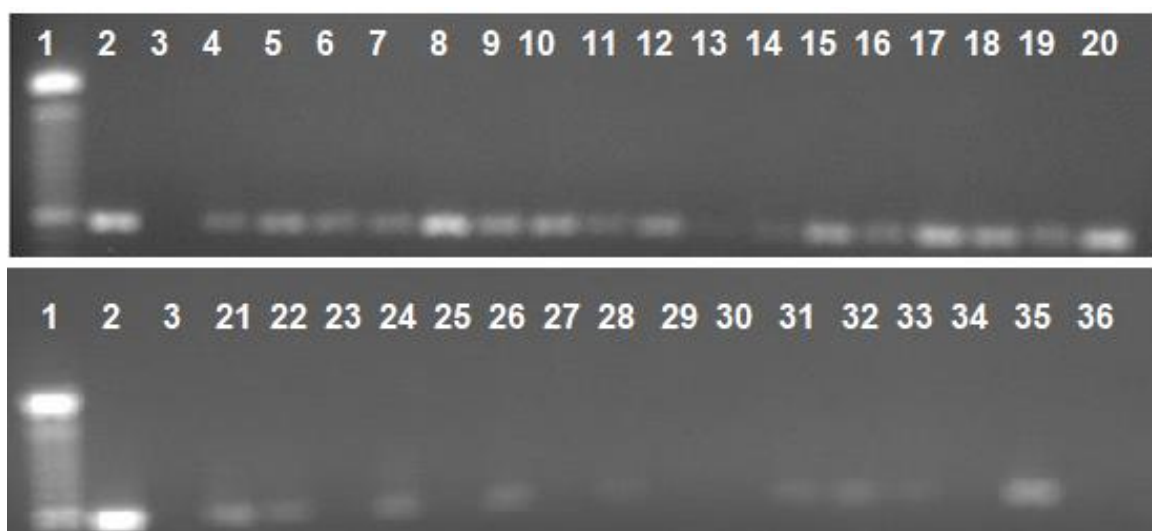


Figura 1. Productos de amplificación obtenidos al realizar la PCR. Marcador 100 bp (1); control positivo, *C. neoformans* ATCC 90112 (2); control negativo, *C. gattii* ATCC 56992 (colonias positivas (4-22, 24, 26, 28, 31-33, 35); colonias negativas (23, 25, 27, 29, 30, 34, 36). 579 bp como producto esperado de *C. neoformans*.

Cuadro 2. Frecuencia de cepas de *C. neoformans* susceptibles a antifúngicos (n=33)

Tipo de anti fúngico	Sensible		Intermedio		Resistente	
	n	%	n	%	n	%
Voriconazol	33	100	0	0	0	0
Fluconazol	4	12.1	19	57.6	10	30.3
Anfotericina B	8	24.2	5	15.2	20	60.6
Itraconazol	0	0	1	3	32	97

DISCUSIÓN

En contraste con estudios previos realizados en Lima que lograron aislar cepas de *C. neoformans* en áreas públicas como parques y plazas (Timmermann, 2017; Huamán et al., 2018; Inagaki et al., 2018), la presente investigación optó por analizar la presencia de la levadura en Hospitales emblemáticos de la capital, siendo el primer estudio en Lima donde se aísla a este patógeno. En términos generales las frecuencias obtenidas por dichos estudios han sido mayores que la encontrada en el presente trabajo. Por ejemplo una investigación realizada en plazas e iglesias del centro de Lima logró aislar *Cryptococcus* spp. en muestras ambientales, reportando una frecuencia de 19.15% (Inagaki et al., 2018). Sin embargo y en contraste a las áreas públicas, los centros de salud de tercer nivel buscan, mediante estrategias ligadas principalmente a las buenas prácticas de atención, prevenir y controlar las infecciones intrahospitalarias, por lo que la presencia de este patógeno cerca a pacientes inmunosuprimidos representaría un riesgo potencial.

En primer lugar, los nosocomios evaluados suelen presentar una elevada concurrencia promedio de pacientes. Por ejemplo, en el periodo de enero a octubre del 2019 se registraron 144316 consultas externas, 110174 consultas de emergencia y 13872 hospitalizados en el Hospital Cayetano Heredia (MINSA, 2019). Sumado a la elevada densidad en los hospitales, existe posibilidad de que algunos pacientes presenten factores de riesgo para enfermar de criptococosis, siendo que personas inmunosuprimidas son las más propensas.

Estudios de revisión de registros clínicos en Taiwán, postulan que dichos factores de riesgos incluyen enfermedades autoinmunes, cirrosis hepática descompensada, tratamientos inmunosupresores y VIH/SIDA (Lin et al., 2015). Ahora bien, en el Hospital Cayetano Heredia hay registro de pacientes con dichos factores de riesgo. Durante el 2019 han reportaron 4798 casos de VIH/SIDA solo en consultorio externo, representando la principal causa de morbilidad en dicha unidad. La elevada concurrencia de pacientes de

VIH/SIDA puede explicarse al trabajo del Instituto de Medicina Tropical “Alexander Von Humboldt”, uno de los principales centros de investigación de VIH, el cual realiza estudios sobre la utilización de retrovirales y efectos secundarios; así como, un seguimiento y evaluación de infecciones oportunistas, neoplasias y tuberculosis en pacientes con SIDA. Además se han registrado 1449 pacientes con diabetes mellitus en consulta de emergencia (MINSA, 2019). Así mismo, se han encontrado registros que indican a la cirrosis hepática como responsable del 3.7% de la mortalidad total en el servicio de Emergencia-medicina del mencionado hospital (MINSA, 2017).

Otro factor que haría que la presencia de *C.neoformans* represente un peligro es que la vía de transmisión más probable es por inhalación de la levadura en el medio ambiente (Rosario et al., 2008). Esto debido a que la levadura podría ser transportada por aire e inhalada, ya que el polvo generado a partir de las deyecciones desecadas actuaría de vehículo para las levaduras encapsuladas, permitiéndoles alcanzar el espacio alveolar (Rosario et al., 2008). Curo *et al.* (2005) lo evidenció al aislar *Cryptococcus* spp. en muestras de ambientes aéreos del perímetro urbano de Ica, exponiendo placas Petri abiertas al aire libre durante 10 minutos.

De las muestras positivas reportadas en el estudio, las colectadas en “Áreas verdes del área de Neumología –Pabellón TBC” y “Estacionamiento sótano”, son cercanas al Instituto de Enfermedades Tropicales Alexander Von Humboldt (Anexo 1). En dicho instituto se encuentra el pabellón para internos positivos a VIH. En este sentido, ya se han reportado criptococosis agudas en pacientes VIH+ luego de una exposición a heces de palomas (Hajjeh, 1999; Lin et al., 2015) e incluso, mediante técnicas de biología molecular, se ha logrado encontrar coincidencia entre cepas patógenas responsables de la enfermedad y saprofitas en excretas o tubos digestivo de aves (Rosario et al., 2008). Por ello, los hallazgos reportados podrían representar un riesgo de contagio.

La presencia de *C. neoformans* en excretas desecadas pone en evidencia su capacidad para mantenerse viable a condiciones ambientales adversas e incluso se ha estimado que su permanencia en deyecciones de palomas puede ser de más de dos años (Rosario et al., 2008), siendo las características propias de las heces cruciales para su supervivencia. La deyección de palomas actuaría como medio para la supervivencia de la levadura gracias a su elevada alcalinidad (Rosario et al., 2008), concentración de creatinina, xantina, urea y ácido úrico, sustratos requeridos para la síntesis de melanina, lo cual protegería a la levadura del estrés medio ambiental e incluso de la radiación solar (Nosanchuk et al., 1999; Rosario et al., 2008; Huamán et al., 2018). Algunos autores atribuyen la viabilidad de *C. neoformans* a que los excrementos secos son un medio con poca competencia por su baja concentración bacteriana (Alvarez et al., 2010). Sobre esto, Amirrajab et al. (2016) enfatiza que son las excretas secas las que representan un potencial factor de riesgo para el contagio de criptococosis. Sin embargo, existen reportes de cepas aisladas en deyecciones recientes (Castañón-Olivares et al., 2000). Por ejemplo, Huamán (2018) colectó heces secas y frescas, encontrando *Cryptococcus* spp. en ambas.

Si bien se logró aislar *C. neoformans* dentro del Hospital Cayetano Heredia y su presencia es un peligro potencial, se debe resaltar que solo se encontró en uno de los cuatro muestreos realizados. En este sentido existirían factores que controlarían la viabilidad de la levadura en los ambientes hospitalarios. Al respecto, durante toda la presente investigación se observó que en ambos hospitales se cumple con protocolos de limpieza y desinfección de las áreas comunes por parte de personal designado para dicha labor. Estos protocolos podrían ser cruciales para evitar la permanencia de *Cryptococcus* spp. en patios, pasillos y jardines de los hospitales, a pesar de la evidente acumulación de excretas de palomas en dichas áreas, las cuales se mantuvieron durante los cuatro muestreos. Un estudio previo realizado en Bangkok, Tailandia, concluyó que la acción de detergentes catiónicos, compuestos de amonio cuaternario, son efectivos para eliminar *C. neoformans* en presencia de materia orgánica (Krangvichain et al., 2016).

En la Guía Técnica de Procedimientos de Limpieza y Desinfección de Ambientes en los establecimientos de salud y servicios médicos de apoyo (MINSA, 2011), indican un protocolo de limpieza y desinfección de áreas, el cual divide estas áreas en críticas, semicríticas y no críticas; y la frecuencia de limpieza: limpieza de rutina, limpieza general y limpieza terminal. Se utilizan detergentes aniónicos, catiónicos y no iónicos. Uno de los agentes catiónicos más utilizados en hospitales es el desinfectante basado en amonio cuaternario, el cual tiene una mayor efectividad en pH alcalino (7MINSA, 2011, se usa en combinación con sustancias a base de sales de guanidina debido al efecto sinérgico potenciando su efecto. Las muestra positiva encontradas dentro del Hospital Cayetano Heredia fueron en un muestreo, por lo que no puede afirmarse que el protocolo del hospital sea deficiente; sin embargo, podría atribuirse a que el muestreo se llevó a cabo antes de la rutina de limpieza y desinfección o a un error durante dicho procedimiento. Por ejemplo, no realizar limpieza de superficies contaminadas con materia orgánica antes de aplicar un desinfectante podría inactivar su acción.

Para la prueba de resistencia antimicótica se optó por emplear fármacos evaluados en estudios previos realizados en el medio. Por ejemplo, en un estudio realizado en Lima entre el 2006-2007 se obtuvo que el 100% de las cepas de *C. neoformans* var *neoformans* aisladas de muestras ambientales fueron resistentes a fluconazol e itraconazol, además de ser sensibles a anfotericina B (Huamán et al., 2018). En el presente estudio también se encontró elevada resistencia para itraconazol; sin embargo, menos del 50% de las cepas aisladas resultaron resistentes a fluconazol y más del 50% para anfotericina B.

La elevada resistencia a itraconazol no sería relevante para el tratamiento de pacientes con meningitis criptocócica secundaria a VIH. Esto debido a que el tratamiento de elección consta de desoxicolato de Anfotericina B y Flucitosina durante 2 semanas (Tenforde et al., 2018). Sin embargo, se optó por incluir itraconazol y voriconazol al ser antifungicos probados. Córdova et al. (2020) plantea también que existen buenos resultados con una similar terapia durante dos semanas, seguido de monoterapia con

fluconazol y flucitosina por 14 días. Sobre estos datos la resistencia encontrada a anfotericina B en cepas ambientales en el presente estudio representaría un inconveniente en el tratamiento actual para criptococosis, en caso se adquirieran cepas ambientales.

Por otro lado, cabe resaltar el aislamiento de *Rhodotorula*. Las especies conocidas se consideran levaduras ubicuas ya que pueden ser aisladas de diversos sustratos naturales y artificiales. En Lima, Perú, Timmermann (2017) encontró dicha levadura en muestras de heces de palomas mensajeras y domésticas, mientras que también se ha aislado en muestras medio ambientales en San Pablo, Brasil (Araújo et al., 2015). El hallazgo se considera relevante porque es considerado un microorganismo oportunista, atribuyéndosele entre el 0.5 al 2.3% de los casos de fungemia en Estados Unidos y Europa (Wirth y Goldani, 2012).

En ninguna de las muestras colectadas se logró aislar *C. gattii*, coincidiendo con la literatura que afirma que es poco común encontrarla en heces de paloma común, presuntamente debido a que no puede reproducirse en excretas de aves (Nielsen et al., 2007). El hallazgo de *C. gattii* hubiera significado un riesgo para pacientes o personal inmunocompetente, ya que esta especie ha sido reportada como agente patógeno en personas no inmunosuprimidas (Bruner et al., 2018). Incluso existen indicios que sugieren que hay diferencia entre la manifestación de la enfermedad generada por los genotipos VGIIa y VGIIb, ya que causan un cuadro respiratorio y muerte sin diseminación a las meninges (Chen et al., 2014).

El 21.2% (7/33) de cepas confirmadas de *C. neoformans* por métodos microbiológicos y bioquímicos resultaron negativas a la prueba molecular de PCR. Es importante resaltar que todas estas cepas pertenecieron a muestras que ya tenían cepas confirmadas como *C. neoformans* por la técnica de PCR. Dichas cepas negativas podrían tratarse de variedades de *C. neoformans* que posean variaciones en la secuencia blanco dentro de su genoma, el cual no pudo ser detectado con los cebadores utilizados para la prueba molecular. Sobre

este punto, podrían tratarse de otras variedad de *C. neoformans* (serotipo D) o híbridos (serotipo AD) (Laskin et al., 2009). Esta sería una desventaja para la utilización de los cebadores reportados previamente y que fueron utilizados en el presente estudio, por lo que sería recomendable utilizar más de un gen diferente para identificar por pruebas moleculares a nivel de especie. Sobre el último punto, se podrían emplear cebadores diseñados a partir de genes para la enzima lacasa en combinación con secuencias de la cápsula (Ito-Kuwa et al., 2007). Por otro lado, es importante en estos casos realizar un secuenciamiento genético completo de las cepas, lo cual si bien requiere mayores recursos, permitiría discernir entre otras variedades, híbridos o variantes. Esto serviría de precedente para otros estudios en el medio hospitalario, para obtener a futuro resultados a partir de muestras clínicas independientes al cultivo, empleando las secuencias más específicas en regiones conservadas de cepas aisladas de muestras clínicas peruanas.

Una limitante del presente estudio fue no realizar tipificación de las variedades de *C. neoformans*, sobre todo como aporte para la epidemiología molecular de esta levadura a partir de muestras ambientales. Además, hubiera permitido conocer posibles diferencias entre las sensibilidades antifúngicas de las variedades. Aunque se sabe que la variedad más común reportada es *C. neoformans* var. *grubii* con un 91.89 % de frecuencia (Firacative et al., 2018), en muestras ambientales y clínicas en América Latina. Otra limitante del estudio fue la difícil accesibilidad a otras áreas en los exteriores del Hospital Nacional Dos de Mayo, lo que podría haber afectado obtener un mayor número de muestras positiva.

En base a los resultados, el control de la población de aves columbiformes dentro de los hospitales es crucial para evitar la posible circulación de *C. neoformans* dentro de los mismos. El Documento Técnico para la Vigilancia, Prevención y Control Sanitario de Agentes Zoonóticos y Zoonosis relacionados a la Paloma Doméstica (Minsa, 2015) plantea métodos para el monitoreo y control poblacional de *C. livia*, así como la aplicación de dichos métodos para competencia de los gobiernos locales, instituciones

públicas y privadas. En el mismo documento recomiendan eliminar o bloquear áreas de anidamiento de *C. livia* cercanas a instalaciones frecuentadas por pacientes en riesgo, dentro de hospitales. Por lo que es necesario implementar un sistema de vigilancia medio ambiental orientado a proveer información continua acerca de posibles agentes zoonóticos transmitidos por plagas, así como la ejecución permanente del documento técnico indicado en los hospitales y alrededores considerando los hallazgos del presente estudio reportados por primera vez a partir de un nosocomio público.

CONCLUSIONES

- Las heces de palomas domésticas presentes dentro y alrededores de hospitales de Lima representan una fuente potencial de contaminación de *Cryptococcus* spp.
- La levadura *C. neoformans* está presente dentro de los ambientes del Hospital Nacional Cayetano Heredia.
- Todas las cepas aisladas fueron susceptibles al voriconazol y menos del 50% para fluconazol. Más del 60% de cepas fueron resistentes a anfotericina B y más del 90% para itraconazol.
- Se encontró la presencia accidental de *Rhodotorula* spp. en ambientes cercanos a nosocomios.
- No se evidenció la presencia de *C. gattii* en heces de palomas.

RECOMENDACIONES

- Implementar la vigilancia epidemiológica para *Cryptococcus* spp. y otros patógenos zoonóticos en ambientes de hospitales nacionales a lo largo del año y donde haya presencia de grandes poblaciones de aves.
- Implementar el control poblacional de palomas domésticas en hospitales de atención de pacientes inmunosuprimidos o nivel 3.
- Realizar la tipificación genotípica de cepas aisladas de *C. neoformans* para determinar híbridos o variantes.
- Realizar estudios para evaluar la potencial diseminación de *Cryptococcus* spp. en áreas lejanas a los lugares de excreción de palomas.
- Evaluar otros marcadores o genes en las técnicas moleculares diagnósticas que permitan identificar variantes de *C. neoformans*.

LITERATURA CITADA

- Aguirrebengoa, K. (2004). Enfermedades asociadas a la infección por VIH. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. 4º seminario de atención farmacéutica.
- Alvarez, C., Salim, R., & Runco, R. (2010). Presencia de *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas urbanas en San Miguel de Tucumán-Argentina. Boletín micológico, 25.
- Amirrajab, N., Haghani, I., Rasuli, M., & Shokohi, T. (2016). Migratory Birds as a Potential Reservoirs of *Cryptococcus neoformans*. *International Journal of Environmental Research*, 10(3), 459-464.
- Aoki, F. H., Imai, T., Tanaka, R., Mikami, Y., Taguchi, H., Nishimura, N. F. & Branchini, M. L. M. (1999). New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. *Journal of clinical microbiology*, 37(2), 315-320.
- Araújo Júnior, E. C. D., Táparo, C. V., Uchida, C. Y., & Marinho, M. (2015). *Cryptococcus*: isolamento ambiental e caracterização bioquímica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67(4), 1003-1008.
- Barcia-Castilla, V., & Sánchez-Giler, S. (2016). Utilidad de la prueba de tinta china como tamizaje para meningitis por *Cryptococcus* spp. *Revista Ciencia Unemi*, 9(20), 63-67.
- Bovers, M., Hagen, F., & Boekhout, T. (2008). Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(1), S4.
- Bruner, K. T., Franco-Paredes, C., Henao-Martínez, A. F., Steele, G. M., & Chastain, D. B. (2018). *Cryptococcus gattii* complex infections in HIV-infected patients, Southeastern United States. *Emerging infectious diseases*, 24(11), 1998.

- Castañón-Olivares, L. R., Arreguín-Espinosa, R., y Santos, G. R. P., & López-Martínez, R. (2000). Frequency of *Cryptococcus* species and varieties in México and their comparison with some Latin American countries. *Revista latinoamericana de microbiologia*, 42(1), 35-40.
- Castro-Lainez, M. T., Deliz-Aguirre, R., Antunez, D., Cruz-Codina, M., Cahuayme-Zuniga, L., Vitale, K., ... & Midturi, J. K. (2019). *Cryptococcus laurentii* meningitis in a non-HIV patient. *IDCases*, 18, e00612.
- Chen, S. C., Meyer, W., & Sorrell, T. C. (2014). *Cryptococcus gattii* infections. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), 980-1024.
- Córdova, A. L. F., Matute, E. J. S., Cuadrado, M. I. B., & Hernández, M. F. L. (2020). Criptococosis en el contexto del paciente inmunodeprimido. *Journal of America health*, 3(2), 10-20.
- Curo, M., Salinas, M., & Casquero, J. (2005). *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas, suelo y aire de los palomares del perímetro urbano de Ica, 2002. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 22(4), 262-266.
- da Silva, G. A., Bernardi, T. L., Schaker, P. D. C., Menegotto, M., & Valente, P. (2012). Rapid Yeast DNA Extraction By Boiling And Freeze-Thawing Without Using Chemical Reagents And DNA Purification. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 55(2), 319-327.
- Firacative, C., Lizarazo, J., Illnait-Zaragozí, M. T., & Castañeda, E. (2018). The status of cryptococcosis in Latin America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(7).
- Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., ... & Boekhout, T. (2015). Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 78, 16-48.

- Hajjeh, R. A., Cryptococcal Active Surveillance Group, Conn, L. A., Cryptococcal Active Surveillance Group, Stephens, D. S., Cryptococcal Active Surveillance Group, ... & Graviss, E. (1999). Cryptococcosis: population-based multistate active surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus—infected persons. *The Journal of infectious diseases*, 179(2), 449-454.
- Helou, S., Robles, A. M., Arechavala, A., Bianchi, M., & Negroni, R. (1999). Criptococosis respiratoria en pacientes VIH positivos. *Rev Iberoam Micol*, 16, 126-129.
- Huamán, A., Béjar, V., Sáez, G., Guevara, J., Sevilla, R., Tapia, M., ... & Romero, G. (2018). *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en Lima Metropolitana. *Revista Medica Herediana*, 29(2), 85-89.
- Inagaki, O., Iwashita, A., Ramos, M., Bustamante, B., Contreras, V., & Pérez, N. (2018). Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* y *Salmonella* spp. en excretas de palomas domésticas (*Columba livia*) de la Basílica Catedral de Lima y Convento de San Francisco Lima, Perú
- Ito-Kuwa, S., Nakamura, K., Aoki, S., & Vidotto, V. (2007). Serotype identification of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. *Mycoses*, 50(4), 277-281.
- .Kordossis, T., Avlami, A., Velegraki, A., Stefanou, I., Georgakopoulos, G., Papalambrou, C., & Legakis, N. J. (1998). First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. *Medical mycology*, 36(5), 335-339.
- Krangvichain, P., Niyomtham, W., & Prapasarakul, N. (2016). Occurrence and susceptibilities to disinfectants of *Cryptococcus neoformans* in fecal droppings from pigeons in Bangkok, Thailand. *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(3), 391-396.

- 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).
- Laskin, A., Sariaslani, S., Gadd, G. (2009). *Advances in Applied Microbiology*. San Diego, USA: Elsevier. P 132- 137.
- Lin, Y. Y., Shiau, S., & Fang, C. T. (2015). Risk factors for invasive *Cryptococcus neoformans* diseases: a case-control study. *PLoS One*, 10(3).
- Lizarazo, J., Linares, M., de Bedout, C., Restrepo, Á., Agudelo, C. I., & Castañeda, E. (2007). Estudio clínico y epidemiológico de la criptococosis en Colombia: resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005. *Biomédica*, 27(1), 94-109.
- May, R. C., Stone, N. R., Wiesner, D. L., Bicanic, T., & Nielsen, K. (2016). *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), 106-118.
- MINSA (2011). Guía técnica de procedimientos de limpieza y desinfección de ambientes de establecimientos de salud de apoyo. Ministerio de salud.
- MINSA. (2015). Manual para la vigilancia, prevención y control sanitario de agentes zoonóticos, zoonosis relacionados a la paloma doméstica. Ministerio de Salud, 29-32.
- MINSA. (2017). Análisis de la situación de salud- Hospital Cayetano Heredia. Ministerio de Salud, 119-136.
- MINSA. (2018). Situación epidemiológica del VIH-Sida en el Perú. Boletín Mensual- Ministerio de salud.
- MINSA. (2019). Sala situacional Noviembre 2019- Oficina de epidemiología y salud ambiental. Ministerio de salud.

- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M., (2007). Microbiología médica. Elsevier Inc, 6, 787-789.
- Nielsen, K., Cox, G. M., Litvintseva, A. P., Mylonakis, E., Malliaris, S. D., Benjamin, D. K. & Heitman, J. (2005). *Cryptococcus neoformans* α strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. Infection and immunity, 73(8), 4922-4933.
- Nielsen, K., De Obaldia, A. L., & Heitman, J. (2007). *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. Eukaryotic cell, 6(6), 949-959.
- Nolazco, S. (2012). Diversidad de aves silvestres y correlaciones con la cobertura vegetal en parques y jardines de la ciudad de Lima. Boletín informativo UNOP, 7(1), 4-16.
Recuperado de: https://guzloeditoras.com/web_des/bio01/zoo/pld0707.pdf
- Nosanchuk, J. D., Rudolph, J., Rosas, A. L., & Casadevall, A. (1999). Evidence that *Cryptococcus neoformans* is melanized in pigeon excreta: implications for pathogenesis. Infection and immunity, 67(10), 5477-5479.
- Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G., & Chiller, T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. Aids, 23(4), 525-530.
- Pemán, J., Martín-Mazuelos, E., & Calvo, M. C. R. (Eds.). (2001). Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Revista Iberoamericana de Micología.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Barton, R., Bijie, H., ... & Dzierzanowska, D. (2010). Geographic variation in the frequency of isolation and fluconazole and voriconazole susceptibilities of *Candida glabrata*: an assessment

- from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 67(2), 162-171.
- Pfaller, M. A., Messer, S. A., Boyken, L., Rice, C., Tendolkar, S., Hollis, R. J., & Diekema, D. J. (2004). Evaluation of the NCCLS M44-P disk diffusion method for determining susceptibilities of 276 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole. *Journal of clinical microbiology*, 42(1), 380-383.
- Rosario, I., Acosta, B., & Colom, F. (2008). La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(1), S13-S18.
- Soto, C., & Acosta, I. (2010). Prevención y enfermedades de la paloma doméstica. *Revista electrónica de Veterinaria*, 11(11), 5-79.
- Tapia, C., & Correa, N. (2014). Género *Cryptococcus*. *Revista chilena de infectología*, 31(6), 719-720.
- Tello, M., Gutierrez, E., Béjar, V., Galarza, C., Ramos, W., & Ortega-Loayza, A. G. (2013). Cryptococcosis. *Revista Médica de Risaralda*, 19(2), 147-153.
- Tenforde, M. W., Shapiro, A. E., Rouse, B., Jarvis, J. N., Li, T., Eshun-Wilson, I., & Ford, N. (2018). Treatment for HIV-associated cryptococcal meningitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (7).
- Timmermann Flores, R. E. (2017). Presencia de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas mensajeras y de castilla de la ciudad de Lima, Perú.
- Trahtemberg, T. Bezada, H. Elías, P. (2012). Presencia De *Cryptococcus Neoformans* En Deyecciones De Palomas Domésticas (*Columba Livia Domestica*) En Los Parques, Jardines Y Plazas Públicas Del Cercado De Lima
- Wirth, F., & Goldani, L. Z. (2012). Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2012Zúñiga, E., León, D.,

Falcón, N., (2017). Plagas Urbanas: Las palomas y su impacto sobre el ambiente y la salud pública.MV Rev. de Cien. Vet, 33(1), 5- 12.

ANEXOS

Anexo 1. Mapa de distribución de muestras colectadas según cada Hospital y área de muestreo.

