



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA de *Cryptococcus neoformans* EN EXCRETAS DE PALOMAS (*Columba livia*) EN LA PLAZA DE ARMAS, LOS PORTALES Y LA CATEDRAL DE LA CIUDAD DE AREQUIPA, OCTUBRE 2021.

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORES

MENDOZA ALMANACIN, RONI

<https://orcid.org/0000-0002-9483-6380>

ANCCORI QUENTA, ZENAIDA MARUJA

<https://orcid.org/0000-0002-6870-1597>

ASESOR

Mg. FLORES LÓPEZ, OSCAR BERNUY

<https://orcid.org/0000-0001-9091-2537>

LIMA – PERÚ

2022

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres por ser los guías en el sendero de cada acto que realizo hoy, mañana y siempre; a mis hermanos, por ser el incentivo para seguir adelante con esta meta que en el día a día con su presencia, respaldo y cariño me impulsan para seguir adelante, además de saber que mis logros también son los suyos.

Gracias a la vida por este nuevo triunfo, gracias a todas las personas que me apoyaron y creyeron en la realización de esta tesis.

Roni Mendoza Almanacin

Dedico con mucho cariño y amor mi tesis a Dios, ya que sin él no hubiera sido posible llegar a cumplir este gran objetivo, a mis padres por enseñarme los valores que me hicieron encaminar mi vida, a mi esposo Gonzalo, por su apoyo, paciencia y por haber depositado su confianza en mí, a mi hijo Adrián por ser mi inspiración, motivación para continuar y no rendirme en el transcurso de mi vida profesional, a mi familia por sus consejos y ayuda, a mis amigos por estar siempre en el momento en que más los necesitaba.

Zenaida Maruja Ancori Quenta

AGRADECIMIENTO

Primeramente, a Dios, ya que sin él nada hubiera sido posible, gracias por la fuerza y el valor que nos brindó día a día para continuar y así cumplir nuestros objetivos.

A la universidad María Auxiliadora por darnos la oportunidad y hacernos parte de la institución, por brindarnos el apoyo necesario en la realización de nuestro trabajo de investigación.

A Laboratorio Clínico “LLERENA AMES E.I.R.L”, en especial al Blgo. Florencio Aparicio Choque y al Q.F. Arturo Sergio Llerena Ames, por su gran amabilidad, apoyo a la investigación y por habernos permitido utilizar sus instalaciones, equipos, materiales y otros para la ejecución de nuestro proyecto de investigación.

A la Dra. Patricia Edith Delgado Carpio y Mg. Shaneri Marcilla Truyenque, por su amabilidad, su tiempo, sus ideas, orientación y atención a nuestras consultas, gracias, por la revisión cuidadosa que han realizado de este texto y sus valiosas sugerencias en momentos de duda.

A nuestros familiares, padres, amigos y docentes, que siempre nos han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de nuestro proyecto de investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
I. INTRODUCCIÓN	8
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
II.1. Enfoque y diseño de la investigación	14
II.2. Población, muestra y muestreo	14
II.3. Variables de investigación.....	15
II.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos.....	16
II.4.1. Fuentes primarias	16
II.4.2. Fuentes secundarias	16
II.5. Plan metodológico para la recolección de datos	16
II.5.1. Muestreo.....	16
II.5.2. Determinación de la presencia del hongo levaduriforme <i>Cryptococcus neoformans</i>	17
Screening para recolección de datos.....	21
II.6. Procesamiento del análisis estadístico.....	22
II.7. Aspectos éticos	22
III. RESULTADOS	23
IV. DISCUSIÓN.....	29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS	40
ANEXO A: Instrumentos de recolección de datos.....	40
ANEXO B: Matriz de consistencia.....	43
ANEXO C: Operacionalización de las variables.....	44
ANEXO D: Certificado del Laboratorio Clínico “LLERENA AMES E.I.R.L.”	45
ANEXO E: Evidencias fotográficas del trabajo de campo	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 01. <i>Cryptococcus neoformans</i> en excretas de palomas (<i>Columba Livia</i>) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa.	23
Tabla 02. Resultados de la caracterización macroscópica de la levadura de <i>Cryptococcus neoformans</i> en excretas de palomas en la Plaza de Armas, Los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa.....	24
Tabla 03. Resultados de la identificación microscópica de <i>Cryptococcus neoformans</i> en excretas de palomas en la Plaza de Armas, Los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa.	25
Tabla 04. Resultados de la caracterización bioquímica de <i>Cryptococcus neoformans</i> en excretas de palomas en la Plaza de Armas, Los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa.	26

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 01. Muestras negativas y positivas de <i>Cryptococcus neoformans</i> en excretas de palomas (<i>Columba livia</i>) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa expresado en porcentaje con respecto a la muestra total en diferentes áreas del lugar de estudio.....	27
Gráfica 02. Muestras negativas y positivas de <i>Cryptococcus neoformans</i> en excretas de palomas (<i>Columba livia</i>) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa con respecto a la muestra total en diferentes áreas del lugar de estudio.....	28
Gráfica 03. Resultado general de determinación de la presencia de <i>Cryptococcus neoformans</i> en excretas de palomas (<i>Columba livia</i>) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa.....	29

RESUMEN

Objetivo: El objetivo del presente estudio es determinar la presencia del hongo *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas (*Columba livia*) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa. **Materiales y métodos:** Estudio descriptivo de corte transversal cuyo muestreo se realizó en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa en octubre del 2021, donde se tomaron 113 muestras de excretas de palomas (*Columba livia*) del suelo, que posteriormente fueron transportadas y procesadas en el laboratorio, para la caracterización de *Cryptococcus neoformans* se utiliza el medio de cultivo agar Sabouraud dextrosa con adición del antibiótico cloranfenicol, las colonias aisladas fueron sometidas a un análisis macroscópico, microscópico (visualización de la cápsula con tinta china) y prueba de ureasa. **Resultado:** Del total de muestras recolectadas 10 dieron positivo a *Cryptococcus neoformans*, representando así un porcentaje de 8,85% (10/113), asimismo el área con mayor número de casos positivos es la Plaza de Armas con 4,42% (5/113) muestras analizadas en comparación con los portales y la catedral. **Conclusiones:** Se concluye que existe la presencia de *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas (*Columba livia*) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa.

Palabras claves: *Cryptococcus neoformans*, *Columba livia*. Criptococosis, Inmunodeprimido.

ABSTRACT

Objective: The objective of this study is to determine the presence of the fungus *Cryptococcus neoformans* in pigeon (*Columba livia*) droppings in the Plaza de Armas, the Portales and the Cathedral of the city of Arequipa. **Materials and methods:** Descriptive cross-sectional study whose sampling was carried out in the Plaza de Armas, the Portales and the Cathedral of the City of Arequipa in October 2021, where 113 samples of pigeon (*Columba livia*) excreta were taken from the ground, which were subsequently transported and processed in the laboratory, For the characterization of *Cryptococcus neoformans*, the Sabouraud dextrose agar culture medium was used with the addition of the antibiotic chloramphenicol, the isolated colonies were subjected to macroscopic and microscopic analysis (visualization of the capsule with India ink) and urease test. **Result:** Of the total number of samples collected 10 were positive for *Cryptococcus neoformans*. thus, representing a percentage of 8.85% (10/113), likewise the area with the highest number of positive cases is the Plaza de Armas with 4.42% (5/113) samples analyzed compared to the portals and the cathedral. **Conclusions:** It is concluded that there is the presence of *Cryptococcus neoformans* in excreta of pigeons (*Columba livia*) in the Plaza de Armas, the Portales and the Cathedral of the City of Arequipa.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, *Columba livia*. Cryptococcosis, Immunocompromised

I. INTRODUCCIÓN

El hongo *Cryptococcus neoformans* es el causante de criptococosis en humanos, esta es una micosis oportunista de distribución mundial, la cual tiene predilección por el sistema nervioso central. El hongo levaduriforme es inhalado por las vías respiratorias, se distribuye por la sangre, finalmente se localiza en diferentes órganos incluido el sistema nervioso central (SNC) y de esta manera causa la infección¹. Algunas variedades del género *Cryptococcus*, han demostrado preferencia por zonas contaminadas con estiércol de aves, especialmente de *Columba livia*². Ciertos estudios estiman que a nivel global se presentan 700000 muertes por criptococosis y 624000 individuos fallecen por meningitis criptocócica anualmente entre estos sobresalen los pacientes VIH positivos³.

La criptococosis es una enfermedad causada por hongos del género *Cryptococcus*. Esta infección afecta a personas con sistema inmunológico debilitado (CD4 inferior a 100cel/ μ l), pero se ha visto casos en que daña a personas sanas generando así problemas graves como la afectación del SNC. La criptococosis está catalogada como la cuarta infección oportunista que afecta principalmente a personas con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), a la vez es la tercera infección invasiva que daña a pacientes con trasplante de órgano⁴. En los últimos 25 años, los casos de criptococosis humana han aumentado considerablemente⁵. En varias situaciones, la enfermedad se ha relacionado con la exposición de los pacientes a excreciones de aves. De ellas, la paloma *Columba livia* es la más importante como reservorio⁶.

En el Perú la prevalencia de meningitis criptocócica asociada a SIDA es de 5,6%; actualmente esta cifra ha disminuido debido a la disponibilidad de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA)³. Varios estudios indican que la criptococosis está asociada a las palomas, estas aves se encuentran distribuidas en diversas zonas como plazas, edificios, iglesias y demás sitios públicos; uno de los factores que ha contribuido al aumento de la población de *Columba livia*

es la alimentación brindada por las personas, además esta ave actúa como portadora de agentes patógenos⁵.

Según el reporte de los últimos 5 años entre 2017 a septiembre del 2021 Arequipa notifico el 4% de casos positivos de VIH además la provincia de Arequipa concentra la mayor cantidad de pacientes infectados⁷. En esta ciudad la libre crianza y reproducción sin control de ***Columba livia*** la han convertido en una plaga con capacidad de transmitir enfermedades entre estas la criptococosis, lo cual representa un riesgo para pacientes inmunodeprimidos como es el caso de personas con VIH entre otros. Existen metodologías para censado y control de palomas, pero en Arequipa no se han reportado informaciones al respecto. Por lo tanto, es necesario determinar la presencia del hongo ***Cryptococcus neoformans*** en un área urbana muy concurrida como es la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa.

Cryptococcus neoformans es un basidiomiceto descubierto hace más de un siglo atrás, fue aislado de la tibia de un individuo y del jugo de durazno⁸. Su clasificación consta de dos variedades y una especie hermana: ***Cryptococcus neoformans*** var. *Neoformans*, var. *Grubii* y ***Cryptococcus gattii***. Según la composición de la cápsula, se han descrito al menos cuatro serotipos distintos, denominados A, B, C y D. Los serotipos A y D se identifican como *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii* y para aislamientos del serotipo B y C como *Cryptococcus gattii*. Ambas especies se diferencian por sus características bioquímicas, distribución geográfica, punto de vista patogénico y distribución en la naturaleza. Los tipos A y D se asocian con excretas de palomas, mientras que los serotipos B y C se han encontrado en distintas especies de eucaliptos⁹.

Este hongo levaduriforme se encuentra en tres formas: Clamidosporas, levadura encapsulada y basidiosporas¹⁰. Las basidiósporas tienen un tamaño aproximado de 2 μm , las levaduras miden más o menos 5 μm , pero pueden llegar a un tamaño de 2 μm , esto es debido a la falta de nutrientes y humedad; el nuevo tamaño que adquiere la cápsula le da mayor facilidad para ingresar por las vías respiratorias y depositarse en los alvéolos pulmonares¹¹. Sin embargo, las

basidiósporas presentan mayor resistencia a condiciones ambientales (deseccación) en comparación con las levaduras que tienen menor resistencia¹².

Investigaciones epidemiológicas realizadas en años anteriores indican que ***Cryptococcus neoformans*** de bajo metabolismo tiene la facultad de entrar en un estado de dormancia, por lo cual una vez ocurrida la inmunodepresión la enfermedad se activa¹³. Entre los factores de virulencia se encuentra la cápsula de polisacárido y su capacidad de fabricar melanina¹⁴.

El hongo ***Cryptococcus neoformans*** causa la infección denominada criptococosis, esta micosis afecta los pulmones (criptococosis pulmonar), meninges (meningitis criptocócica), la piel (criptococosis cutánea) además puede afectar otros órganos ya que puede llegar a cualquier parte del cuerpo durante el proceso de diseminación hematológica. Los síntomas que ocurren en una infección inicial pueden ser: Tos, disnea, cefalea, pérdida de la agudeza visual, mareos, náuseas, pirexia, rigidez de cuello, en algunos casos el paciente puede presentar alteración mental o como también puede no presentar ningún síntoma. Cuando las levaduras ingresan a los alvéolos pulmonares son controladas por el sistema inmunológico resultando en la formación de granulomas generando así anticuerpos contra las proteínas del hongo (inmunidad adaptativa)¹⁵. El tratamiento a instaurar dependerá del órgano afectado, siendo los medicamentos más utilizados: Fluconazol, Anfotericina B y Flucitosina estos últimos por vía endovenosa¹⁶.

La paloma doméstica (***Columba livia***) fue introducida en el continente americano en el siglo XV como ave doméstica¹⁷. Estas palomas tienen un tamaño de 30.5 a 35,5 cm, su peso varía entre 280 a 650 gramos, presenta una cola mediana; pico negruzco con cera en la base; sus patas son rojizas o rosadas y el color de sus ojos es ámbar. La longevidad de estas aves dependerá de las condiciones climáticas y de la raza, pudiendo llegar a vivir más de 20 años¹⁸. Su reproducción es más frecuente en verano y primavera, aunque pueden hacerlo en cualquier época del año, sin embargo, habrá mayor reproducción en climas cálidos con temperaturas superiores a 12 °C¹⁹. Una vez

ocurrido el apareamiento las hembras ponen sus huevos a los 12 días con una diferencia de 48 horas o menos lo que da como resultado de 2 a 4 crías; el número de nidadas por año es de 6 a 11 veces; en el cuarto y sexto día las crías abandonan el nido y se vuelven fértiles en el cuarto mes; el período de incubación de los huevos oscila entre 17 y 18 días y finalmente la pareja dará a luz 74 parejas por año. Las palomas habitan en zonas rurales y urbanas, al año pueden producir 12 kilogramos de heces, estas generalmente son depositadas en lugares de alojamiento y alimentación²⁰.

Las palomas actúan como un reservorio de agentes patógenos, es por ello que han sido catalogadas como transmisoras de enfermedades zoonóticas. Diversos estudios sugieren el término “sinantrópicos” para referirse a los animales que viven cerca de viviendas humanas y que tienen contacto directo o indirecto con humanos, ante esta situación ha aumentado la población de palomas debido a su capacidad de adaptación y la colonización de nuevos nichos ecológicos por lo cual, representa un riesgo para la salud de las personas ya que pueden transmitir infecciones fúngicas, virales, bacterianas y parasitarias²¹.

López Funes, J (2018) investigación sobre “Aislamiento de ***Cryptococcus neoformans*** (San Felice) en heces de palomas (***Columba livia***), provenientes de lugares públicos de El Salvador” tuvo como objetivo Aislar ***Cryptococcus neoformans*** de heces de paloma de (***Columba livia***) provenientes de ocho departamentos de El Salvador. Obtuvo como resultado que de 66 muestras analizadas 8 dieron positivo a ***Cryptococcus neoformans*** representando así el 12% del total. Concluyeron que el bajo porcentaje obtenido es posible que sea debido a factores ambientales¹.

Guerrero, E. et al. (2018), tuvieron como objetivo determinar la presencia de ***Cryptococcus neoformans*** y ***Cryptococcus gattii*** en el municipio de San José de Cúcuta. Obtuvieron como resultado que, de un total de 389 muestras obtenidas en los parques de estudio, se identificaron 11 colonias de ***Cryptococcus neoformans*** genotipo VNI y 1 como ***Cryptococcus gattii*** genotipo VGI. Concluyeron que en el 75% de áreas estudiadas se encuentran microorganismos patógenos de ***Cryptococcus sp.***²².

López, k. et al. (2018), Investigación sobre “Aislamiento de ***Cryptococcus neoformans*** en excretas de palomas (***Columba livia***) encontradas en suelo y nidos dentro de las instalaciones del Hospital Nacional Rosales de El Salvador, en el periodo de junio - julio 2018” tuvieron como objetivo comprobar si las muestras presentan el hongo levaduriforme en excretas de palomas que se encuentran en instalaciones del Hospital. Obtuvieron como resultado que, de un total de 16 muestras obtenidas en diversas zonas del hospital, 6 dieron positivo a ***Cryptococcus neoformans***, representando así un total de 37.5%. Concluyeron que actualmente hay presencia del hongo levaduriforme en las instalaciones de dicho hospital².

Timmermann, R. et al. (2020), investigación sobre “***Cryptococcus neoformans*** en heces de palomas mensajeras y de Castilla (***Columba livia***) en Lima, Perú” tuvieron como objetivo determinar la prevalencia de ***Cryptococcus neoformans***. Obtuvieron como resultado que de 310 muestras analizadas 16 dieron positivo a ***Cryptococcus neoformans***. representando así el 5.16% del total, también determinaron una prevalencia de 4.59 y 5.61%. Finalmente concluyeron que el hongo ***Cryptococcus neoformans*** se encuentra presente en el estiércol de palomas Castilla²³.

Huamán, A. et al. (2018), investigación sobre “***Cryptococcus neoformans*** en heces de palomas (***Columba livia***) en Lima Metropolitana” tuvieron como objetivo Investigar la presencia del hongo levaduriforme ***Cryptococcus neoformans*** en heces de palomas domésticas (***Columba livia***). Obtuvieron como resultado que de 300 muestras analizadas 47 dieron positivo a ***Cryptococcus sp.*** de las cuales 7 pertenecen a la especie neoformans representando así un total de 14,9%. Concluyeron que ***Cryptococcus neoformans*** está presente en el estiércol de las palomas estudiadas²⁴.

Chávez, O. et al. (2018), investigación sobre “Aislamiento de ***Cryptococcus neoformans*** y ***Salmonella spp.*** en excretas de palomas domésticas (***Columba livia***) de la Catedral de Lima y Convento de San Francisco Lima, Perú” tuvieron como objetivo evaluar la presencia de ***Salmonella spp.*** y ***Cryptococcus neoformans*** en excretas de palomas. Obtuvieron como resultado que de 47 muestras analizadas todas dieron negativo a ***Salmonella spp.*** Sin embargo 9

muestras dieron positivo a ***Cryptococcus neoformans***. Concluyeron que hay presencia de dicho hongo levaduriforme²⁵.

La realización de la presente investigación se justifica debido a que se desconoce si actualmente hay presencia de ***Cryptococcus neoformans*** en excretas de palomas que habitan en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa, ya que en esta Ciudad hay una numerosa población de estas aves que se ubican en diferentes lugares y representa un peligro de infección para la población inmunodeprimida. Las personas con el sistema inmunológico deprimido que inhalan el hongo levaduriforme corren el riesgo de desarrollar la criptococosis grave como meningitis criptocócica y criptococosis cutánea. Finalmente, este estudio permitirá obtener información y así de esta manera las autoridades sanitarias podrán tomar medidas en el control de excretas de palomas para evitar la transmisión de esta enfermedad.

El objetivo general del estudio es determinar la presencia del hongo ***Cryptococcus neoformans*** en excretas de paloma (***Columba livia***) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa, octubre 2021.

Nos planteamos la siguiente hipótesis: Dada la gran cantidad de palomas (***Columba livia***) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa es posible encontrar excretas contaminadas con ***Cryptococcus neoformans***.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Enfoque y diseño de la investigación

El presente estudio de investigación se realizó con un enfoque cuantitativo ya que los resultados se expresaron valores numéricos y cualitativo por que el resultado final es un valor dicotómico sin un orden y que está sujeto a clasificación.

En relación a su diseño es descriptivo, ya que la investigación que proponemos tiene como objetivo verificar un posible hecho sin variar las condiciones de las situaciones independientes y es de corte transversal.

II.2. Población, muestra y muestreo

Población

La Población estuvo conformada por excretas de palomas (*Columba livia*) presentes en la superficie de zonas muestreadas con área total de 19034 m².

Muestra

Se obtuvieron 113 muestras de heces seleccionadas al azar. Se tomaron las muestras del piso (suelo) en diferentes áreas que comprende la Plaza de Armas, los portales y la catedral, cada muestra se recolectó en bolsas Ziploc de primer uso que contuvo 1 a 3 gramos de materia fecal, posteriormente fueron selladas herméticamente y transportadas al laboratorio, donde se realizó su selección y procesamiento. El muestreo se realizó el día 17 de octubre del 2021 (8:00 AM – 4:00 PM).

A continuación, se especifica el número y nombre de las áreas para el muestreo que se tomó en cuenta en la realización del presente estudio.

1. Plaza de Armas
2. Catedral
3. Portal de San Agustín
4. Portal de la Municipalidad
5. Portal de las Flores

Criterios de Inclusión:

- Excretas de palomas (*Columba livia*) presentes en la Plaza de Armas, los portales y la Catedral.

Criterios de Exclusión:

- Excretas contaminadas con barro.
- Excretas con basura.
- Excretas pisoteadas.

Muestreo

El tipo de muestreo utilizado en la investigación correspondió a un muestreo no probabilístico, intencional o de conveniencia, cuyo criterio dependió del investigador. El sitio de estudio está ubicado en el Cercado de la Ciudad de Arequipa.

II.3. Variables de investigación

Variable principal: Presencia de *Cryptococcus neoformans*

Definición conceptual: Existencia en excretas de paloma (*Columba livia*) de una levadura productora de melanina, urea positiva, de forma globular a ovoide y encapsulada.

Definición operacional: En el medio Agar Sabouraud dextrosa con adición de cloranfenicol crecen colonias lisas mucoides y color crema, observadas al

microscopio con tinta china son levaduras capsuladas y positivos a la prueba bioquímica de enzima ureasa.

II.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

II.4.1. Fuentes primarias

La caracterización e identificación del hongo **Cryptococcus neoformans**, selección y procesamiento de muestras obtenidas, sembrado en placa Petri que contiene el medio de cultivo agar dextrosa sabouraud, análisis macroscópico, identificación microscópica (tinción en tinta china) y la prueba bioquímica de enzima ureasa; siendo estos resultados de primera fuente.

II.4.2. Fuentes secundarias

Como fuentes secundarias acudimos a la referencia bibliográfica de libros, revistas, artículos, publicaciones, documentos y tesis que preceden esta investigación en un plazo no superior a 5 años. También se han utilizado resultados y procedimientos de libros con antigüedad mayor de 5 años, pero que todavía tienen información actualizada y vigente. Todos estos materiales de aprendizaje son la base de esta investigación.

II.5. Plan metodológico para la recolección de datos

II.5.1. Muestreo.

Se obtuvieron 113 muestras fecales recolectadas del suelo.

Procedimiento

- Las muestras de excretas fueron recogidas del suelo, así como del piso de zonas de descanso en diferentes áreas dentro del lugar de estudio.
- Las muestras se recogieron en bolsas Ziploc, cada bolsa contiene aproximadamente de 1 a 3 gramos de heces secas y frescas.

- Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio para su posterior selección y procesamiento.
- Se utilizaron las siguientes medidas de protección: Delantales desechables para evitar el transporte de partículas contaminadas en la ropa, mascarillas desechables y guantes desechables.

II.5.2. Determinación de la presencia del hongo levaduriforme *Cryptococcus neoformans*

Procesamiento de muestras

- Tomar 1 a 3 g de cada muestra seleccionada, enseguida disolver en 20 ml de solución salina estéril con una concentración de 0.85%.
- Homogeneizar la mezcla en un agitador eléctrico por tres minutos aproximadamente.
- Dejar en reposo de 30 min, pasado ese tiempo volver a homogenizar.
- Dejar en reposo 30 min enseguida tomar con el asa de siembra (asa bacteriológica) una muestra del sobrenadante y sembrar en las placas Petri que contienen agar sabouraud dextrosa con cloranfenicol cuya razón es de 0,1 g del antibiótico por litro de agar²⁶.

Proceso de sembrado en placa de Petri que contiene el medio de cultivo suplementado agar sabouraud dextrosa

Agar sabouraud dextrosa es un medio de peptona que está suplementado con dextrosa (favorece el crecimiento de hongos). Contiene peptona de caseína y digerido pancreático de tejido animal, que proporcionan la fuente de carbono y nitrógeno para el desarrollo de los microorganismos.

La dextrosa es un azúcar que proporciona una fuente de energía para el crecimiento del hongo levaduriforme. El cloranfenicol es un

antibiótico de amplio espectro cuyo efecto inhibitor abarca una amplia variedad de bacterias gram negativas y gram positivas. El bajo pH (5,6 aproximadamente) del medio resulta favorable para el crecimiento de los hongos.

- Rehidratar 65 g del medio en un litro de agua destilada.
- Poner en reposo 10 a 14 minutos.
- Calentar y agitar con frecuencia hasta que alcance el punto de ebullición, esperar un minuto, de esta manera lograremos disolverlo completamente.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Enfriar aproximadamente hasta que baje la temperatura del medio a 45°C.
- Agregar cloranfenicol 0.1 g por litro de agar sabouraud dextrosa.
- Plaquear en cajas de Petri estériles.
- Tomar con un asa el sobrenadante de cada muestra y sembrar en estría.
- Empaquetar y rotular
- Incubar a 37°C durante 5 a 7 días
- Observar el crecimiento de microorganismos

Identificación macroscópica

Se observa si la colonia que ha crecido en el medio de cultivo corresponde a una cepa de levadura, considerando los siguientes factores: El medio utilizado para el crecimiento y la separación primaria es agar de sabouraud dextrosa con cloranfenicol²⁷. De acuerdo con las recomendaciones del Instituto Nacional de Salud, las colonias de levadura a observar son ligeramente abombadas o planas, con una consistencia cremosa y lisa, suave y de color blanco.

Identificación a través de la tinción de la cápsula en tinta china (tinción negativa)

Bajo el microscopio y de acuerdo con las recomendaciones del Instituto Nacional de Salud las células del hongo levaduriforme ***Cryptococcus neoformans*** tienen como característica la presencia de cápsulas de polisacáridos, que se pueden ver cuando se inspeccionan directamente con el método de tinción negativa.

La coloración se fundamenta en teñir el fondo del frotis en un color oscuro de esta manera las levaduras del hongo se aprecian refringentes, rodeadas por un halo claro que corresponde a la cápsula. Esto ocurre porque la tinta china es una sustancia incapaz de penetrar la cápsula de polisacárido.

- La muestra se toma de la colonia previamente observada en la identificación macroscópica.
- Enseguida se traspasa a una lámina portaobjeto.
- Realizar un extendido en la lámina.
- Añadir una gota de tinta china y extender uniformemente.
- A continuación, visualizar la lámina que contiene la muestra con tinta china en el microscopio con un objetivo de 40X y 100X
- Este método nos permite observar el contraste de la cápsula de polisacárido del hongo ***Cryptococcus neoformans***, donde se puede visualizar la presencia de un halo claro y nítido que contornea la célula.

Caracterización bioquímica a través de la prueba de enzima ureasa

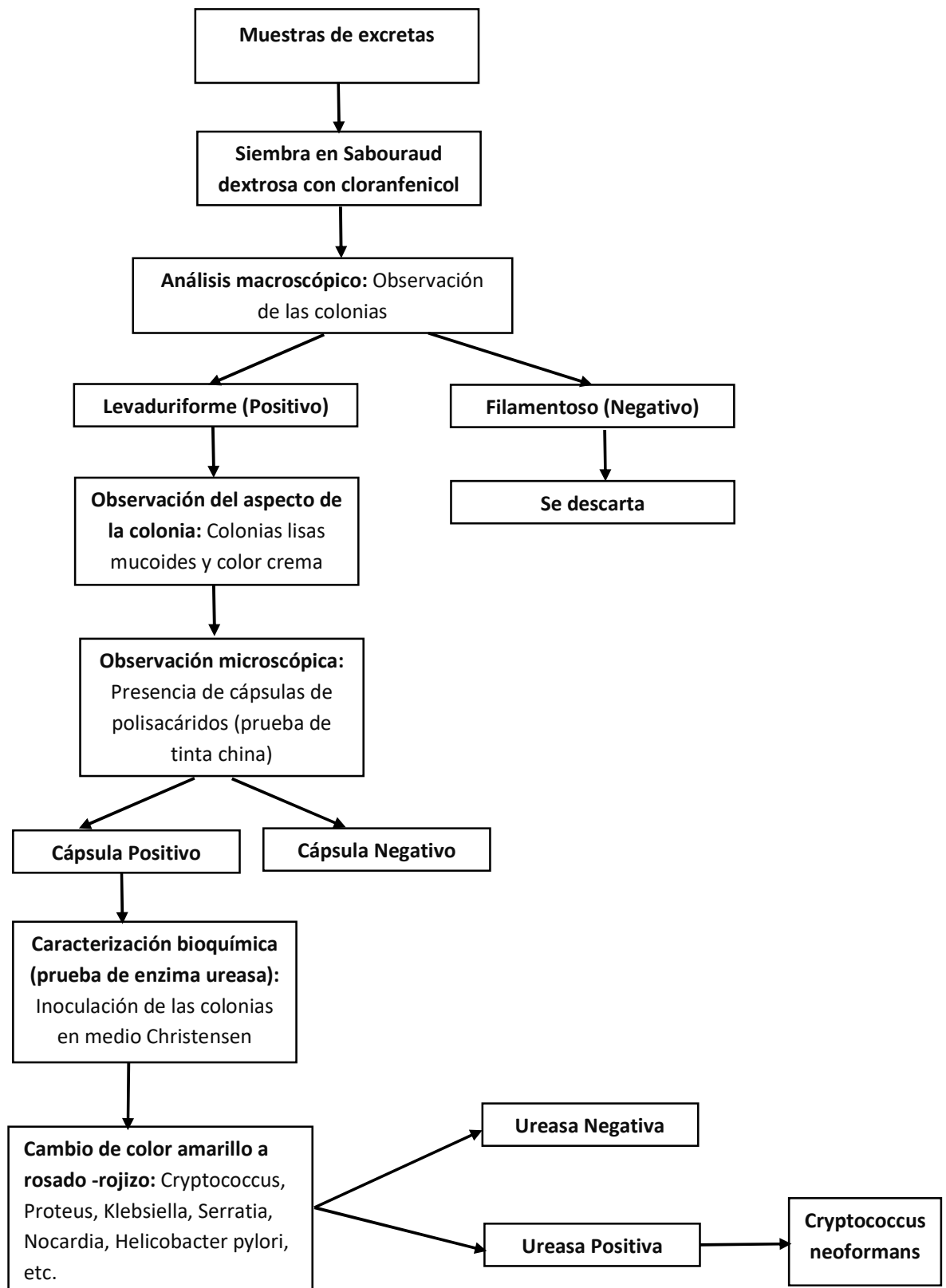
Una vez realizado la identificación macroscópica de las colonias blancas mucoides en el medio de crecimiento sabouraud dextrosa agar, observar en el microscopio la cápsula de la levadura por

examen directo de contraste con tinción negativa (tinción con tinta china) y según las recomendaciones del Instituto Nacional de Salud se procedió a la inoculación de las colonias en medio Christensen (colonias que fueron positivas al examen directo de tinción negativa), todo esto para realizar la prueba bioquímica de enzima ureasa.

La glucosa y la triptéina brindan los nutrientes necesarios para el desarrollo del microorganismo. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y como indicador de pH se encuentra el rojo de fenol. El hongo ***Cryptococcus neoformans*** produce enzima ureasa, realiza la transformación de la urea a dióxido de carbono y amonio, de este modo el medio sufre un aumento de pH el cual se traduce en el cambio de color amarillo a rosado - rojizo en el indicador rojo fenol.

- Pesar 24 g del polvo y mezclar con 950 ml de agua destilada.
- Dejar en reposo 5 minutos.
- Calentar, agitar frecuentemente y llevar a ebullición.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Dejar enfriar a 50°C y añadir 50 ml de una solución de urea al 40%.
- Colocar en tubos de ensayo y dejar solidificar el medio en pico de flauta.
- Tomar una muestra de colonias que resultaron positivas a la prueba directa de contraste de la cápsula en tinción negativa.
- Realizar la incubación a una temperatura de 37 °C por 4 a 6 horas aproximadamente.
- En las muestras que resulten positivas a la prueba de enzima ureasa se observa un notorio cambio de color amarillo a rosado - rojizo dentro de las 6 horas que se mantiene en la incubadora.

Screening para recolección de datos



II.6. Procesamiento del análisis estadístico

Los datos que se obtuvieron en el presente estudio fueron procesados con auxilio de los paquetes estadísticos: Microsoft Excel y SPSS-20.0; siguiendo un patrón de tabulación automatizado. Los resultados se presentan en tablas y cuadros estadísticas de acuerdo a los objetivos de este estudio.

II.7. Aspectos éticos

Los datos presentados en el siguiente trabajo solo tienen fines de investigación en cuya ejecución se reportaron valores verdaderos sin ninguna manipulación; cabe resaltar que la presente investigación se realizó con todas las normas de bioseguridad.

III. RESULTADOS

Tabla 01. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas (*Columba Livia*) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa.

		<i>Cryptococcus neoformans</i>		TOTAL
		POSITIVO	NEGATIVO	
Plaza de Armas	Muestras secas	4	38	42
	Muestras frescas	1	10	11
	% del total	4.42	42.48	46.9
Catedral	Muestras secas	3	29	32
	Muestras frescas	1	6	7
	% del total	3.54	30.97	34.51
Portal de San Agustín	Muestras secas	0	7	7
	Muestras frescas	0	1	1
	% del total	0	7.08	7.08
Portal de la Municipalidad	Muestras secas	0	2	2
	Muestras frescas	0	0	0
	% del total	0	1.77	1.77
Portal de las Flores	Muestras secas	1	8	9
	Muestras frescas	0	2	2
	% del total	0.88	8.85	9.73
TOTAL	Muestras secas	8	84	92
	% del sub total	8.70	91.30	81.42
	Muestras frescas	2	19	21
	% del sub total	9.52	90.48	18.58
	% del total	8.85	91.15	100

Se obtuvieron un total de 113 muestras de excretas de palomas (*Columba livia*) en todas las áreas de muestreo, de los cuales el 8,85 % (10/113) resultaron positivos a todas las pruebas realizadas para determinar la presencia de *Cryptococcus neoformans*. Para las 92 muestras secas analizadas 8 resultaron positivas a todas las pruebas que representa un 8.85% del total de muestras secas y con respecto a las 21 muestras frescas analizadas 2 resultaron positivo a todas las pruebas lo que representa un 9.52% del total de muestras frescas. El área que presentó el mayor porcentaje de casos positivos es la Plaza de Armas con 4,42% (5/113) de muestras analizadas (Tabla 01).

Tabla 02. Resultados de la caracterización macroscópica de la levadura de *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas en la Plaza de Armas, Los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa.

Zona de muestreo	Subtotal muestras	Sabouraud Dextrosa agar			
		positivo		negativo	
		n	%	n	%
Plaza de Armas	53	7	6.19	46	40.71
Catedral	39	5	4.42	34	30.09
Portal de San Agustín	8	1	0.88	7	7.08
Portal de la Municipalidad	2	0	0	2	1.77
Portal de las Flores	11	2	1.77	09	7.96
Total	113	15	13.26	98	87.71

Caracterización macroscópica de la levadura de *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas a través de la inspección visual del crecimiento en agar Sabouraud dextrosa con adición del antibiótico cloranfenicol que es específico para hongos resultando 15 pruebas positivas que representa un 13.26% del total (Tabla 02).

Tabla 03. Resultados de la identificación microscópica de *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas en la Plaza de Armas, Los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa.

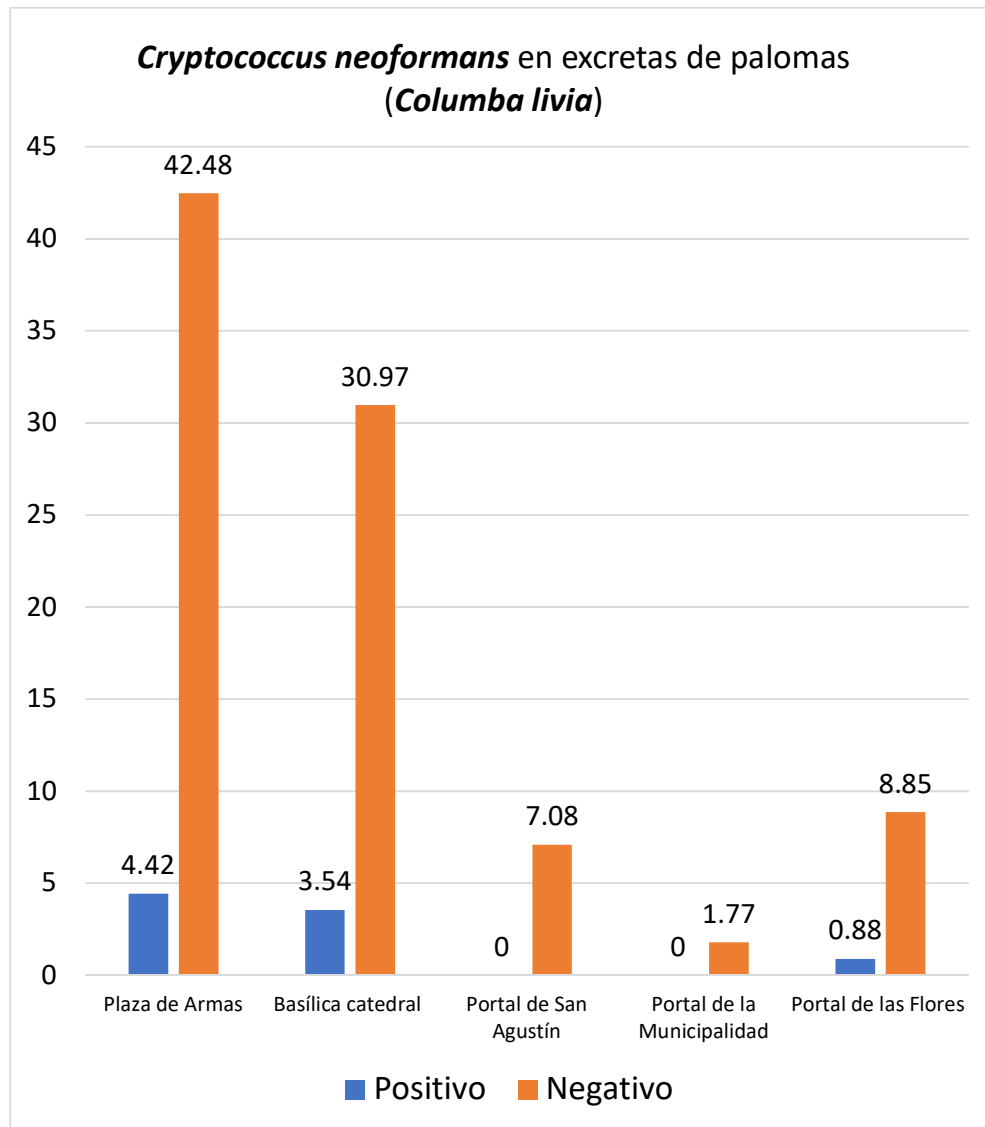
Zona de muestreo	Subtotal muestras	Tinta china			
		positivo		negativo	
		n	%	n	%
Plaza de Armas	53	06	5.31	47	41.59
Catedral	39	05	4.42	34	30.09
Portal de San Agustín	8	1	0.88	7	6.19
Portal de la Municipalidad	2	0	0	2	1.77
Portal de las Flores	11	1	0.88	10	8.85
Total	113	13	11.49	90	88.49

Identificación microscópica mediante la prueba de tinta china que identifica el género *Cryptococcus* con un resultado de 13 muestras positivas que representa un 11.49% del total (Tabla 03).

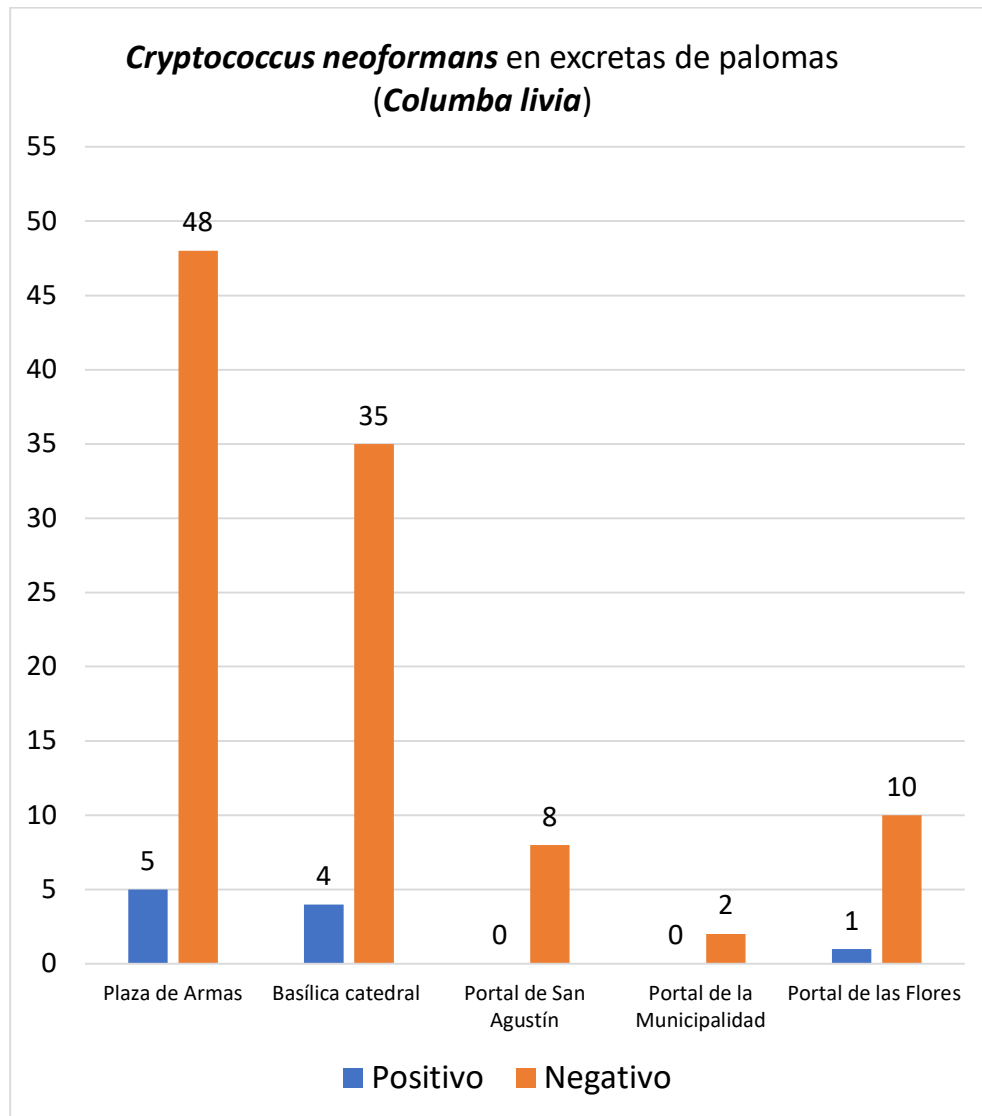
Tabla 04. Resultados de la caracterización bioquímica de *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas en la Plaza de Armas, Los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa.

Zona de muestreo	Subtotal muestras	Enzima ureasa			
		positivo		negativo	
		n	%	n	%
Plaza de Armas	53	5	4.42	48	42.48
Catedral	39	4	3.54	35	30.97
Portal de San Agustín	8	0	0	8	7.08
Portal de la Municipalidad	2	0	0	2	1.77
Portal de las Flores	11	1	0.88	10	8.85
Total	113	10	8.85	103	91.15

bioquímica de *Cryptococcus neoformans* mediante la prueba de la enzima ureasa que es específico para la especie Neoformans con un resultado de 10 pruebas positivas que representa un 8.85% del total. (Tabla 04).

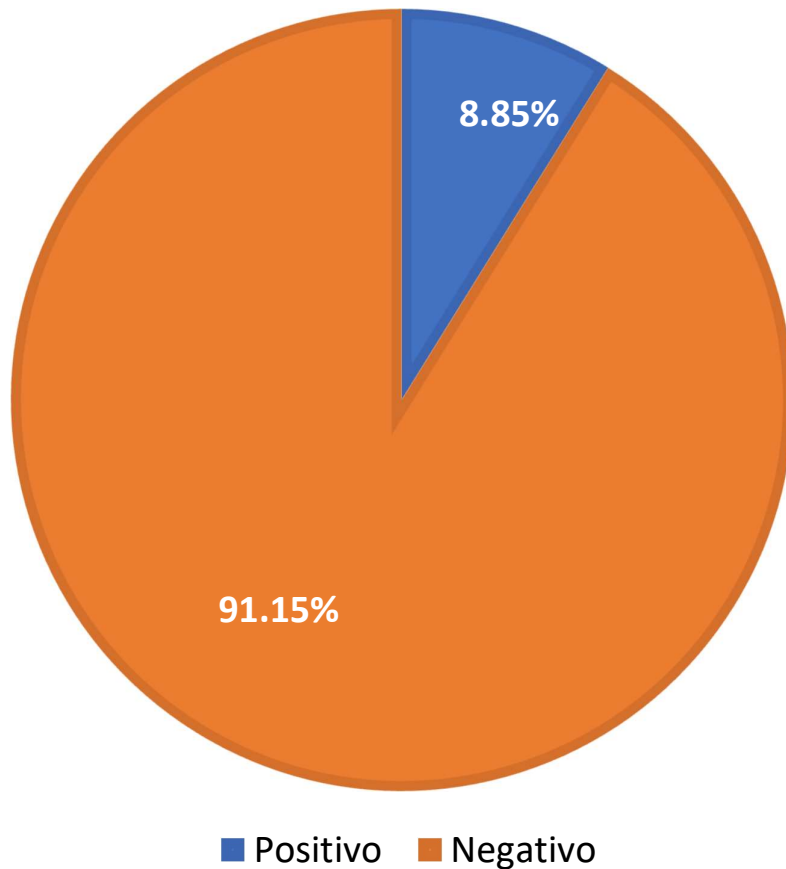


Gráfica 01. Muestras negativas y positivas de *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas (*Columba livia*) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa expresado en porcentaje con respecto a la muestra total en diferentes áreas del lugar de estudio.



Gráfica 02. Muestras negativas y positivas de *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas (*Columba livia*) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa con respecto a la muestra total en diferentes áreas del lugar de estudio.

***Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas (*Columba livia*)**



Gráfica 03. Resultado general de determinación de la presencia de ***Cryptococcus neoformans*** en excretas de palomas (***Columba livia***) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa.

IV. DISCUSIÓN

IV.1. Discusión de resultados

En el presente estudio se obtuvo como resultado de las 113 muestras analizadas, 10 dieron positivo a ***Cryptococcus neoformans*** que representa el 8,85 % (tabla 02), lo cual es un resultado similar a lo hallado por Timmermann en el año 2020 en la Ciudad de Lima donde obtuvieron como resultado de 310 muestras analizadas, 16 dieron positivo a ***Cryptococcus neoformans***, representando así el 5.16% del total²³. Esto podría deberse a la disponibilidad de alimentos y el mayor número de lugares que les sirven de refugio donde anidan para reproducirse y contaminar con excretas los lugares públicos de la Ciudad de Lima, generando la proliferación de estas aves.

Por otra parte, existe una marcada diferencia entre el presente estudio donde se determinó una proporción de 8,85 % (10/113) y lo que encontró Chávez, O. cuyo estudio fue realizado en la Catedral de Lima y Convento de San Francisco Lima en el año 2018 con un resultado de 9 muestras positivas (19.15%) a ***Cryptococcus neoformans***²⁵. La causa probable en la diferencia podría ser que el estudio se realizó en una muestra menor (47) condicionando así el resultado final.

Otra investigación que se tomó en cuenta en el presente estudio es el realizado por Huamán, A. en el año 2018 en la Ciudad de Lima Metropolitana en este caso se analizó 300 muestras de las cuales 47 dieron positivo a ***Cryptococcus sp.*** y 7 (2.33%) correspondieron a la especie ***Cryptococcus neoformans***²⁴. Los estudios que presentamos se llevaron a cabo en la Ciudad de Lima ya sea en plazas, Iglesias, etc. donde habitan estas aves, podemos ver que menos del 10% de la población evaluada presentan ***Cryptococcus neoformans*** a excepción del trabajo presentado por Chávez, O. Según este panorama podríamos decir que nuestro estudio se encuentra dentro del rango por que representa un 8.85% del total.

Hasta hace poco, se consideraba que ciertas condiciones en las que se encontraban excrementos de palomas, como espacios abiertos y luz solar directa, inhibían el crecimiento microbiano. Sin embargo, en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa se aisló e identificó ***Cryptococcus neoformans*** en heces de palomas (***Columba livia***) con exposición directa a los rayos solares donde la radiación alcanza niveles de 15 hasta 19 puntos en esta temporada, Esto se debe a la capacidad de las especies patógenas de *Cryptococcus* para producir pigmentos melanoides, lo que no solo les permite sobrevivir a la radiación solar, sino que incluso pueden utilizar la radiación como energía metabólica, lo que es conveniente para sobrevivir hasta que los excrementos se convierten en polvo. Este polvo contiene levaduras que tienen solo 1-2 micras de diámetro y están encapsuladas, lo que les permite llegar fácilmente a los espacios alveolares cuando se inhalan²⁹.

En términos generales en cuanto a las palomas (***Columba livia***) y su incremento en cuanto a su población en la Ciudad de Arequipa se debe principalmente a factores antropogénicos como podría ser la alimentación de estas aves por parte de visitantes a estos lugares públicos, además estos animales cuentan con lugares propicios para su desarrollo como son los árboles copiosos y lugares ideales para el anidamiento lo que ha permitido la acumulación de heces en todas las áreas muestreadas. Estas aves constituyen un reservorio de agentes zoonóticos como ***Cryptococcus neoformans*** que es causante de la criptococosis principalmente en personas con el sistema inmunológico disminuido.

No existen estudios que hayan establecido condiciones de muestreo apropiadas para determinar la presencia de este patógeno. Esto podría deberse a variaciones en las condiciones o factores en cada área geográfica que afectan el crecimiento de hongos. Algunos estudios han demostrado que este hongo normalmente no se aísla de las heces recientes, y otros estudios no han mostrado diferencias significativas en la frecuencia de aislamiento entre las excretas frescas y secas, entendiendo como secas a las heces envejecidas. Al determinar la presencia del agente, el resultado fue similar en muestras secas (8.70%) y muestras frescas (9.52%) lo que nos lleva a

concluir que en presente estudio hay poca diferencia en cuanto a la condición de las excretas de palomas (secas y frescas).

Por otro lado, sería conveniente, realizar campañas de educación a la población que promueve el decrecimiento en número de estas aves que atentan contra la salud pública de la Ciudad. De igual manera, como personal de salud, debemos estar informados, actualizados y continuar con la investigación sobre este agente ya que existe muy poca información sobre este hongo y las pruebas que se realizan para diagnosticar las enfermedades producidas.

IV.2. Conclusiones

- Se determinó la presencia de ***Cryptococcus neoformans*** en excretas de palomas (***Columba livia***) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa representando un 8,85% (10/113) de muestras positivas.
- Se caracterizó macroscópicamente la levadura de ***Cryptococcus neoformans*** en excretas de palomas a través de la inspección visual del crecimiento de colonias en agar Sabouraud dextrosa con un resultado de 15 muestras positivas que representa un 13.26% del total.
- Se identificó microscópicamente ***Cryptococcus neoformans*** en excretas de palomas mediante la prueba de tinta china con un resultado de 13 muestras positivas que representa un 11.49% del total.
- Se caracterizó bioquímicamente ***Cryptococcus neoformans*** mediante la prueba de la enzima ureasa con un resultado de 10 pruebas positivas que representa un 8.85% del total.

IV.3. Recomendaciones

- La presencia de ***Cryptococcus neoformans*** en excretas de palomas en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa representa un peligro para la salud particularmente en individuos con sistema inmunológico debilitado, por lo tanto, estas aves deben ser monitoreadas y controladas, además se debe implementar medidas de concientización pública que requieren esfuerzos conjuntos de autoridades y trabajadores de la salud.
- Se recomienda realizar un estudio en un área mayor o en diferentes puntos de la Ciudad de Arequipa, ya que estas aves se encuentran ampliamente distribuidos alrededor del casco urbano y de esta manera determinar la prevalencia del hongo levaduriforme ***Cryptococcus neoformans*** en las excretas de las palomas (***Columba livia***).
- Revisar y discutir los resultados de este trabajo para poder así desarrollar estrategias de salud pública.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. José Guillermo López Funes. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuil., 1901 en heces de paloma de castilla (*Columba livia*) provenientes de lugares públicos [Internet]. El Salvador; 2018 [Citado el 20 de julio de 2021]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/19521/1/19201096.pdf>
2. López, K. et al. (2018). Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas (*Columba livia*) encontradas en suelo y nidos dentro de las instalaciones del Hospital Nacional Rosales de El Salvador, en el periodo de junio-julio 2018 [Internet]. El Salvador; 2018 [Citado el 20 de julio de 2021]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/19337/1/Aislamiento%20de%20Cryptococcus%20neoformans%20en%20excretas%20de%20palomas%20%28Columba%20livia%29%20encontradas%20en%20suelo%20y%20nidos%20dentro%20de%20las%20instalaciones%20del%20Hospital%20Nacional%20Rosales%20de%20El%20Salvador%2C%20en%20el%20periodo%20de%20junio-julio%202018%E2%80%9D.pdf>
3. INFORME ETES-DAUM-DIGEMID/MINSA [Internet]. [Peru]; DIGEMID, 2012 [Citado el 12 de julio de 2021]. Disponible en: https://repositorio.digemid.minsa.gob.pe/bitstream/handle/DIGEMID/79319/24_INFORME_FLUCITOSINA.pdf?sequence=2&isAllowed=y#:~:text=La%20Criptococosis%20es%20una%20infecci%C3%B3n,infecciones%20en%20humanos%20y%20animales.
4. BestPractice. *Cryptococcosis: Epidemiology* [Internet]. London: BMJ Publishing Group Limited; c2014 [Citado 14 de agosto de 2021]. Disponible: <http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/917/basics/epidemiology.html>

5. Josselyn Alexandra Cardoza Ipanaque. Especies de *Aspergillus* de cepas aisladas del aire de la Ciudad de Piura - Perú entre julio y octubre del 2017 [Internet]. Perú; 2019 [Citado el 21 de julio de 2021]. Disponible en: <https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/2015/BIO-CAR-IPA-2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
6. Felipe S. Díaz Vargas. Plagas Urbanas: Las palomas y su impacto sobre el ambiente y la salud pública. *Revista de Ciencias Veterinarias* [Internet]. 2017 [Citado el 23 de julio de 2021]. Vol. 33 N° 1: 4-33 Disponible en: <https://www.urp.edu.pe/pdf/id/2615/n/revista-cv.-felipe.-n-1.2017-1.pdf>
7. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Situación epidemiológica del VIH-Sida en el Perú. *RENACE* [Internet]. 2021 [Citado el 15 de septiembre de 2021]. 2-9 Disponible en: https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/vih/Boletin_2021/setiembre.pdf
8. Inagaki OC, Iwashita AT, Ramos MC, Bustamante B, Contreras VM, Pérez NF. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* y *Salmonella* spp. en excretas de palomas domésticas (*Columba livia*) de la Catedral de Lima y Convento de San Francisco Lima, Perú. *Salud y Tecnología Veterinaria*. 16 de agosto de 2018;6(1):28.
9. Martín E, Valverde A. Criptococosis: Diagnóstico Microbiológico y Estudio de la Sensibilidad In Vitro. *Control Calidad SEIMC* [Internet]. 2017 [Citado el 10 de Agosto de 2021]. 1-4 Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/cripto.pdf>
10. Timmermann Flores Ricardo Ernesto. Presencia de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas mensajeras y de castilla (*Columba livia domestica*) de la ciudad de Lima, Perú [Internet]. [Lima – Perú]:

Universidad Científica del Sur; 2017. Disponible en:
<http://repositorio.cientifica.edu.pe:8080/handle/UCS/480>.

11. Timarán, D. et al. (2016). Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en el casco urbano del municipio de Pasto, Colombia. 1 de junio de 2016 [Citado 6 de agosto de 2021]; Disponible en:
[http://200.21.104.25/biosalud/downloads/Biosalud15\(1\)_7.pdf](http://200.21.104.25/biosalud/downloads/Biosalud15(1)_7.pdf)
12. Alvarez, C. et al. (2010). PRESENCIA DE *Cryptococcus neoformans* EN EXCRETAS DE PALOMAS URBANAS EN SAN MIGUEL DE TUCUMÁN - ARGENTINA. Boletín Micológico [Internet]. 1 de diciembre de 2010 [Citado 10 de agosto de 2021]; Disponible en:
<http://revistas.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/71>
13. Medina Cruz Dalia Olimpya. Aislamiento e identificación de *Aspergillus* spp. en heces de palomas (*Columba livia*), en la UAAAN UL. [Internet]. [TORREIN, COAHUILA; MEXICO]: UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NAVARRO; 2010 [citado 10 de agosto de 2021]. Disponible en:
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3047/DALIA%20OLYMPIA%20MEDINA%20CRUZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
14. González Acuña D, Silva G F, Moreno S L, Cerda L F, Donoso E S, Cabello C J, et al. Detección de algunos agentes zoonóticos en la paloma doméstica (*Columba livia*) en la Ciudad de Chillán, Chile. Revista chilena de infectología. junio de 2007;24(3):199-203.
15. Redrobe S. Palomas. In: Meredith A, Redrobe S, editors. Manual de animales exóticos. Quinta edi. Barcelona - España; 2012. p. 238–54.
16. Gómez de Silva H, Oliveras de Ita A, Medellín R. *Columba livia* Gmelin, 1789. Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución

y efectos potenciales. Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. Mexico. D.F. 6p; 2005.

17. Tarsitano E, Greco G, Decaro N, Nicassio F, Lucente MS, Buonavoglia C, et al. Environmental monitoring and analysis of faecal contamination in an urban setting in the city of bari (Apulia Region, Italy): Health and hygiene implications. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(11):3972–86.
18. 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.
19. Busse O. Uber parasitare zelleinschlusse und ihre zuchtung. *Zentralbl. Bakteriol*. 1894; 16:175–80.
20. Lin X, Heitman J. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu. Rev. Microbiol*. 2006;60:69-105.
21. 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.
22. Guerrero, E. et al. (2018). Determinación de *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* a partir de aislados ambientales provenientes de los parques Santander, Mercedes Abrego, Juana Rangel de Cuellar y Fuente de Leones en el Municipio de San Jose de Cucuta, Norte de Santander [Internet]. Colombia; 2018 [Citado el 16 de agosto 2021]. Disponible en: <file:///C:/Users/gonz/Downloads/DETERMINACION%20DE%20Cryptococcus%20neoformans.pdf>
23. Timmermann F, Morales S, Villacaqui E. *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas mensajeras y de Castilla (*Columba livia*) en Lima [Internet]. Perú; 2020 [Citado el 18 de agosto de 2021]. Disponible en:

<http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v31n3/1609-9117-rivep-31-03-e18732.pdf>

24. Huamán, A. et al. (2018). *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en Lima Metropolitana [Internet]. 2018 [Citado el 18 de agosto 2021]. 29:85-89 Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v29n2/a04v29n2.pdf>
25. Chávez, O. et al. (2018). Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* y *Salmonella* spp. en excretas de palomas domésticas (*Columba livia*) de la Catedral de Lima y Convento de San Francisco Lima, Perú [Internet]. 2018 [Citado el 18 de agosto 2021]. 1: 28-34. Disponible en: [file:///C:/Users/gonz/Downloads/3375Texto%20del%20art%C3%ADculo-9128-1-10-20180816%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/gonz/Downloads/3375Texto%20del%20art%C3%ADculo-9128-1-10-20180816%20(1).pdf)
26. Cermeño J, Hernández I, Cabello I, Orellán Y, Cermeño J, Albornoz R, Padrón E, y Godoy G. *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* in dove's (*Columbia livia*) excreta in Bolívar State, Venezuela. *Rev Latinoam Microbiol* [Internet]. 2006 March [Citado el 18 de agosto 2021]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi061b.pdf>
27. Perfect J, Dismukes W, Dromer F, Goldman D, Graybill J, Hamill R, Harrison T, Larsen R, Lortholary O, Nguyen M, Pappas P, Powderly W, Singh N, Sobel J, and Sorrell T. Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. [Internet]. 2010 February [Citado el 18 de agosto 2021]. 322-291. Disponible en: <https://dukespace.lib.duke.edu/dspace/bitstream/handle/10161/4137/273500300001.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

28. Medina Y, Soto S, Mena R. y Llerena, C. ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE *Columba livia* DE AREQUIPA EN 2015 Y SU IMPLICANCIA EN LA SALUD LA SALUD HUMANA. En: Colegio De Biólogos Del Perú Consejo Regional XV-Puno Universidad Nacional del Altiplano Facultad de Ciencias Biológicas. XX CONGRESO NACIONAL DE BIOLOGIA CONABIOL 2016; Puno. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/356494557/Resumen-Densidad-Poblacional-de-Palomas-en-AQP-1>

29. Rosario I, Acosta B, Colom F. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. *Rev iberoam micol.* 2008; 25(1): S13-S18.

30. Guevara M, Urcia F, Casquero J. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. *Medicina & Laboratorio* [Internet]. 2010 [Citado el 10 de septiembre de 2021]. Volumen 16, Números 7-8: 374-397 Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2010/myl107-8d.pdf>

ANEXOS

ANEXO A: Instrumentos de recolección de datos

Tabla 1. Distribución de las muestras de heces secas y frescas de palomas (*Columba livia*) tomadas para determinar la presencia de *Cryptococcus neoformans*, según la zona de muestreo.

	Zona de muestreo	Nº de muestras	Subtotal muestras
Heces secas	Plaza de Armas	42	92
	Catedral	32	
	Portal de San Agustín	07	
	Portal de la Municipalidad	02	
	Portal de las Flores	09	
Heces frescas	Plaza de Armas	11	21
	Catedral	07	
	Portal de San Agustín	01	
	Portal de la Municipalidad	00	
	Portal de las Flores	02	
	Total	113	113

Tabla 02. *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba Livia*) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa.

		<i>Cryptococcus neoformans</i>		TOTAL
		POSITIVO	NEGATIVO	
Plaza de Armas	Muestras secas	4	38	42
	Muestras frescas	1	10	11
	% del total	4.42	42.48	46.9
Catedral	Muestras secas	3	29	32
	Muestras frescas	1	6	7
	% del total	3.54	30.97	34.51
Portal de San Agustín	Muestras secas	0	7	7
	Muestras frescas	0	1	1
	% del total	0	7.08	7.08
Portal de la Municipalidad	Muestras secas	0	2	2
	Muestras frescas	0	0	0
	% del total	0	1.77	1.77
Portal de las Flores	Muestras secas	1	8	9
	Muestras frescas	0	2	2
	% del total	0.88	8.85	9.73
TOTAL	Muestras secas	8	84	92
	% del sub total	8.70	91.30	81.42
	Muestras frescas	2	19	21
	% del sub total	9.52	90.48	18.58
	% del total	8.85	91.15	100

Zona de muestreo	Subtotal muestras	Sabouraud Dextrosa agar	Tinta china	Enzima ureasa

		positivo		negativo		positivo		negativo		positivo		negativo	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Plaza de Armas	53	7	6.19	46	40.71	06	5.31	47	41.59	5	4.42	48	42.48
Catedral	39	5	4.42	34	30.09	05	4.42	34	30.09	4	3.54	35	30.97
Portal de San Agustín	8	1	0.88	7	7.08	1	0.88	7	6.19	0	0	8	7.08
Portal de la Municipalidad	2	0	0	2	1.77	0	0	2	1.77	0	0	2	1.77
Portal de las Flores	11	2	1.77	09	7.96	1	0.88	10	8.85	1	0.88	10	8.85
Total	113	15	13.26	98	87.71	13	11.49	90	88.49	10	8.84	103	91.15

Tabla 03. Resultados de crecimiento de colonias de *Cryptococcus neoformans* a partir de muestras secas y frescas de excretas de palomas (*Columba livia*) cultivadas en medio Sabouraud, tinción negativa (tinta china) y prueba bioquímica.

ANEXO B: Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
Problema General	Objetivo General	Hipótesis General
¿Actualmente hay presencia del hongo <i>Cryptococcus neoformans</i> , en excretas de palomas (<i>Columba livia</i>) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa?	Determinar la presencia del hongo <i>Cryptococcus neoformans</i> en excretas de paloma (<i>Columba livia</i>) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa, octubre 2021.	Dada la gran cantidad de palomas (<i>Columba livia</i>) en la Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la Ciudad de Arequipa es posible encontrar excretas contaminadas con <i>Cryptococcus neoformans</i> .
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas
<ul style="list-style-type: none"> • ¿Es posible caracterizar macroscópicamente la levadura de <i>Cryptococcus neoformans</i> en excretas de palomas? 	<ul style="list-style-type: none"> • Caracterizar macroscópicamente la levadura de <i>Cryptococcus neoformans</i> en excretas de palomas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Es probable caracterizar macroscópicamente la levadura de <i>Cryptococcus neoformans</i> en excretas de palomas.
<ul style="list-style-type: none"> • ¿Es posible identificar microscópicamente a <i>Cryptococcus neoformans</i>? 	<ul style="list-style-type: none"> • Identificar microscópicamente a <i>Cryptococcus neoformans</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> • Es probable identificar microscópicamente a <i>Cryptococcus neoformans</i>.
<ul style="list-style-type: none"> • ¿Es posible caracterizar bioquímicamente a <i>Cryptococcus neoformans</i> mediante la prueba de enzima ureasa? 	<ul style="list-style-type: none"> • Caracterizar bioquímicamente a <i>Cryptococcus neoformans</i> mediante la prueba de enzima ureasa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Es probable caracterizar bioquímicamente a <i>Cryptococcus neoformans</i> mediante la prueba de enzima ureasa

ANEXO C: Operacionalización de las variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	Nº DE ÍTEMS	VALOR
Variable principal: Presencia de <i>Cryptococcus neoformans</i>	Existencia en excretas de paloma de una levadura productora de melanina, urea positivo, de forma globular a ovoide y encapsulada.	En el medio Agar Sabouraud dextrosa con adición de cloranfenicol crecen colonias lisas mucoides y color crema, observadas al microscopio con tinta china son levaduras capsuladas y positivos a la prueba bioquímica de enzima ureasa.	Caracterización macroscópica	Agar Sabouraud dextrosa	Nominal dicotómica	3	P/N
			Identificación microscópica	Prueba en tinta china			
			Caracterización bioquímica	Prueba de enzima ureasa			

LEYENDA: P/N: positivo, negativo

ANEXO D: Certificado del Laboratorio Clínico "LLERENA AMES E.I.R.L."



LABORATORIO CLÍNICO LLERENA AMES E.I.R.L.
Q.F. ARTURO LLERENA AMES (CQFA N° 00169) - TM IVETT PORTILLA LINARES (CTMP N° 5621)



LABORATORIO CLÍNICO "LLERENA AMES E.I.R.L."

EL QUE SUSCRIBE: GERENTE GENERAL DEL LABORATORIO CLÍNICO "LLERENA AMES E.I.R.L."

CERTIFICA

Que los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica, **RONI MENDOZA ALMANACIN** y **ZENAI DA MARUJA ANCCORI QUENTA**, han registrado su asistencia a este laboratorio entre los meses de octubre y noviembre del 2021, dichos alumnos han realizado durante ese periodo el desarrollo de la tesis titulada: "IDENTIFICACIÓN DE *Cryptococcus neoformans* IN VITRO EN HECE DE PALOMAS (*Columba livia*) EN LA PLAZA DE ARMAS DEL CERCADO DE AREQUIPA Y SU EFECTO EN LA SALUD PÚBLICA, 2021", dichos resultados obran en este laboratorio para las consultas necesarias.

Se expide el presente certificado a solicitud de los interesados para los fines que crean conveniente.




Q.F. Arturo Sergio Llerena Ames
CQFA N° 01657

ANÁLISIS DE: BIOQUÍMICA, COAGULACIÓN, GENÉTICA, HEMATOLOGÍA, HORMONAS, INMUNOLOGÍA, MARCADORES DE HEPATITIS, MARCADORES TUMORALES, MEDICAMENTOS, MICROBIOLOGÍA, PARÁSITOS, TOXICOLOGÍA, MARCADORES CARDIACOS Y OTROS ESPECIALIZADOS.

AV. CAYMA 630 2do. Piso OF. 3 (EDIF. BANCO SCOTIABANK) ESQUINA AV. CAYMA / AV. EJÉRCITO - CAYMA - AREQUIPA
TELÉFONOS: 256232 - RPC : 959356625 - 959356623
E-mail: arturollerenames@gmail.com
www.labllerenames.com

ADN
PATERNIDAD



ANEXO E: Evidencias fotográficas del trabajo de campo



FOTOGRAFÍA N° 1: Plaza de Armas, los Portales y la Catedral de la ciudad de Arequipa lugar donde se realizó el estudio.



FOTOGRAFÍA N° 2: En la imagen se observa la presencia de palomas *Columba livia* en la Plaza de Armas de la ciudad de Arequipa.



FOTOGRAFÍA N° 3: Presencia de excretas de palomas en la Catedral de la ciudad de Arequipa.



FOTOGRAFÍA N° 4: Realizando la obtención de muestras en la Plaza de Armas de la ciudad de Arequipa.



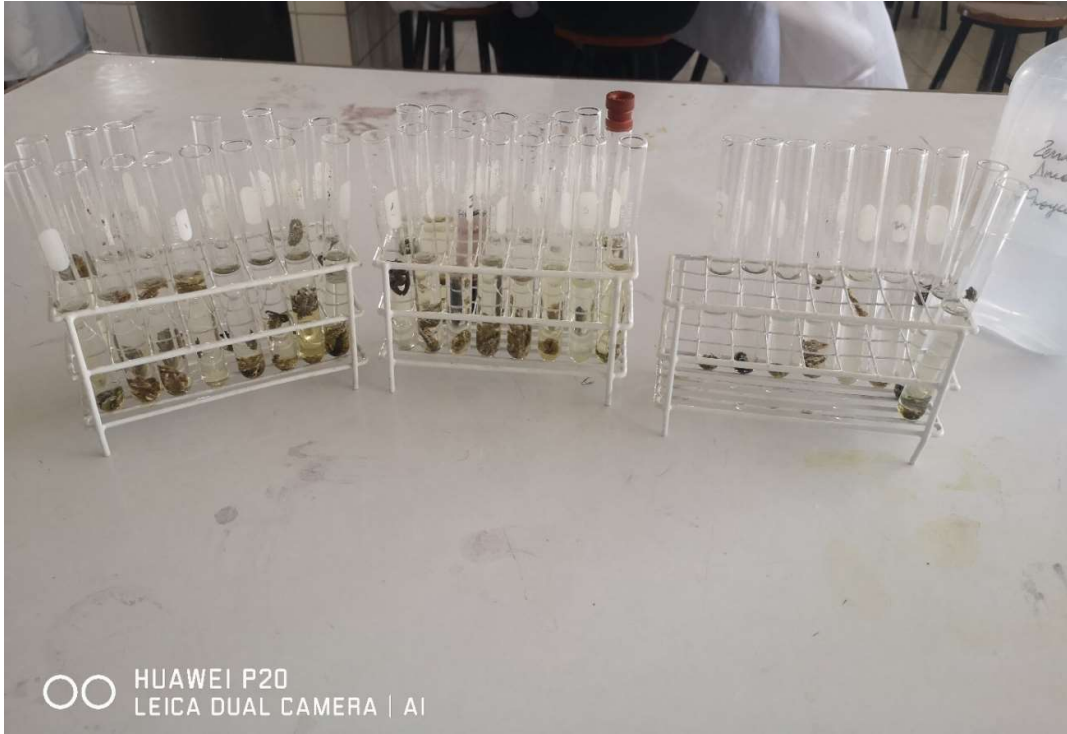
FOTOGRAFÍA N° 5: Realizando la obtención de muestras en la Plaza de Armas de la ciudad de Arequipa.



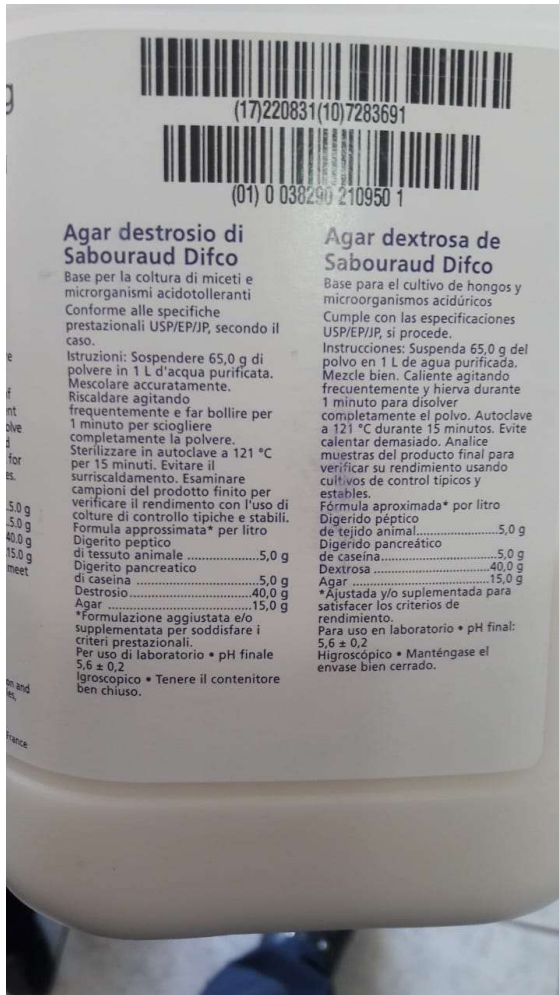
FOTOGRAFÍA N° 6: Laboratorio Clínico “LLERENA AMES E.I.R.L”, Cayma – Arequipa, lugar donde se realizó el procesamiento de las muestras



FOTOGRAFÍA N° 7: Muestras de heces de palomas en bolsas Ziploc.



FOTOGRAFÍA N° 8: Proceso de dilución de las muestras de heces de palomas.



FOTOGRAFÍA N° 9, N° 10: Instrucciones y preparado del medio de cultivo sabouraud dextrosa agar.



FOTOGRAFÍA N° 11: Proceso de plaqueo del medio de cultivo sabouraud dextrosa agar con antibiótico cloranfenicol.



FOTOGRAFÍA N° 12: Sembrado e incubación de las placas con el sobrenadante de las muestras adquiridas.



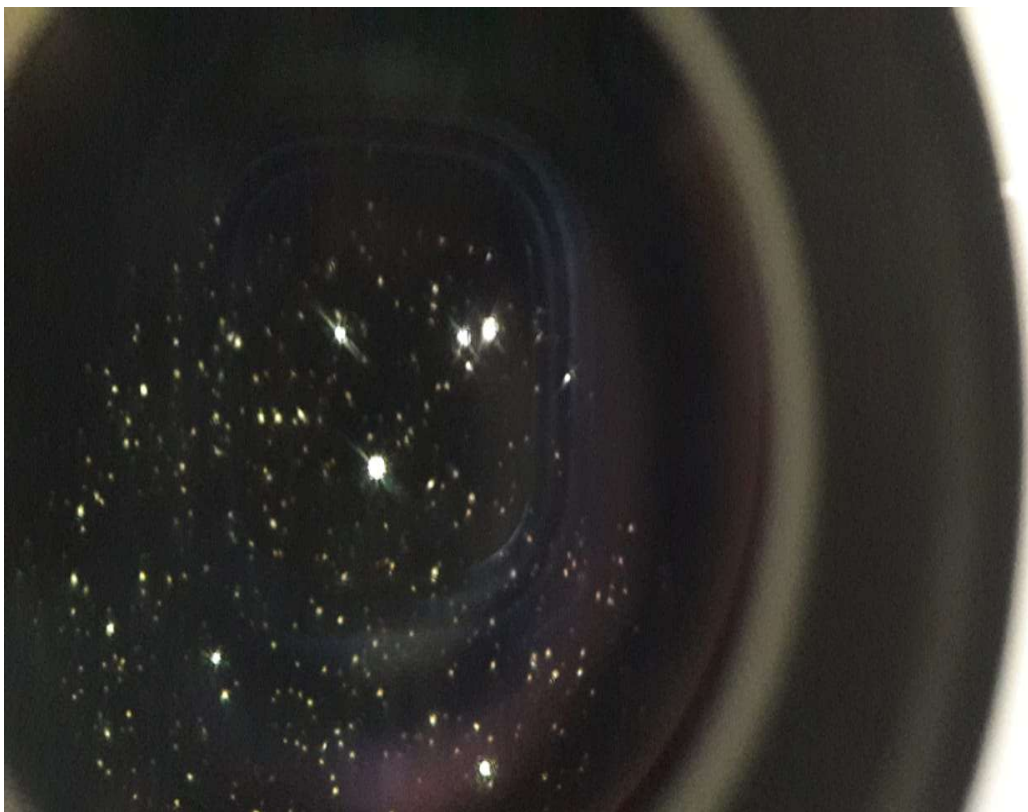
FOTOGRAFÍA N° 13: Placas con muestras positivas de *Cryptococcus neoformans*



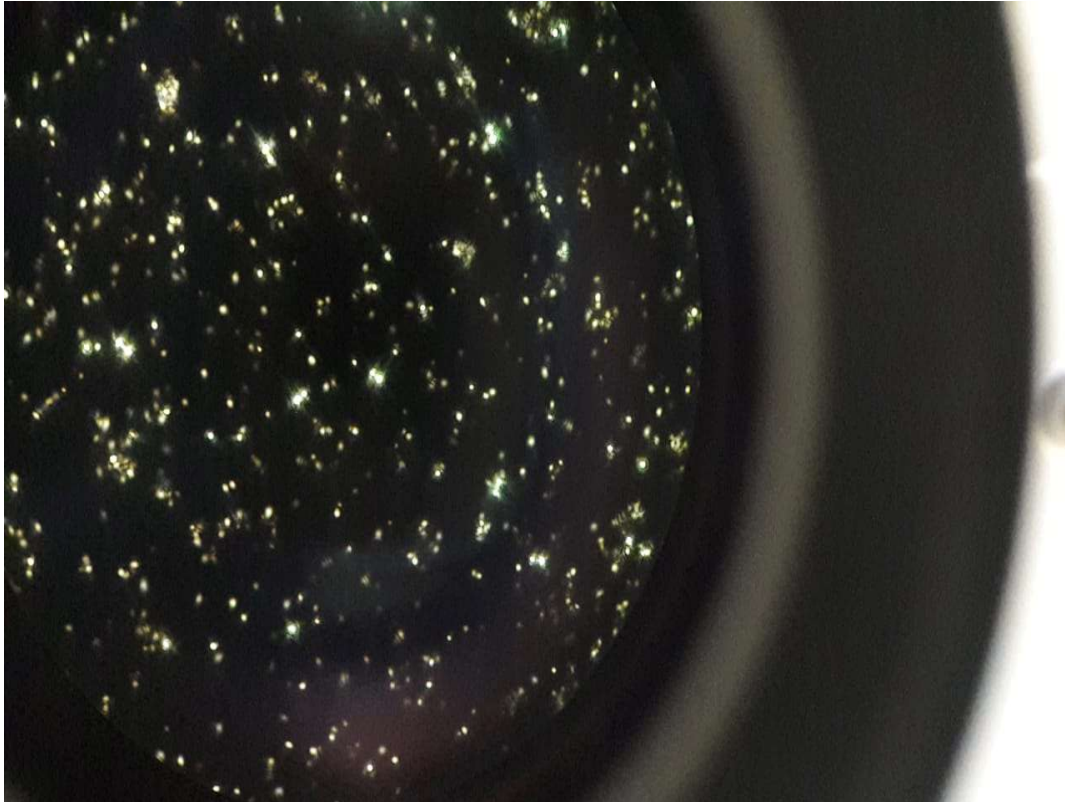
FOTOGRAFÍA N° 14: Tinción negativa (tinta china) para la observación microscópica de la cápsula de *Cryptococcus neoformans*.



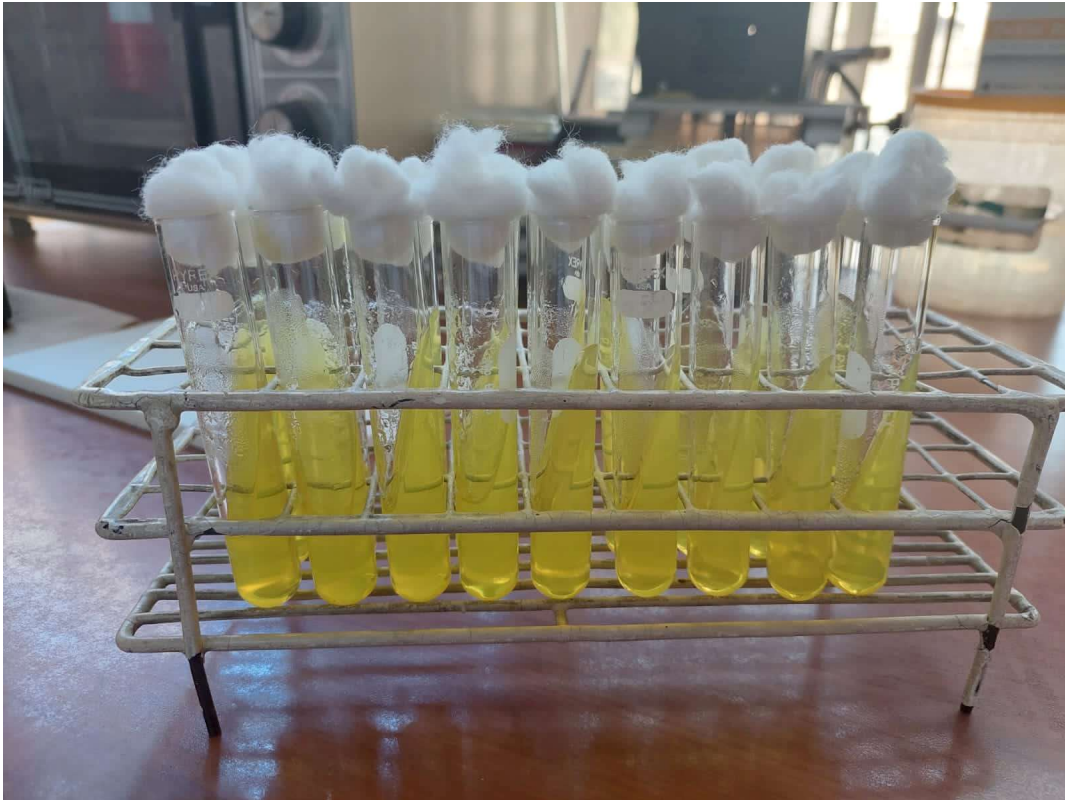
FOTOGRAFÍA N° 15: Observación microscópica de la cápsula de *Cryptococcus neoformans*.



FOTOGRAFÍA N° 16: Comparación control – prueba positiva para *Cryptococcus neoformans* con tinción negativa



FOTOGRAFÍA N° 17: Observación microscópica de la presencia de *Cryptococcus neoformans*. aumento de X40.



FOTOGRAFÍA N° 18: Preparación del medio de cultivo Christensen para colonias que fueron positivas al examen directo de tinción negativa.



FOTOGRAFÍA N° 19: Medio de cultivo Christensen, técnica pico de flauta



FOTOGRAFÍA N° 20: Prueba de la enzima ureasa positiva para *Cryptococcus neoformans*.