

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Identificación de especies de *Cryptococcus* en excretas
de aves en cautiverio del Parque Zoológico
La Totorilla, Ayacucho 2017.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA EN LA ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA

Presentado por:

Bach. HUALLPA TERRANOBA, Elizabeth

AYACUCHO – PERÚ

2018

Con todo el amor a mis padres
V́ctor Huallpa Tomaylla y Eusebia
Terranoba Lonasco.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a la Facultad de Ciencias Biológicas que por medio de sus docentes, impartieron sus conocimientos en mi formación profesional y personal.

Al Instituto Nacional de Salud que mediante los responsables del Laboratorio de Micología me dieron la oportunidad de realizar el control de calidad de las cepas obtenidas durante la ejecución de la tesis.

Al Biólogo Serapio Romero Gavilán, por su asesoramiento, por esa insistencia, y motivación que fueron muy fundamentales para ejecución de la tesis.

A la Dra. Susana Zurita, a la Blga. Flor Urcia y a la Tec. Álida Navarro Mariñas por brindarme su apoyo, orientación constante durante la ejecución de la tesis.

Al Blgo. Rubén Tenorio director del Laboratorio Referencial de Ayacucho y en especial a la Blga. Miriam Meneses encargada del área de micología por el apoyo, orientación de la ejecución de la tesis.

A Blgo Reynán Cóndor, por la ayuda con algunas pautas para la redacción del informe de tesis.

Al Blgo. Edwin Portal Quicaña, por facilitarme con los datos de las aves del Parque Zoológico La Totorilla.

A mis hermanos: Nanfer, Roxana, Jhonatan Jhassy y Abel, por su amor y apoyo incondicional en todos los días de mi vida.

A Kaelyn Fernández, por esa amistad y el apoyo en todo momento.

A señor Saturnino Ochoa, Fidel Castro y Antonio Quispe por el apoyo en la recolección de muestra.

A mis amigos Marcial Pillaca, Kevin Jaico, Américo Quispe, Erick Sulca y Jhonatan Espinoza, por su amistad.

INDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes del estudio	3
2.2. Los hongos	5
2.2.1 Características	5
2.2.2 Levaduras	5
2.2.2.1. Clasificación taxonómica de <i>Cryptococcus sp</i>	6
2.2.2.2 <i>Cryptococcus</i>	6
2.2.2.3 Hábitat y fuente de infección de <i>Cryptococcus</i>	7
2.2.2.4 Fisiopatología del <i>Cryptococcus</i>	7
2.2.2.5 Implicancia del <i>Cryptococcus</i> en la salud del hombre	8
2.2.2.6 Aspectos clínicos	9
2.2.2.7 Aves como reservorios del <i>Cryptococcus</i>	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Zona de estudio	11
3.2. Población	11
3.3. Muestra	11
3.4. Procedimiento y recolección de datos	12
3.4.1. Recolección de muestra biológica	12
3.4.2 Aislamiento de <i>Cryptococcus</i>	12
3.4.3. Obtención de cepas puras	12
3.4.4. Pre – identificación del genero <i>Cryptococcus</i> .	12
3.4.5. Identificación de las especies de <i>Cryptococcus</i>	12
IV. RESULTADOS	15
V. DISCUSIÓN	21
VI. CONCLUSIONES	27

VII.	RECOMENDACIONES	29
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
	ANEXOS	35

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Cepas de levaduras aisladas a partir de excretas de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla, Ayacucho 2017.	16
Tabla 2. Frecuencia de especies de Cryptococcus aisladas de las excretas de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla Ayacucho 2017	17
Tabla 3. Presencia de levaduras aisladas en las excretas de aves mantenidas en cautiverio de Parque Zoológico La Totorilla Ayacucho 2017	18
Tabla 4. Presencia Cryptococcus en excretas de las aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla en relación a la categoría orden de taxonomía al que pertenecen. Ayacucho 2017.	19

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Figura 1. Estructura celular de Cryptococcus.	7
Figura 2. Mecanismo de infección de Cryptococcus	9
Figura 3. Frecuencia de Cryptococcus en 21 especies de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla – Ayacucho 2017	20

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Preparación de medios y reactivos	37
Anexo 2. Flujograma de identificación de especies de <i>Cryptococcus</i> en excretas de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla, Ayacucho 2017	39
Anexo 3. Características bioquímicas de <i>Cryptococcus neoformans</i> según la Serie de Normas Técnicas N°44 del Instituto Nacional de Salud.	40
Anexo 4. Recolección de muestras de excretas de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla, Ayacucho 2017	41
Anexo 5. Colonias de hongos aislados en Agar Sabouraud con cloranfenicol a partir de las excretas de aves del Parque Zoológico La Totorilla, Ayacucho 2017	42
Anexo 6. Cepas puras de levaduras aisladas en frascos contenidos con agar Sabouraud.	43
Anexo 7. Láminas portaobjetos con cada cepa de levadura con tinción tinta china	44
Anexo 8. Observación de los halos característicos de levaduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> en el microscopio con el objetivo 100x	45
Anexo 9. Lectura de la asimilación de azúcares por <i>Cryptococcus neoformans</i>	46
Anexo 10. Lectura de la asimilación de úrea por <i>Cryptococcus neoformans</i>	47
Anexo 11. Observación de la formación de melanina por levaduras de <i>Cryptococcus neoformans</i> en medio Agar semilla de girasol	48
Anexo 12. Formación de la melanina con la prueba de fenoloxidasas con solución L- Dopa – Citrato férrico	49
Anexo 13. Tabla de resultados de las diferentes pruebas de la identificación de cepas aisladas del Parque Zoológico La Totorilla, Ayacucho 2017	50
Anexo 14. Matriz de consistencia	51

RESUMEN

El Parque Zoológico La Totorilla de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, alberga aves de diferentes orígenes, las mismas que pueden comportarse como reservorio de los *Cryptococcus*; desde ahí los propágulos fúngicos se diseminan a través del aire hacia las personas que van a visitar al Parque Zoológico, si estas tuvieran tal como indica la bibliografía los sistemas inmunológicos comprometidos, se pueden convertir en hospedero oportunista para el ataque microbiano. El presente trabajo se realizó con el objetivo de aislar e identificar las especies de *Cryptococcus* en excretas de aves mantenidas en cautiverio del Parque Zoológico la Totorilla. La población estuvo conformado por excretas de 131 aves en cautiverio, de los que se incluyó en la muestra a 21 especies, seleccionadas por conveniencia al trabajo de investigación, las muestras de excretas fueron recolectadas en frascos de boca ancha en horas de la mañana con la ayuda de una espátula estéril; a cada frasco se le añadió 5 ml de solución salina, se agito con la ayuda de una vagueta de vidrio, se dejó sedimentar por 15 minutos, del sobrenadante se tomó una alícuota con un asa de Kolle y se sembró en placas conteniendo Agar Sabouraud con cloranfenicol, al cual se incubó a 25 °C por 7 días. Las colonias características de levaduras fueron repicadas en frascos pequeños con agar Sabouraud para su posterior identificación. Se logró aislar 19 levaduras; 14 cepas son otras levaduras, 5 cepas pertenecen al género *Cryptococcus*; De las 21 especies de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla, 14,28% de las aves presentan *Cryptococcus neoformans*; las cuales son; pato crestón (*Lophoneta specularioides*), guacamayo de frente castaño (*Ara severa*) y pavo real (*Pavo cristatus*), 9,52% presentan *Cryptococcus spp*; el guacamayo rojo (*Ara chloroptera*) y gallinazo de cabeza roja (*Cathartes aura*) y 76.2% de las aves no presentan *Cryptococcus*.

Palabras clave: *Cryptococcus*, excretas, Parque Zoológico.

I. INTRODUCCION

En los últimos tiempos se ha observado un aumento de las enfermedades micóticas y los que sobresalen son de tipo oportunista, ello ha significado la aparición de nuevas formas clínicas de micosis, la mayoría de las micosis oportunistas siguen siendo ocasionadas por las especies clásicas: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*.¹

La criptococosis es una micosis oportunista esto afecta a persona inmunosuprimidos, La infección se adquiere por la inhalación de basidiosporas o los blastoconidios encapsuladas, las cuales están presentes en el medio ambiente. La entrada es al pulmón y de ahí se diseminan por vía hematógica al sistema nervioso central la cual es la predilección para estas levaduras, es ahí donde causan meningitis.²

Se consideran una posibilidad que aparte de la especie *Cryptococcus neoformans* hay algunos informes del aislamiento de otras especies como *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii*, que son patológicos para el hombre³. Los estudios demuestran que la cepa patógena responsable de la criptococosis está relacionada a la saprofita en las heces o tubo digestivo de un ave de compañía.⁴ Donde la adquisición de criptococosis a partir de excretas de otras aves se ha sospechado en numerosas ocasiones.⁵

En la mayoría de las investigaciones realizados relacionados al tema indica el aislamiento de levaduras en excretas de *Columbia livia* (palomas), y son escasos las informaciones que se aislaron levaduras en excretas de diferentes aves y más aún, en aves en cautiverio, es por ello basados en los antecedentes se inicia la investigación, considerando al Parque Zoológico “La Totorilla” un lugar público donde acuden muchas personas, por ello no se puede descartar la posibilidad de la presencia del microorganismo *Cryptococcus*, ya que en la zona se alberga las diferentes especies de aves, el presente trabajo tuvo como objetivo aislar e

identificar las especies de *Cryptococcus* en excretas de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla, Ayacucho 2017; determinar la frecuencia de las especies de *Cryptococcus* en las excretas de las aves mantenidas en cautiverio del Parque Zoológico, Ayacucho 2017

II. MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes del estudio

Gutiérrez R⁶. En su trabajo investigación “Especies de *Cryptococcus* en excretas de aves y sus ambientes en Ayacucho-Perú”, las muestras de excretas de aves fueron tomados con espátulas estériles y conducidas en frascos con suero fisiológico al 0,9% al laboratorio, las cuales han sido sembrados en Agar Sabouraud glucosado e incubados a 37 °C por 3 días. Con base a las características macroscópicas, microscópicas y enzimáticas se realizó la identificación, concluyendo, de las 216 muestras de excretas y 30 muestras de ambientes, aisló 82 cepas de *Cryptococcus*, 51 cepas identificadas como *Cryptococcus neoformans* y 31 como *Cryptococcus spp.*

Quicaño L⁷. En su trabajo de investigación “Frecuencia de *Cryptococcus neoformans* en heces, suelos y aire de viviendas con palomas domésticas (*Columbia livia*)”. En esta investigación se utilizó el método de contraste de tinta china y pruebas bioquímicas como la presencia de la enzima ureasa y asimilación de azúcares, además habilidad del crecimiento del hongo a 37 °C, concluyendo, 51,4 % pertenecientes a *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus spp* y 48,6%.

González -Hein G, González J, Díaz MC⁸. En su trabajo de investigación “Detección de levaduras en cloaca de dos especies psitácidas nativas en un centro de rehabilitación en Chile”, de un total de 131 ejemplares de dos especies de psitácidas nativas mantenidas en cautiverio en siete jaulas no contiguas, en un centro de rehabilitación de fauna silvestre, se colectaron 28 hisopados cloacales, pertenecientes a 4 de 17 *E. ferrugineus* y 24 de 114 *E. leporhynchus* aparentemente sanas, estas fueron recolectadas con torundas estériles y humedecidos con solución salina y se sembraron en Agar Sabouraud glucosado e incubado a 37 °C por 4 días y en Agar Staib mas bifenilo al 0,1% y se ha incubado a 25 °C por 14 días. La identificación de las levaduras se realizó mediante la

visualización con tinta china, lactofenol y otras pruebas bioquímicas como asimilación de urea, asimilación de azúcares, reducción de nitratos, tubo germinal y en algunos agar Chrom para identificar cándidas, concluyendo que *Cándida famata* fue la más frecuentemente aislada (8/28 muestras), seguida por *Cándida tropicalis* (7/28), *Cryptococcus laurentii* (2/28), *Cryptococcus albidus* (3/28), *Rhodotorula sp.* (2/28), *Cándida glabrata* (1/28) y *Cryptococcus neoformans* (1/28).

Ayala D, López F y Valencia RE⁹. En su trabajo de investigación "Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras del ambiente contaminadas con excrementos de palomas en diferentes zonas en el Salvador". Las muestras se cultivaron en Agar semilla de girasol, un medio de cultivo selectivo y diferencial para estas levaduras, y la identificación de estas se llevó a cabo mediante pruebas convencionales y semiautomatizadas como el API 20CAUX (BioMérieux), concluyendo con 52 muestras (material obtenido de nidos con excremento de palomas o sólo excretas acumuladas de palomas), de las cuales en 19 (36,5%) se aisló *Cryptococcus neoformans*.

Vallejo DA, Benavides CJ, Chaves CA, Morillo MI, Castillo AM¹⁰. En su trabajo de investigación "Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en el casco urbano del Municipio de Pasto, Colombia", Se realizó cultivo de 128 muestras de excretas de palomas en Agar Sabouraud glucosado con cloranfenicol. Posteriormente se realizó un extendido de capa fina del cultivo donde hubo crecimiento del patógeno y se le agregó una gota del colorante tinta china para visualizar el agente en el microscopio, concluyendo del total de 128 muestras de heces de palomas, que representan un 100%, el 26,56% fueron positivas a *Cryptococcus neoformans*.

Curo ME¹¹. En su trabajo de investigación "*Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas, suelo y aire de los palomares del perímetro urbano de Ica". Se colectaron muestras de excretas de palomas, suelo contaminado y aire de palomares entre mayo y julio del año 2002. Para el aislamiento primario se usó agar Sabouraud glucosado dextrosa con cloranfenicol, para la identificación por especie se usaron pruebas convencionales y la determinación de la variedad se evaluó sobre el medio de cultivo agar canavanina glicina azul de bromotimol sódico. Concluyendo que de 124 muestras procedentes de palomares de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, capilla del Hospital Socorro, Los viñedos de Santa María, La Victoria y San Joaquín. Se aislaron 26 cepas del género *Cryptococcus*; 9 cepas correspondieron a *Cryptococcus*

neoformans var. *neoformans* y 17 a *Cryptococcus* spp. La mayor frecuencia se encontró en la zona del palomar de la Facultad de Medicina.

Hurtado D¹². En su trabajo de investigación “*Cryptococcus neoformans* en excretas de *Zenaida auriculada* (rabiblanca) a 2760-20740 m.s.n.m Ayacucho”, recolecto 260 muestras de excretas de rabiblanca, de las diferentes zonas, concluyendo que de la recolección el 21,2% fueron positivos para *Cryptococcus neoformans*, y 78,8 % negativo (otra levaduras), de la ciudad universitaria se obtuvo 10,77% y del Parque Zoológico La Totorilla 10,38%.

2.2. Los hongos

Son los organismos eucariontes que constituyen un complejo y fascinante grupo de organismos, tan grande que se calculan alrededor de 200 000 especies, pero se cree que hay más de un millón y medio; viven en diferentes medios, y sólo alrededor de 400 clases son necesariamente patógenos para mamíferos, aunque también hay patógenos de vegetales, insectos (entomopatógenos) o de otros hongos (microparásitos), y son pocos los hongos oportunistas¹³. Los hongos se pueden agrupar en hongos ornamentales, alimenticios, venenosos o tóxicos, alucinógenos, medicinales, contaminantes y patógenos^{13, 14}.

2.2.1. Características

Los hongos son organismos eucariontes con núcleos organizados, cuya membrana nuclear está bien definida; son aerobios, heterótrofos y la mayoría no móviles; sin embargo, existen algunos hongos flagelados incluidos en las divisiones *Chytridiomycota* y *Oomycota*, como *Pythiuminsidiosum*. Los hongos no poseen cloroplastos, por ello son considerados no fotosintéticos; son organismos heterótrofos, ya que no pueden realizar sus propios alimentos; su nutrición siempre es por absorción de sustancias orgánicas simples o elaboradas. Los hongos patógenos primarios y oportunistas que afectan al ser humano por lo general crecen entre 35 y 40°C, por lo que están dentro de los grupos de los mesófilos y termófilos. Diferenciándose con las bacterias es que los hongos son acidófilos, crecen mejor entre 5,6 y 6,8 de pH. La luz no es vital^{13, 29}. La reproducción se lleva a cabo por medio de esporas y los hongos que presentan ambas formas de reproducción, se llaman holomorfos. La reproducción sexual o perfecta se produce por la unión de dos núcleos, mientras que la asexual o imperfecta (hongos mitospóricos), se da a partir de un micelio aéreo o reproductor, sin fusión de los núcleos^{13, 14}.

2.2.2. Levaduras

Las levaduras son organismos microbiológicos independientes, por lo general unicelulares, con membrana y pared celular que está conformada por quitina; su

citoplasma contiene vacuolas y el núcleo. La mayoría de levaduras son mesófilos y su crecimiento es entre 20-48°C. Se desarrollan en medios neutros y ligeramente ácidos; su rango óptimo de pH es entre 4,5-6,5 debido a que por su metabolismo llegan a acidificar más su entorno. La mayoría de los géneros son aeróbicos, excepto algunos que llevan a cabo procesos de fermentación, los cuales son anaeróbicos o anaerobios facultativos; por ello se puede decir que las levaduras fermentadoras detienen su crecimiento y multiplicación por la misma falta de oxígeno. Su fuente básica de alimentación son los carbohidratos simples, como glucosa y fructosa, o disacáridos como sacarosa y maltosa; la degradación de disacáridos los clasifica dentro del grupo de complejo zimasa. Las levaduras presentan dos formas de reproducción: asexual o anamórfica y sexual o teleomórfica. Las llamadas “levaduras verdaderas” pueden reproducirse mediante ambas formas, en su mayoría a través de la forma teleomórfica por ascosporas y en algunos casos por basidiosporas; mientras que aquellas levaduras que solo presentan fase anamórfica son llamadas “células levaduriformes” y se reproducen principalmente por gemaciones o blastoconidios y excepcionalmente mediante fisión transversal o binaria¹⁴.

2.2.2.1. Clasificación taxonómica de *Cryptococcus sp.*

División : Basidiomycota
Clase : Himenomycetes
Orden : Tremellales
Familia : Filobasidiaceae
Género : *Cryptococcus*
Especie : *Cryptococcus sp.*^{14, 15}.

2.2.2.2. *Cryptococcus*

Cryptococcus es una levadura cuyas especies generalmente tienen una cápsula y no forman micelio¹⁶.

En su fase anamorfa los *Cryptococcus* son levaduras redondas u ovals (4-6 µm), rodeadas de una cápsula polisacárido de tamaño variable. Entre los factores de patogenicidad de *Cryptococcus* se encuentra la cápsula, la capacidad de adherencia y las proteínas con actividad enzimática como las proteinasas, las fosfolipasas las fenoloxidasas y las ureasas¹⁷.

Se conocen otras especies más de este género *Cryptococcus*, de las cuales solo el complejo *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* son consideradas patógenos para los humanos, aunque existen referencias que estas especies en

algunas ocasiones resultan ser oportunistas entre los que destacan son *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Cryptococcus humicola*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus luteolus*^{13,14,38}. Estas levaduras en algunas son poco capsuladas y otras similares a las propiedades macroscópicas y microscópicas de los *Cryptococcus neoformans*, donde la diferencia de estas levaduras se pueden realizar mediante otras pruebas fisiológicas y térmicas¹⁴.

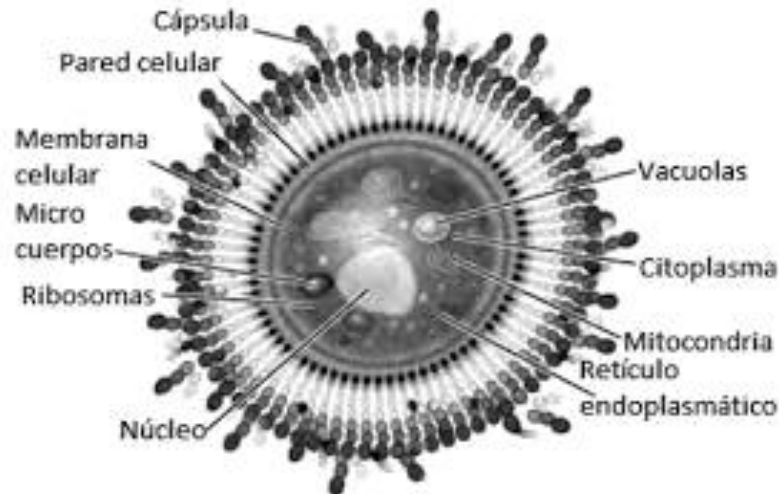


Figura 1. Estructura celular de *Cryptococcus*¹⁸.

2.2.2.3. Hábitat y fuente de infección de *Cryptococcus*

Uno de los hábitats más importantes y frecuentes de esta levadura es el guano de algunas aves como palomas, pichones, gallinas y entre otras aves, es muy frecuente el aislamiento en los gallineros, palomares, atrios de iglesias, edificios viejos o abandonados, entre otros lugares^{14,28}.

2.2.2.4. Fisiopatología del *Cryptococcus*.

La levadura es adquirida principalmente por la inhalación de esporas, que llega a los espacios alveolares y por ello se inicia con la infección pulmonar que pasa desapercibido o como asintomática incluso puede resultar en una neumonía autolimitada que se puede resolver en algunas semanas o meses aun en ausencia de tratamiento¹³. Posteriormente se puede diseminar por vía hematogena al sistema nervioso central, hueso, próstata y la piel^{14,19}. Esta levadura se prolifera de manera rápida si no existe una adecuada defensa celular, más si falta la presencia de las células mononucleares, esto da conocer que los pacientes con linfomas son susceptibles a la enfermedad, si al ingresar las levaduras no se detiene su proliferación indica que están migrando con facilidad por la vía linfática y hematogénea. Se comprobaron dos vías de ingreso: la primera es que las

levaduras pueden atravesar las paredes de los capilares sanguíneos cerebrales esto indica que traspasan fácilmente la barrera hetoencefálica; para ello es fundamental la acción de los factores de virulencia que tiene las levaduras como las enzimas ureasa, la otra segunda vía es de ingreso comprobada es el “mecanismo de caballo de Troya” donde las levaduras aprovechan de los monocitos que al adherirse a ellos ingresan como auténticos pasajeros y una vez que ingresan causan lesiones que se desarrolla en la meninges y afectan nervios craneales y a partir de ello se diseminan a otros órganos^{14,20}. Para la predilección al sistema nervioso central (SNC) no hay una clara explicación, pero se han planteado las siguientes hipótesis: a) El líquido cefalorraquídeo ayuda en el crecimiento de esta levadura ya que carece de efectos inhibidores que posee la sangre. b) El alto nivel de dopamina en el sistema nervioso central puede promover la virulencia de esta levadura ya que sirve como sustrato para la producción de melanina por el microorganismo. c) La producción local de manitol por la levadura puede ayudar al edema cerebral e inhibir la fagocitosis²¹. Algunos estudios indican que el líquido cefalorraquídeo es más deficiente en un factor fungistático denominado factor anticriptocócico, es por ello que pueden evadir con facilidad la respuesta inmune¹⁴.

2.2.2.5. Implicancia del *Cryptococcus* en la salud del hombre.

Es una micosis de curso subagudo o crónico, causada por levaduras patógenas oportunistas denominadas *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*; se caracteriza por afectar inicialmente pulmones, y después diseminarse a piel y vísceras, y con predilección hacia el sistema nervioso central (SNC)^{13, 14,22}. Poco frecuente en los animales domésticos con excepción de la aparición de brotes esporádicos en perros y gatos.²³ La criptococosis es una enfermedad cosmopolita; en cambio, los agentes etiológicos y sus variedades tienen localizaciones definidas, por lo que tenemos que las variedades *neoformans* y *grubii* son las que tienen mayor distribución^{13,14}. *C. neoformans* var. *grubii* es un hongo de distribución universal, que se aísla con facilidad del medio ambiente, principalmente del suelo contaminado con excretas de palomas y otras aves^{14,41}.

No tiene predilección por sexo, edad, ni raza; afecta mayormente a individuos con enfermedades neoplásicas, leucemia, diabetes, SIDA y/o colagenopatías, así como a pacientes bajo tratamiento con antibióticos, glucocorticoides, inmunosupresores o trasplante de órganos. La mortalidad es del 15 al 30%. Es más frecuente en personas expuestas a excremento de palomas²⁴.

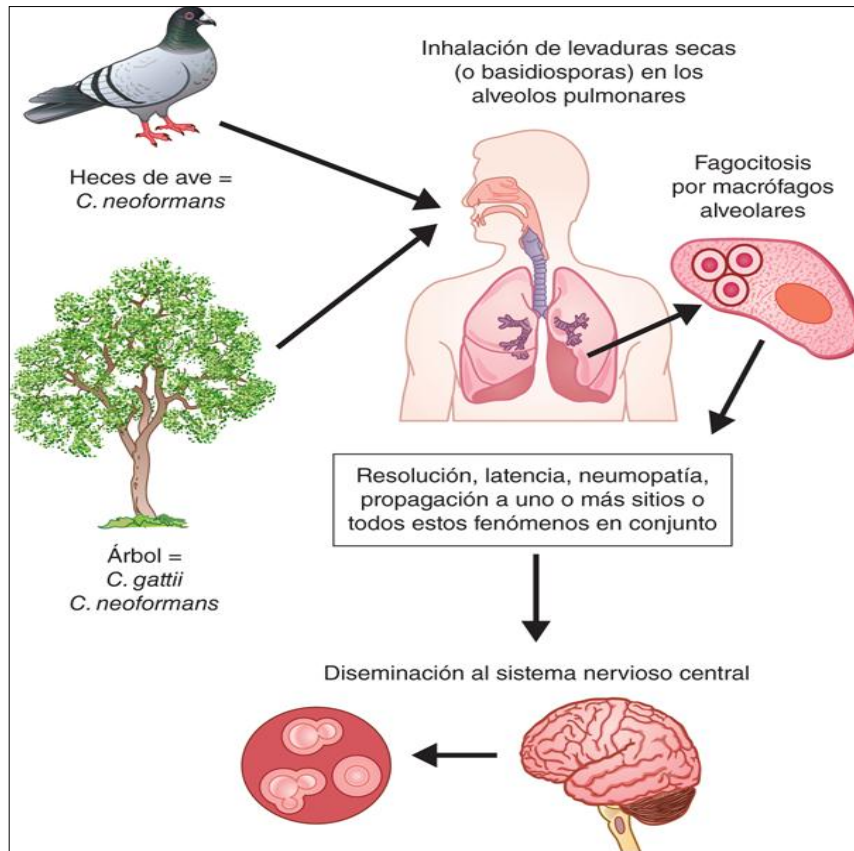


Figura 2. Mecanismo de infección de *Cryptococcus*²⁵.

2.2.2.6. Aspectos clínicos

- Criptococosis pulmonar

En estos pacientes inmunocompetentes la infección pulmonar puede progresar, remitir espontáneamente o permanecer estable y asintomática por mucho tiempo y cuando el paciente es inmunodeprimidos la enfermedad progresa.

- Criptococosis del sistema nervioso

Esta infección señala que es una complicación de la enfermedad que se presenta como meningitis.

- Criptococosis cutánea

Esto generalmente es adquirido por personas inmunosuprimidos, donde el microorganismo ingresa por una solución de continuidad en la piel²².

- Criptococosis ósea

Esta forma clínica es seguido a diseminación de un foco pulmonar, un foco meníngeo o de ambos.

- Criptococosis ocular

Esta complicación es raro, ya que es un a consecuencia de la diseminación del padecimiento.

- Criptococosis diseminada

Esto ya presenta los pacientes severamente inmunosuprimidos o estado pre morten, donde indica que la enfermedad invade casi todos los órganos^{14, 26,40}.

2.2.2.7. Aves como reservorio del *Cryptococcus*.

Las aves es un grupo de animales de mayor interés e importancia en la diversidad biológica, cada una de estas especie son muy diferentes en cuanto a su ecología y adaptación ambiental²⁷. Es por ello que en los zoológicos los lugares ya son modificados para conservar cada especie con su tipo de ambiente, todo ello con la finalidad de impartir conservación, educación, investigación y recreación al hombre. Las palomas y otras aves se convierten en reservorios o vectores indirectos ellos mantienen al microorganismo en su interior, pero no adquieren la enfermedad; esto se ha atribuido, entre otras cosas, al estado inmune y a su temperatura corporal del ave que es de 40 a 42°C^{13,14,15, 28}.

Las levaduras pueden llegar a permanecer por más de dos años en las excretas de las aves²⁹. Esto se debe que la alta concentración de creatinina en el estiércol de paloma favorece el crecimiento de los *Cryptococcus*, ya que las excretas de las aves, brindan otras características: ambiente alcalino, hiperosmolaridad y rico en muchos compuestos nitrogenados a parte de la creatinina²⁴.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Zona de estudio.

El Parque Zoológico "La Totorilla" se encuentra ubicado en el kilómetro 1,5 de la Vía de Evitamiento Juan Pablo 11 a diez minutos de la plaza Mayor de Huamanga. Se encuentra ubicado al Noreste de la capital de la provincia del mismo nombre, región Ayacucho.

Coordenadas Geográficas:

Latitud sur : 13° 09' 26"

Longitud oeste : 74 ° 13' 22"

Coordenadas proyectadas (UTM) WGS84

Este : 0624044

Norte : 8616591

Altitud : 2761 m.s.n.m.

Zona de Vida: estepa espinosa- Montano Bajo Subtropical (ee- MBS)³⁰.

3.2. Población

Excretas de las 131 aves mantenidas en cautiverio en el Parque Zoológico La Totorilla - Ayacucho.

3.3. Muestra

Estuvo constituida por las 21 excretas de especies de aves mantenidas en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla, escogidas por conveniencia al trabajo de investigación, 21 especies que viven de manera independiente, mientras el resto de las especies comparten la jaula con otras especies más.

Criterio de selección

Representada por las excretas de las aves del Parque Zoológico La Totorilla que viven en jaulas de manera independiente.

3.4. Procedimiento y recolección de datos

3.4.1. Recolección de muestra biológica.

- En horas de la mañana se recolectaron las excretas húmedas de las especies de aves seleccionadas, con ayuda de unas bajas lenguas en frascos de boca ancha debidamente rotulados, las cuales para su procesamiento fueron llevadas al laboratorio de Micología y Epidemiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.4.2. Aislamiento de *Cryptococcus*.

- Las muestras de excretas fueron diluidas con solución salina fisiológica con ayuda de una vagueta, estas fueron diluidas hasta conseguir el homogenizado.
- Se tomó una asada del sobrenadante con el asa de Kolle en ansa.
- Se sembró en la superficie del Agar Sabouraud con cloranfenicol con la técnica de agotamiento en superficie.
- Se incubó 25 °C por 7 días¹⁴.

3.4.3. Obtención de cepas puras

- Las colonias características de levadura fueron repicados en frascos pequeños conteniendo Agar Sabouraud y se dejó incubar a 25°C por 48 horas. Se almacenó en refrigeración.

3.4.4. Pre identificación del género *Cryptococcus*.

- Se colocó una gota de tinta china en unas láminas portaobjetos.
- Se tomó una asada de la cepa de levaduras con un asa de Kolle en aguja
- Se cubrió la gota con laminilla y se realizó la observación en el microscopio con el objetivo de 40X y 100X en busca de levaduras con halos característicos. (Ver anexo 8)
- Las colonias encapsuladas fueron codificadas como posibles *Cryptococcus*¹.

3.4.5. Identificación de las especies de *Cryptococcus*

Asimilación de azúcares:

- Se empleó el medio base con los diferentes azúcares como: glucosa, lactosa, sacarosa, galactosa, maltosa y rafinosa en una concentración final de 10%
- Se repartió en tubos de ensayo con tapa rosca.
- Con el asa de Kolle en aguja se tomó una asada de la cepa seleccionada.
- Se inoculó en los tubos conteniendo azúcares.
- Se incubó a 37 °C por 2 días
- Se realizó la lectura. .

- La interpretación consistió en el viraje es de un color púrpura a un color amarillo cuando las levaduras son degradadores de cada uno de los azúcares empleados.

Positivo: color amarillo

Negativo: color purpura ^{1, 32, 33}. (Ver anexo 9)

Asimilación de úrea:

- Se preparó el medio úrea y se repartió en tubos con tapa rosca
- Se sembró con la ayuda de un asa de Kolle las cepas posibles de *Cryptococcus* en medio.
- Se dejó incubar a 37 °C por 2 días.
- La interpretación es la producción de la enzima ureasa, la cual desdobla la urea en dióxido de carbono y amonio, incrementando el pH del medio y produciendo un cambio de color amarillo a rosado si es positivo y no hay cambio de color si es negativo ^{1, 32, 33}. (Ver anexo 10)

Detección de la enzima fenoloxidasa en Agar semilla de girasol

- Se preparó el medio Agar semilla de girasol (Agar de Staib). (Ver anexo 1)
- Se sembró en cada uno de las placas una alícuota de las cepas posibles *Cryptococcus*.
- Se dejó incubar a 30 °C por 5 días.
- La interpretación consistió observar si hubo la detección de la enzima fenoloxidasa desarrollada por *Cryptococcus neoformans*, la reacción enzimática produce melanina, la cual es absorbida por la pared celular del hongo produciendo un color marrón de las colonias si son positivos y colonias blancas si son negativos ¹. (Ver anexo 11)

Prueba fenoloxidasa:

Prueba según la técnica desarrollada por Canelo y Casquero³⁴.

- Se preparó la solución de L – Dopa citrato férrico. (Ver anexo 1)
- Se impregno esta solución a papel watman cortados en cuadraditos de 1 cm² y dejó secar en la estufa.
- Se colocaron los cuadraditos de papel watman en una placa Petri separados y se humedecieron con 25 µL de buffer fosfato
- Se inocularon 1 a 2 colonias de levadura de cada cepa y se dejó en cámara húmeda a 28 °C por 18 horas, la lectura es realizada si hay producción de pigmento marrón (reacción positiva) ³⁴. (Ver anexo 12)

El aislamiento e identificación de la cepa se realizaron en el laboratorio de Micología y Epidemiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y en el Instituto Nacional de Salud (INS) de la ciudad de Lima.

IV. RESULTADOS

Tabla 1: Cepas de levaduras aisladas a partir de excretas de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla, Ayacucho 2017.

Tipo de cepa	Número de cepas	
	Nº	%
Otras levaduras	14	73.7
Cryptococcus	5	26.3
Total	19	100

Tabla 2: Frecuencia de especies de *Cryptococcus* aisladas de las excretas de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla Ayacucho 2017

Especies	N	%
<i>Cryptococcus neoformans</i>	3	60
<i>Cryptococcus spp</i>	2	40
Total	5	100

Tabla 3: Presencia de levaduras aisladas en las excretas de aves mantenidas en cautiverio de Parque Zoológico La Totorilla Ayacucho 2017.

Especie	Nombre común	Otras levaduras	Cryptococcus	Total	Total %
<i>Buteo magnirostris</i>	Aguilucho caminero	1	0	1	5,3
<i>Milvago chimachima</i>	Chima chima	1	0	1	5,3
<i>Loponeta specularioides</i>	Pato crestón	1	1	2	10,5
<i>Chloephaga melanoptera</i>	Huallata	2	0	2	10,5
<i>Anser cignoides</i>	Ganso africano	1	0	1	5,3
<i>Aburria aburri.</i>	Pava curunculada	1	0	1	5,3
<i>Pavo cristatus</i>	Pavo real	1	1	2	10,5
<i>Ara severa</i>	Guacamayo frente castaña	0	1	1	5,3
<i>Ara chloroptera</i>	Guacamayo rojo	1	1	2	10,5
<i>Sarcorhumpus papa</i>	Cóndor real de la selva	2	0	2	10,5
<i>Cathartes aura</i>	Gallinazo de cabeza roja	1	1	2	10,5
<i>Bubo virginianus</i>	Búho americano	2	0	2	10,5
Total		14	5	19	100

Tabla 4: Presencia *Cryptococcus* en excretas de las aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla. Ayacucho 2017.

Orden	Especie	Nombre común	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus spp</i>
Falconiformes	<i>Falco sparverius</i>	Cernícalo	No	No
	<i>Buteo magnirostris</i>	Aguilucho caminero	No	No
	<i>Buteo polyosoma</i>	Aguilucho grande	No	No
	<i>Milvago chimachima</i>	Chima chima	No	No
	<i>Buteo polyosoma</i>	Aguilucho variable	No	No
Anseriformes	<i>Lophoneta specularioides</i>	Pato crestón	Si	No
	<i>Chloephaga melanoptera</i>	Huallata	No	No
	<i>Anser cignoides</i>	Ganso africano	No	No
Galliformes	<i>Aburria aburri.</i>	Pava curunculada	No	No
	<i>Pavo cristatus</i>	Pavo real	Si	No
Struthioniformes	<i>Struthio camelus</i>	Avestruz	No	No
	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	Emú	No	No
Psittaciformes	<i>Ara macao</i>	Guacamayo escarlata	No	No
	<i>Ara severa</i>	Guacamayo frente castaña	Si	No
	<i>Ara ararauna</i>	Guacamayo azul amarillo	No	No
	<i>Melopsittacus undulatus</i>	Periquito australiano	No	No
	<i>Ara chloroptera</i>	Guacamayo rojo	No	Si
Accipitriformes	<i>Sarcorhampus papa</i>	Cóndor real de la selva	No	No
	<i>Vultur gryphus</i>	Cóndor andino	No	No
	<i>Cathartes aura</i>	Gallinazo de cabeza roja	No	Si
Strigioformes	<i>Bubo virginianus</i>	Búho americano	No	No

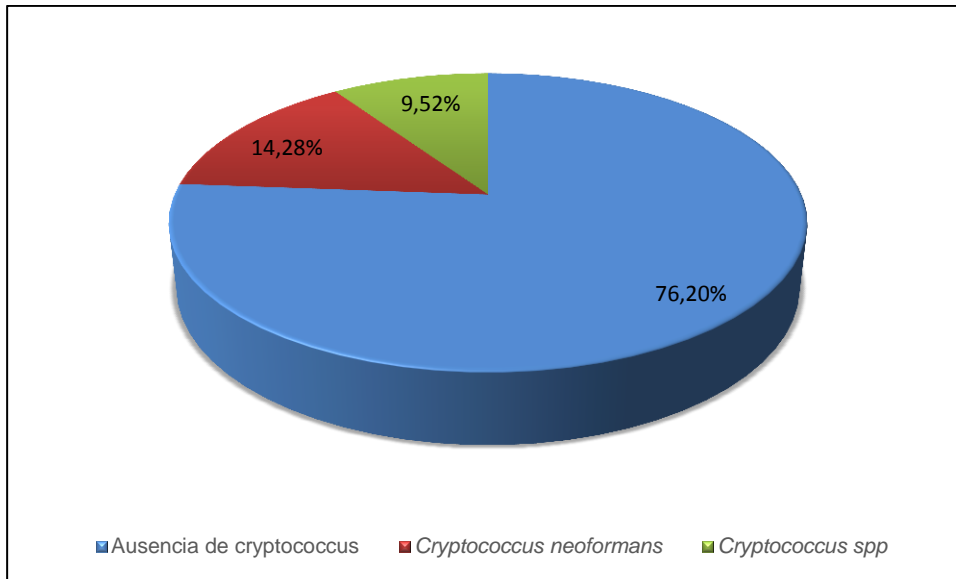


Figura 3: Frecuencia de *Cryptococcus* en 21 especies de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla – Ayacucho 2017

V. DISCUSIÓN

Estudiar *Cryptococcus* es importante porque generalmente las especies *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*, están asociadas a enfermedades micóticas llamada criptococosis, tienen distribución geográfica restringida a zonas tropicales y subtropicales, aunque los hallazgos recientes indican su adaptación a otros ambientes³⁵, una infección esporádica que afecta principalmente a adultos varones en una proporción dos veces más frecuentes que en las mujeres; se llama oportunista ya que los estudios indican que la mayor susceptibilidad a la criptococosis lo presentan las personas que están infectados por VIH. Además, afecta a los gatos, perros, caballos, monos, vacas y otros animales, estas levaduras se aíslan de nidos viejos y excrementos de las palomas y otras aves³⁶. Se conoce que las aves domésticas y las silvestres, entre ellas las palomas, pericos, rabiblanca, algunos de los psitácidos son reservorio del *Cryptococcus*^{8, 11, 12, 14}.

En la tabla 1, se muestra el aislamiento de levaduras en las excretas de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla, de las cuales se logró identificar (5/19) cepas pertenecientes al género *Cryptococcus*, en base a la observación de la presencia de cápsulas; una considerable cantidad (14/19) resultaron ser otras levaduras.

El tubo digestivo de las aves a parte de sus funciones metabólicas, presenta una superficie de interacción muy amplia entre el ambiente exterior y las aves, las cuales son puerta de entrada para muchos agentes etiológicos³⁷. Las palomas y otras aves se convierten en reservorios para los *Cryptococcus*, al mantener al microorganismo sin adquirir la enfermedad, las condiciones que favorecen la presencia es la temperatura corporal que presentan que es de 40 a 42°C, por la cual pueden provocar infección asintomática en el intestino, por ello en las excretas es eliminado el hongo y que pueden mantenerse en el ambiente con la humedad requerida y las condiciones del pH alcalino¹⁴. La transmisión al hombre no es directa con las aves sino por una exposición en el ambiente³⁹. En las excretas de

las aves domésticas y silvestres aparte de *Cryptococcus* se encuentra otras levaduras patógenas y que pueden ocasionar infecciones a los humanos como: *Candida* y *Rhodotorula* sp⁴², también pueden presentarse otras levaduras dimórficas en las excretas de aves considerado un patógeno *Histoplasma capsulatum*, que cuando está a una temperatura ambiental se encuentran en su fase micelial, pero al momento del aislamiento a temperatura 37°C se presentan en su fase levaduriforme⁴³. Los resultados del presente trabajo de investigación concuerdan con el trabajo de investigación realizado por Gutierrez⁶, logró aislar 119 cepas de levaduras en excretas de diferentes aves incluyendo la paloma (*Columbia livia*), de las cuales 82 pertenecían a género *Cryptococcus* y 37 otras levaduras. En otro trabajo de investigación realizado por Quicaño⁷, ha logrado aislar 180 levaduras de las excretas, suelo y aire de viviendas con palomas domésticas, de las cuales 35 pertenecientes al género *Cryptococcus* 145 son otras levaduras, asimismo González y col⁸, en su trabajo de investigación colectaron 28 hisopados cloacales de aves que se encuentra en un centro de rehabilitación donde aislaron 24 cepas de levaduras y *Candida famata* se encontró con más frecuencia (8/28 muestras), seguida por *Candida tropicalis* (7/28), *Cryptococcus laurentii* (2/28), *C. albidus* (3/28), *Rhodotorula* sp. (2/28), *Candida glabrata* (1/28) y *Cryptococcus neoformans* (1/28).⁸ Curo¹¹, logró aislar 56 cepas de muestras de excretas de suelos y ambientes aéreos de palomares, las cuales 26 pertenecientes al género *Cryptococcus*; Hurtado¹², logro aislar 260 muestras en excretas de rabiblanca (*Zenaida auriculada*) de las cuales 21,2% fueron *Cryptococcus* y 78,8% fueron otras levaduras

En la tabla 2, se muestra la frecuencia del aislamiento de *Cryptococcus* de las excretas de las aves en cautiverio, donde se logró identificar 3 (60%) especies pertenecientes a la especie de *Cryptococcus neoformans*; 2 (40%) resultaron ser *Cryptococcus spp.* Corroboradas en el laboratorio de micología del Instituto Nacional de Salud. Este trabajo de investigación concuerda con los trabajos de investigación realizada por Gutierrez⁶, donde logró aislar 119 levaduras de diferentes aves, de los cuales discriminando 82 cepas con características de *Cryptococcus* por presentar la capsula característica, fueron identificadas 51 cepas como *Cryptococcus neoformans* y 31 cepas como *Cryptococcus spp* y el trabajo realizado por Quicaño⁷, aislaron 51,4% de cepas pertenecientes a *Cryptococcus neoformans* y 48,6% *Cryptococcus spp.* Ayala y col⁹, lograron aislar 52 muestras de excremento de paloma, identificando 19 como *Cryptococcus neoformans*; Vallejo y col¹⁰, lograron aislar en 128 muestras de excretas de palomas, 26,56% de

Cryptococcus neoformans; Curo¹¹, logró identificar de 26 cepas del genero *Cryptococcus*, 9 cepas como *Cryptococcus neoformans* y 17 cepas como *Cryptococcus spp.* Esto demuestra que las excretas de las aves presentan un ambiente alcalino, y rico en muchos compuestos nitrogenados, además de la creatinina y más las condiciones que el ambiente presenta favorecen a permanecer hasta por varios meses a esta levaduras¹⁴. La especie de *Cryptococcus neoformans*, que es la que presenta una amplia distribución mundial, causando la enfermedad en personas inmunocomprometidos^{13, 14}; Pero, existes otra especie, *Cryptococcus gatti*, que no solo está presente en excretas de aves sino también están presentes en restos vegetales de diversas especies de eucalipto, estas cepas están relacionados generalmente a las regiones tropicales y sub tropicales donde se comportan como patógenos primarios y que causa infecciones en personas inmunocompetentes^{44,36}. Los estudios sobre estas especies *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gatti* anteriormente se les consideraba que pertenecían a una sola especie que es *Cryptococcus neoformans* y que se consideraban como variantes; pero, ahora son considerados como especies diferentes debido a que presentan diferencias epidemiológicas, ecológicas y moleculares². No se ha logrado identificar las otras especies consideradas no *neoformans* ya que para ello se necesita contar con métodos de identificación molecular, y al lograrlos identificar las otras especies como *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Cryptococcus humicola*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus luteolus*, se puede relacionar con algunas referencias literarias donde indican que pueden causar enfermedad esporádicamente³⁸, estas especies son considerados como no patógenos; pero, se encontraron reportes de las primeras dos especies que hasta el año 2007, donde encontraron 20 casos la mayoría de estos, en pacientes con VIH y solo unos cuantos en pacientes sin VIH⁴⁵; se considera que la probabilidad de la presencia de estas levaduras este asociado al incremento de pacientes inmunocomprometidos⁴⁶.

La tabla 3, se muestra la presencia de levaduras en las excretas de aves del Parque Zoológico La Totorilla – Ayacucho; en excretas de 12/21 especies de aves se lograron aislar 1 a 2 diferentes levaduras como indica la tabla, mas no lograron aislar levaduras en excretas de 7/21 especies de aves; esto concuerda con el trabajo de investigación de Gonzales y col⁸, quienes lograron aislar 28 hisopados cloacales en psittácidos como la cachaña (*Enicognathus ferrugineus*) y la cotorra choroy (*Enicognathus leptorhynchus*) de las cuales identificó distintas especies de

levaduras del género *Cándida*, *Cryptococcus* y *Rhodotorula*; así mismo otro trabajo de investigación realizado por Vieira G y col⁴⁷, lograron aislar levaduras de *Cándida* en hisopados faríngeos de loros (*Amazonas spp*). La diferencia de los resultados con estos trabajos de investigación, es el aislamiento de estas levaduras en diferentes muestras como; excretas, hisopados cloacales e hisopados faríngeos, por lo cual la probabilidad de encontrar menos cantidad de las diferentes levaduras por aves, puede haber sido la razón a diferencia de los otros trabajos de investigación.

La tabla 4, muestra la presencia de *Cryptococcus* en excretas de las 21 especies de aves en cautiverio del Parque Zoológico la Totorilla, generalmente estas levaduras se han aislado en suelos contaminados con deyecciones de paloma, ya que esta ave es la fuente de reservorio más conocida, las cuales fueron demostradas en los trabajos de investigación de Ayala y col⁹, donde demuestran que 19 (36,5%) pertenecen a *Cryptococcus neoformans* las mismas que se relacionan con los otros trabajos de investigación donde aislaron el *Cryptococcus* en las excretas de la paloma (*Columbia livia*)^{10,11}; pero, también se ha aislado en excretas de pájaros, psittaciformes, passeriformes, columbiformes y falconiformes⁴⁸; incluso en algunos casos en el orden psittaciformes, se han relacionado que la presencia de esta levadura en estas aves genera disrupción de las narinas, ranfoteca y estructuras del seno infraorbital^{14,49}, en el presente trabajo de investigación, de las 21 especies de aves seleccionadas se encontraron en las excretas del orden Anseriformes en pato crestón (*Looneta specularioides*), en el orden Psittaciformes en Guacamayo frente castaña (*Ara severa*) y Guacamayo rojo (*Ara chloroptera*), en el orden Galliformes en pavo real (*Pavo cristatus*) y en el orden Accipitriformes en gallinazo de cabeza roja (*Cathartes aura*) y no se aislaron en excretas de las aves del orden Strigiformes, Falconiformes y Struthioniformes; relacionando con otros estudios se demuestra que otras especies de aves pueden ser el reservorio de esta levadura como indica la investigación realizada por Gutiérrez⁶; donde, demuestra la presencia de esta levadura en excretas y en su ambiente de otras aves como la paloma (*Columbia livia*), la gallina (*Gallus gallus*), la rabiblanca (*Zenaida auriculada*), el guacamayo escarlata (*ara macao*), el periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*), el guacamayo rojo (*Ara chloroptera*) y el guacamayo de frente roja (*Ara rubrogenys*); así mismo Hurtado¹², logró aislar en excretas de rabiblanca (*Zenaida auriculada*) concluyendo que 21,2% de estas levaduras pertenecen a *Cryptococcus neoformans*; Rosario I y col⁵⁰, demuestran con los

diversos estudios en otras especies de aves aislando las especies de *Cryptococcus*; deja claro que la paloma no es la única portadora de estas levaduras. Así mismo se ha logrado aislar de otras fuentes como: suelos, raíces de algunos vegetales, maderas e descomposición, incluyendo los desechos aviarios de loros, canarios, pericos, palomas, animales domésticos como; gatos, perros, caballos y algunos animales de los bosques¹⁴. Se ha presentado informaciones; donde, descubren que algunos amebas y nematodos del suelo; como: *Acanthamoeba castellani* y *Caenorhabditis elegans*, presentan las levaduras de *Cryptococcus*, que al ser fagocitados estas levaduras por ellos, desarrollan las cápsulas y otros factores de virulencia, de esta manera llegan a ser reservorios⁵¹. La figura 3, presenta la frecuencia de *Cryptococcus* en las 21 especies de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla, 16 (76,2%) de estas aves no presentan *Cryptococcus* en las excretas; 14,28% presentan *Cryptococcus neoformans*, pato crestón (*Lophoneta specularioides*), guacamayo de frente castaño (*Ara severa*) y pavo real (*Pavo cristatus*) y 9,52% presentan *Cryptococcus spp*, el guacamayo rojo (*Ara chloroptera*) y gallinazo de cabeza roja (*Cathartes aura*); este resultado concuerda con Rosario y col⁵⁰, donde demuestran con un buen número de estudios realizados sobre la presencia de esta levadura *Cryptococcus* en otras especies de aves.

VI. CONCLUSIONES

1. Se aislaron 19 levaduras de un total de 21 muestras de excretas de 21 especies de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla de Ayacucho, donde se identificó 5 cepas pertenecientes al *Cryptococcus* y 14 cepas pertenecen a otro género de levaduras.
2. Se logró aislar e identificar *Cryptococcus neoformans* con una frecuencia 60% y 40% *Cryptococcus spp* del total de las cepas aisladas en excretas de 21 especies de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla – Ayacucho 2017.
3. De las 21 especies de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla, 14,28% de las aves presentan *Cryptococcus neoformans*; las cuales son; pato crestón (*Lophoneta specularioides*), guacamayo de frente castaño (*Ara severa*) y pavo real (*Pavo cristatus*), 9,52% presentan *Cryptococcus spp*; el guacamayo rojo (*Ara chloroptera*) y gallinazo de cabeza roja (*Cathartes aura*) y 76,2% de las aves no presentan *Cryptococcus*.

VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar trabajos de investigación aislando *Cryptococcus*, en las excretas de todas las aves del Parque Zoológico La Totorilla.
2. Realizar estudios de aislamiento de *Cryptococcus* en excretas de aves en cautiverio; y conocer la frecuencia de esta levadura en tiempo de lluvia y tiempo de sequía.
3. Realizar trabajos de investigación para aislar otras cepas de levaduras de las diferentes aves, que pueden ser patógenos para el hombre y para las mismas aves.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. 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. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2007. Serie de Normas Técnicas N.º 44.
2. Mitchell TG, Periekt JR. Criptococcosis in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. ClinMicrobiolRev. 1995; 8: 515-48.
3. Arango M, Castañeda E. Micosis humanas: procedimientos diagnósticos. exámenes directos. 2ª ed. Colombia: CIB; 2003.
4. Nosanchuk JD, Shoham S, Fries BC, Shapiro DS, Levitz SM, Casadevall A. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a petcockatoo to an immunocompromised patient. Ann Intern Med. 2000; 132(3): 205-208.
5. Gatti M, Di Silverio A, Cespa M, Mosca M. Primary unusual cutaneous cryptococcosis in an HIV former drug-abuser patient. Mycoses. 1997; 40(3): 101-102
6. Gutiérrez Méndez R. Especies de *Cryptococcus* en excretas de aves y sus ambientes. [Tesis de pregrado]. Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2011.
7. Quicaño Cuadros L. Frecuencia de *Cryptococcus neoformans* en heces, suelos y aire de viviendas con palomas domesticas (*Columbia livia*). [Tesis de pregrado]. Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 1997.
8. González G, González J, Díaz MC. Detección de levaduras en cloaca de dos especies psitácidas nativas en un centro de rehabilitación en Chile. ArchMedVet. 2010; 42: 105-108
9. Ayala D, López F de M, Valencia RE. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras del ambiente contaminadas con excrementos de palomas en diferentes zonas en El Salvador. Minerva Revista en Línea CIC-UES. 2011; 2(1): 21-27.
10. Vallejo DA, Benavides CJ, Chaves CA, Morillo MI, Castillo AM. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en el casco urbano del municipio de Pasto, Colombia. Revista Biosalud. 2016; 15(1): 62-71.
11. Curo Ignacio ME, *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas, suelo y aire de los palomares del perímetro urbano de Ica, [Tesis de pregrado]. Perú: Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica; 2002.
12. Hurtado Rivera D. *Cryptococcus neoformans* en excretas de *Zenaida auriculada* (rabiblanca) a 2760-20740 m.s.n.m Ayacucho. [Tesis de pregrado]. Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2007.
13. Arenas A. Micología medica ilustrada. 5ªed. México. Mc Graw-Hill interamericana editores, S. A. de C. V.; 2014.
14. Bonifaz A. Micología Médica Básica. 4ª ed. México. Edit. Mc Graw-Hill Interamericana editores, S. A. de C. V.; 2012.
15. Brizendine K, Baddley W, Pappas G. Pulmonary cryptococcosis. SeminRespirCrit Care Med. 2011; 32 (6): 727-734.
16. Liu TB, Perlin DS, Xue C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. Virulence. 2012; 3(2): 173-81.
17. Sanchez A, Escandon P, Castaneda E. In vitro determination of virulence factors activity associated with several *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. Rev IberoamMicol. 2008; 25: 145-149.
18. Simmer M, Secko S. A peach of a pathogen: *Cryptococcus neoformans*. Disponible en: <http://www.scq.ubc.ca/a-peach-of-a-pathogen-cryptococcusneoformans/> (The Science Creative Quarterly, 2003, elaborador por

- Jane Wang, Imagenobtenidabajolicencia de Creative Commons <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/deed.es>).
19. Xiaorong L. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and isolated. Elsevier Genetics and Evolution. 2009; 9: 404-424.
 20. Rojas W, Anaya MJ, Aristizabal B, Cano LE, Gomez LM, Lopera D. *Inmunología de Rojas*: 16ª ed. Colombia: CIB; 2012.
 21. Wong B, Perfect JR, Beegs S, production of the hexitol D-mannitol by *Cryptococcus neoformans* in vitro and rabbit with experimental meningitis. *Infect Immun*. 1990; 58: 1664-1667.
 22. Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2006; 20: 507- 544.
 23. Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths J, et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9(3): 193-203.
 24. Colom MF, Frasés S, Ferrer C, Jover A, Andreu M, Reus S, Sánchez M, Torres JM. First human cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* variety *gattii* in Spain. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 3548-3550.
 25. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S, Mietzner T, *Microbiología Médica*, 26ª ed. Mexico: McGraw-Hill. 2011.
 26. Shulman ST, Phair JP, Peterson LR, Warren JR. *Criptococosis en: Enfermedades infecciosas Bases clínicas y biológicas*. 5ªed: McGraw-Hill Interamericana; 1999.
 27. Conde M, Iannaccone J. Bioecología del *Phalacrocorax brasilianus* (Gmelin, 1789) (Pelecaniformes: Phalacrocoracidae) en Sudamérica. *Biologist*. 2013; 11(1): 151-166.
 28. García Rodríguez JA y Picazo JJ. *Microbiología Médica General*, 1ª ed. Madrid: HarcourtBrace 1998.
 29. Green CE, Craig E, Addie D. *Enfermedades infecciosas del perro y gato*. México, McGraw-Hill Interamericana; 1993
 30. Vallejo Vilca N, Efecto toxicológico agudo del plaguicida Furadán sobre alevinos de *Oncorhynchus mykiss* "trucha arco iris". [Tesis de pregrado]. Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2015.
 31. Ecevit IZ, Clancy CJ, Schmalfuss IM, Nguyen HM. The poor prognosis of central nervous system cryptococcosis among nonimmunosuppressed patients: a call for better disease recognition and evaluation of adjuncts to antifungal therapy. *Clin Infect Dis*. 2006; 42(10):1443-1447.
 32. Horna E, Ango H, Maravi A, Taipei C, *Pruebas bioquímicas en bacteriología*. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho – Perú. 1993.
 33. MacFaddin, Jean. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3ª ed. Argentina: Medica panamericana, 2004.
 34. Canelo CA y Casquero J. Fenoloxidasa modificada: Clave para identificar Cepas de *Cryptococcus neoformans*. *Rev. MedExp*. 2000; 17: 1-4.
 35. Cogliati M. *Global Molecular Epidemiology of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii: An Atlas of the Molecular Types*. Scientifica (Cairo). 2013; 675: 213.
 36. Chin J. *El control de las enfermedades transmisibles: Publicación Científica y Técnica* No. 581. 17ª ed. Estados Unidos de América: OPS. 2001.
 37. Gómez G, López C, Maldonado C, Ávila E. *El sistema inmune digestivo en las aves* Investigación y Ciencia. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 2010; 18(48): 9-16.
 38. Martínez L, Gomez A, Castelli M, Mesa A, Zaragoza O, Rodríguez JL, et al. Susceptibility profile of clinical isolates of non-*Cryptococcus neoformans*/non-

- Cryptococcus gattii* *Cryptococcus* species and literature review. *Med Mycol.* 2010; 48(1): 90-6.
39. Evans E. Zoonotic diseases of common pet birds: Psittacine, Passerine, and Columbiform Species. *North Am Vet ClinExot Anim.* 2011; 14: 457-476.
 40. Padilla M, Navarrete G, Perez S, Villanueva T, Alfaro P. Criptococosis diseminada asociada con VIH. *DermatolRevMex.* 2012; 56(2): 126-131.
 41. Tello, M, Gutiérrez E, Béjar V, Galarza C, Ramos W, Ortega A. Criptococosis. *RevMéd. Risaralda.* 2013; 19 (2): 147-153.
 42. Cafarchia C, A Camarda, D Romito, M Campolo, N Quaglia, D Tullio, D Otranto. Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. *Micopathologia.* 2006; 161: 229-234.
 43. Bejar V, Rojas R. Agentes de infecciones por hongos dimórficos y *Cryptococcus neoformans*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2011; 28 (4): 685-687.
 44. Lazéra MS, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Medical Mycology.* 2000; 38: 379-383.
 45. Furman-Kuklińska K, Naumnik B, Myśliwiec M. Fungaemia due to *Cryptococcus laurentii* as a complication of immunosuppressive therapy – a case report. *Advances in Medical Sciences.* 2009; 54: 116- 119.
 46. Kiertiburanakul S, Sungkanuparph S, Prachartam R. *Cryptococcus laurentii* fungemia: A case report. *J Infect Dis Antimicrob Agents.* 2001; 18: 112-114.
 47. Vieira R, Acqua S. Phenotypical characterization of *Candida* spp. isolated from crop of parrots (*Amazona* spp.). *Pesq. Vet. Bras.* 2009; 29(6): 452-456.
 48. Kielstein P, Hotzel H, Schmalreck A, Khaschabi D, Glawischnig W. Occurrence of *Cryptococcus* spp. in excreta of pigeons and pet birds. *Mycoses.* 2000; 43(1-2): 7-15.
 49. Malik R, Krockenberger M, Cross G, Doneley R, Madill D, Black D et al. Avian *Cryptococcosis*. *Med Mycol.* 2003; 41: 115-124.
 50. Rosario I, Acosta B, Colom F. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. *Rev Iberoam Micol.* 2008; 25: S13-S18.
 51. Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoeba suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 15245-15250.

ANEXOS

Anexo 1: Preparación de medios y reactivos

1. Agar Urea

Pesar:

- Dextrosa 1 g
- Peptona 1 g
- Cloruro de sodio 5 g
- Monofosfato de potasio 2 g
- Urea 20 g
- Agar 15 g
- Rojo fenol 12 mg
- Agua destilada 1000 MI

Preparación:

- Disolver la urea en 100mL de agua destilada y esterilizar por filtración.
- Disolver los ingredientes restantes en agua destilada.
- Esterilizar a 121 °C por 15 min.
- Enfriar hasta unos 45 – 50 °C.
- Agregar la solución de urea en un área estéril y repartir en placas estériles.

2. Medio base para azúcares:

Medio Base

- Peptona 5 g
- Extracto de carne 1 g
- Cloruro de sodio 5 g
- Agar 15 g
- Agua destilada 990 mL
- Purpura de bromocresol 10 mL

El pH final es de 5,6 y disolver y autoclavar

Azúcares

Pesar 10 g de cada uno de los azúcares y disolver en agua destilada estéril y esterilizar por filtración, la concentración de cada azúcar es 10%. Mezclar cada azúcar con el medio base que ya se encuentra a 45 – 50 °C. Repartir en de vidrio con tapa rosca.

3. Agar semilla de girasol (Agar Staib)

Pesar:

- Glucosa 1,0 g
- Creatina 0,78 g
- Agar 18,0 g
- Cloranfenicol 0,05 g
- Extracto de semilla de girasol 350 mL

Autoclavar a 121 °C por 15 minutos

Preparación del extracto:

- Pulverizar las semillas de girasol
- Pesar 70 g del pulverizado y suspenderlo en 350 mL de agua destilada y hervir por 1 hora.
- Filtrar con gasa, autoclavar 15 minutos a 121°C.

Fundir el extracto en el medio base cuando este a 45 - 50 °C y plaquear

4. Preparación solución de L – dopa – citrato férrico.**Buffer fosfato**

- Fosfato de sodio dibasico Na_2HPO_4 (0,067 M) 0,951g
- Agua destilada 100 mL

Fosfato de potasio monobásico

- KH_2PO_4 (0,067 M) 0,912 g
- Agua destilada 100 mL

Se mezclan volúmenes iguales de A y B (pH final 6,8)

Solución de L – dopa (L – B – 3,4 - dihidroxifenilalanina)

Suspender la L – dopa en una a tres gotas de dimetilsulfóxido agregar agua destilada hasta alcanzar una concentración final de 3 mg/mL

Solución de citrato férrico.

Disolver el citrato férrico en agua destilada hasta alcanzar una concentración de 1 mg/mL. Calentar suavemente hasta disolver.

Solución de L – dopa - citrato férrico.

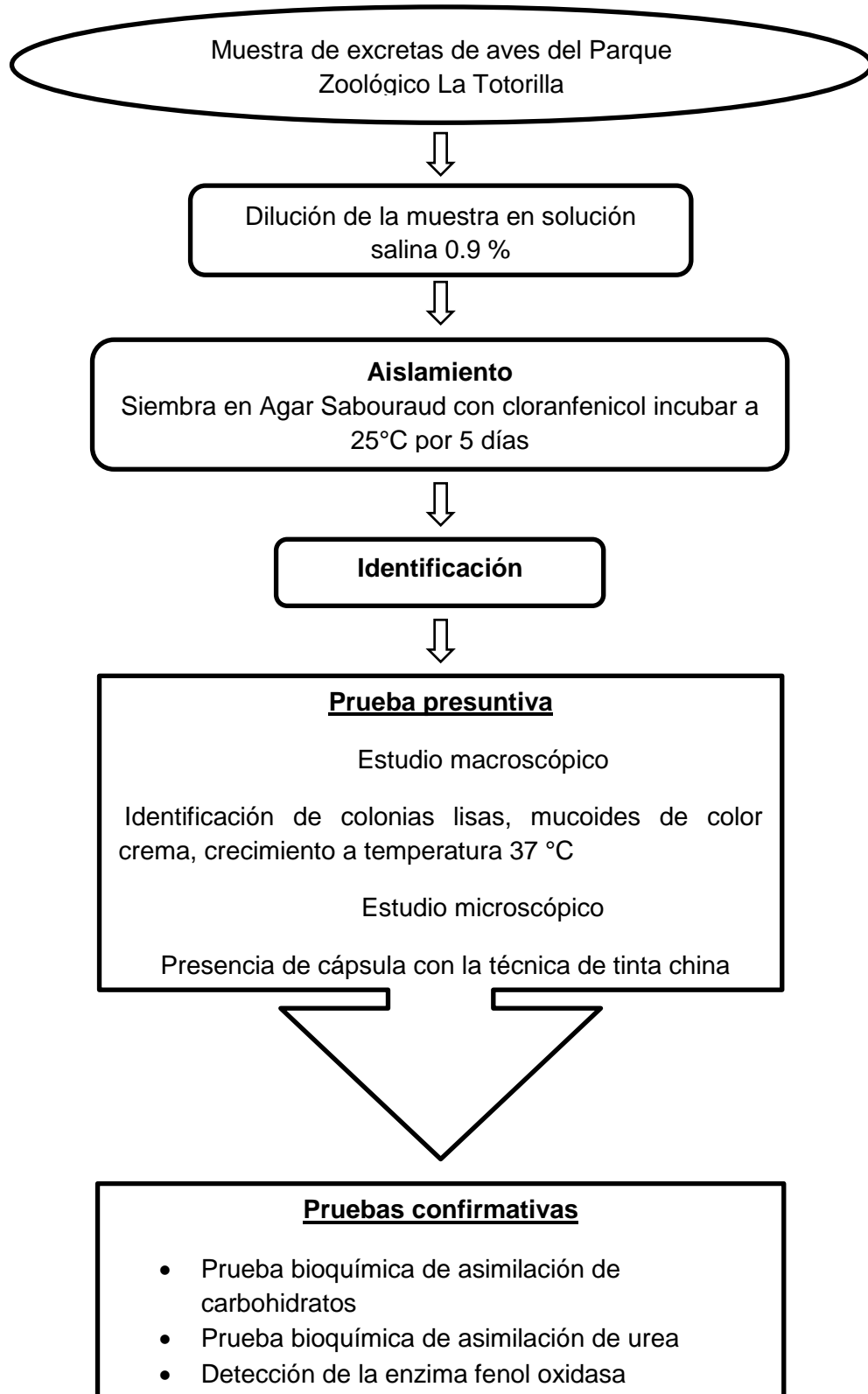
Solución de L – dopa 1 mL

Solución de citrato férrico 0,5 mL

Buffer fosfato 3,5 mL

Esta solución debe tener un color azul claro.

Anexo 2: Flujograma de identificación de especies de *Cryptococcus* en excretas de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla, Ayacucho 2017.



Anexo 3: Características bioquímicas de *Cryptococcus neoformans* según la Serie de Normas Técnicas N°44 del Instituto Nacional de Salud.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE PRINCIPALES LEVADURAS DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA									
ESPECIES	GLU	LAC	SAC	MAL	GAL	RAF	URE	REDUCCIÓN DE NITRATO	FENOLOXIDASA
<i>Candida albicans</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>Candida dubliniensis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C guilliermondii</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>C. kefyri</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-*	-	-
<i>Geotrichum capitatum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhodotorula rubra</i>	+	-	+	+	+/-	+	+	-	-
<i>Trichosporon mucoides</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-

GLU : Asimilación de glucosa MAL : Asimilación de maltosa
 GAL : Asimilación de galactosa RAF : Asimilación de rafinosa
 LAC : Asimilación de lactosa SAC : Asimilación de sacarosa
 URE : Degradación de urea

(*) Reacciones variables.

Anexo 4: Recolección de muestras de excretas de aves en cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla, Ayacucho 2017.



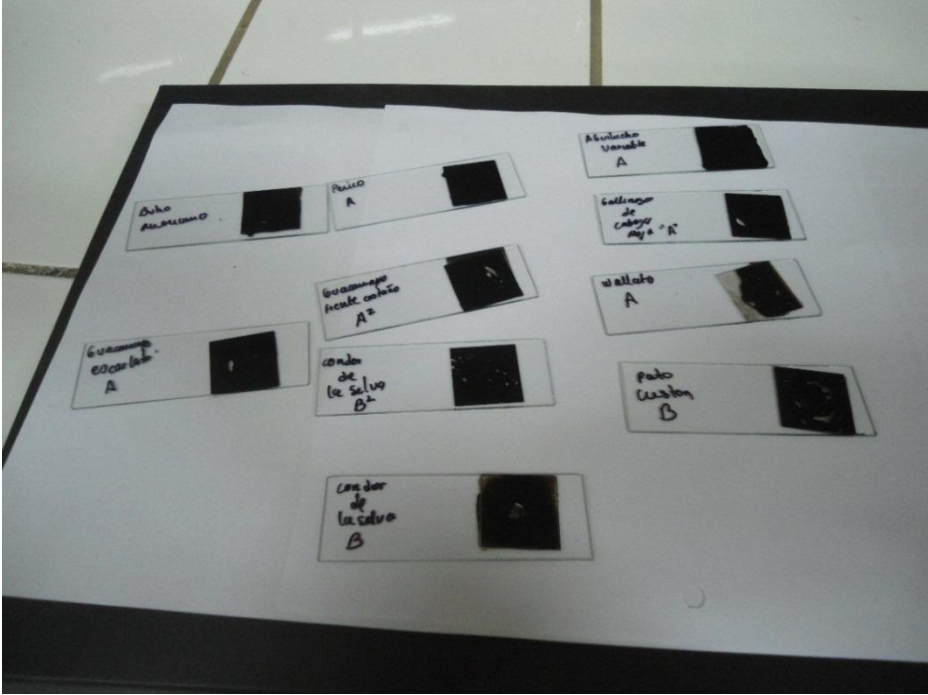
Anexo 5: Colonias de hongos aislados en agar sabouraud con cloranfenicol a partir de las excretas de aves del Parque Zoológico La Totorilla, Ayacucho 2017.



Anexo 6: Cepas puras de levaduras aisladas en frascos contenidos con agar Sabouraud.

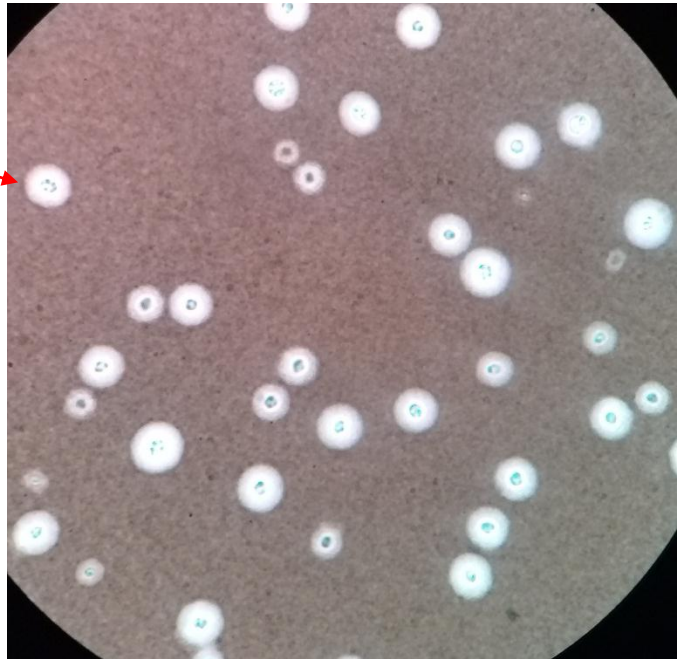


Anexo 7: Laminas portaobjetos con cada cepa de levadura con tinción tinta china.

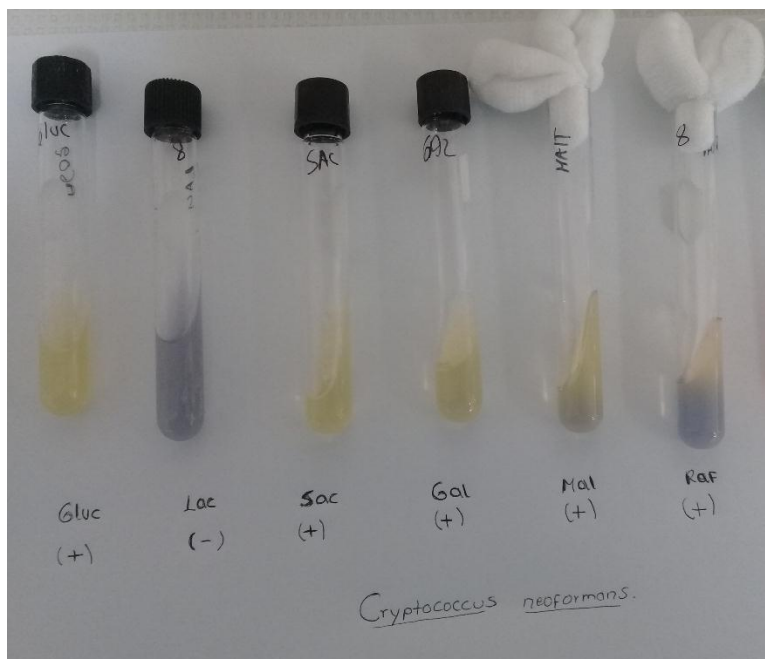


Anexo 8: Observación de los halos característicos de levaduras de *Cryptococcus neoformans* en el microscopio con el objetivo 100x.

Halos característicos
de *Cryptococcus*



Anexo 9: Lectura de la asimilación de azúcares por *Cryptococcus neoformans*



Leyenda:

Gluc: glucosa
Gal: galactosa
Sac: Sacarosa

Malt: maltosa
Lac: lactosa
Raf: rafinosa

Interpretación:

Positivo: color amarillo

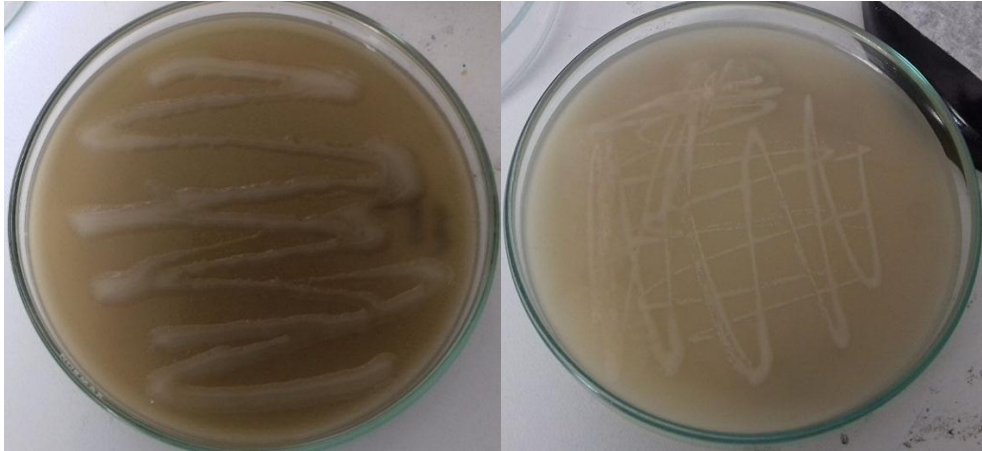
Negativo: color púrpura

Anexo 10: Lectura de la asimilación de úrea por *Cryptococcus neoformans*.



Leyenda:
Interpretación:
Positivo: color rosa o rojo
Negativo: color amarillo

Anexo 11: Observación de la formación de melanina por levaduras de *Cryptococcus neoformans* en medio Agar semilla de girasol

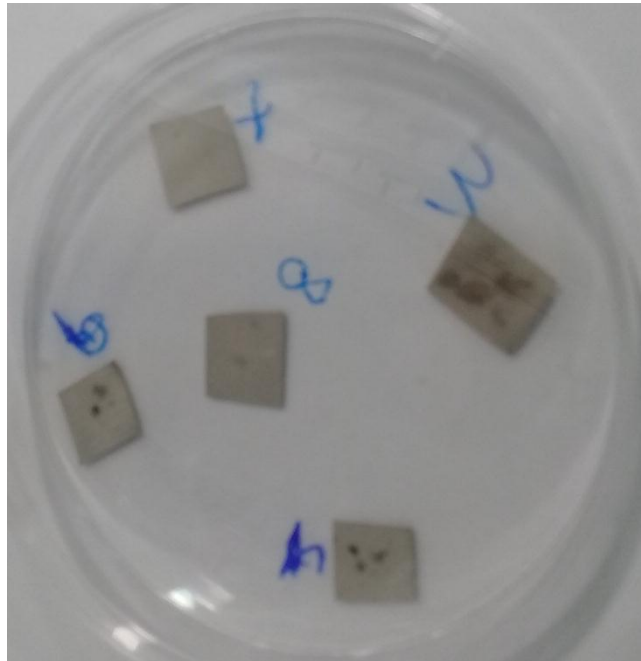


Leyenda:

Imagen izquierda: formación de pigmento colonias de color marrón (positivo)

Imagen derecho: no hay formación de pigmento colonias de color blanco (negativo)

Anexo 12: Formación de la melanina con la prueba de fenoloxidasa con solución L-Dopa – Citrato férrico.



Anexo 13: Tabla de resultados de las diferentes pruebas de la identificación de cepas aisladas del Parque Zoológico La Totorilla, Ayacucho 2017.

Cepa	Tinta china	Asimilación de azúcares						Asimilación		
		Glucosa	Lactosa	Sacarosa	Maltosa	Galactosa	Rafinosa	de Urea	ASG	Fenoloxidasa
1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
4	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-

Leyenda:

Cepa

1: pato crestón

2: pavo real

3: guacamayo rojo

4: Guacamayo frente castaña

5: Gallinazo cabeza roja

ASG: Agar semilla de girasol

Anexo 14: Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
Identificación de especies de Cryptococcus en excretas de aves en cautiverio del Parque Zoológico Totorilla”, Ayacucho 2017.	¿Qué especies de Cryptococcus se encuentran en excretas de aves en cautiverio del parque Zoológico “La Totorilla”, Ayacucho 2017?	Objetivo general Identificar las especies de Cryptococcus en excretas de aves en cautiverio del Parque Zoológico la totorilla Objetivos específicos - Aislar Cryptococcus en excretas de aves en cautiverio del Parque Zoológico “La Totorilla”, Ayacucho 2017. - Determinar la frecuencia de las especies de Cryptococcus en las excretas de las aves e cautiverio del Parque Zoológico La Totorilla, Ayacucho 2017.	- Antecedentes del estudio. - Los hongos - Características - Levaduras - Clasificación taxonómica de <i>Cryptococcus sp</i> - Cryptococcus - Hábitat y fuente de infección de Cryptococcus - Fisiopatología del Cryptococcus - Implicancia del Cryptococcus en la salud del hombre - Aspectos clínicos - Aves como reservorios del Cryptococcus	Se identificarán las especies de Cryptococcus; <i>Cryptococcus neoformans</i> , y <i>Cryptococcus spp</i>	Variable de interés de Especies de Cryptococcus. Variable de caracterización de Especies de aves del Parque Zoológico La Totorilla.	<u>Población:</u> Las 131 aves en cautiverio del parque zoológico La Totorilla <u>Tipo de investigación:</u> Básica descriptiva <u>Análisis estadístico.</u> Tabla de frecuencia.