

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuil., 1901
en heces de “paloma de castilla” (*Columba livia* Gmelin, 1789)
provenientes de lugares públicos de El Salvador

Trabajo de graduación presentado por:

José Guillermo López Funes

Para optar al grado de:

Licenciado en Biología

CIUDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2018

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuil., 1901
en heces de “paloma de castilla” (*Columba livia* Gmelin, 1789)
provenientes de lugares públicos de El Salvador

Trabajo de graduación presentado por:

José Guillermo López Funes

Para optar al grado de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Tribunal calificador:

M. Sc. Yanira Elizabeth López Ventura

MVZ Roberto Guillén Paredes

Docente Asesora:

M. Sc. Zoila Virginia Guerrero Mendoza

CIUDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2018

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuil., 1901
en heces de “paloma de castilla” (*Columba livia* Gmelin, 1789)
provenientes de lugares públicos de El Salvador

Trabajo de graduación presentado por:

José Guillermo López Funes

Para optar al grado de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Tribunal calificador:

M. Sc. Yanira Elizabeth López Ventura _____

MVZ Roberto Guillén Paredes _____

M. Sc. Zoila Virginia Guerrero Mendoza _____

CIUDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2018

AUTORIDADES UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

M. Sc. Roger Armando Arias Alvarado

VICE-RECTOR ACADÉMICO:

Dr. Manuel de Jesús Joya Abrego

VICE-RECTOR ADMINISTRATIVO:

Ing. Nelson Bernabé Granados

SECRETARIO GENERAL:

Lic. Cristóbal Hernán Ríos Benítez

FISCAL:

Lic. Rafael Humberto Peña Marín

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA:

DECANO:

Lic. Mauricio Hernán Lovo Córdoba

VICE-DECANO:

Lic. Carlos Antonio Quintanilla Aparicio

DIRECTORA DE LA ESCUELA DE BIOLOGÍA:

M. Sc. Ana Martha Zetino Calderón

DEDICATORIA

A la memoria de mi abuela. A mis amigos y familia en El Salvador, Honduras y Estados Unidos.

AGRADECIMENTOS

A mi madre: Martha Lidia Funes y mis hermanos, a toda mi familia en Usulután. A toda mi familia en Estados Unidos especialmente a Dina y Edgar Funes.

A la planta docente de la Escuela de Biología por haberme formado.

A mi asesora: M. Sc. Virginia Guerrero, por guiarme en todo el proceso de investigación.

A la gente de CENSALUD por brindarme el espacio y los materiales necesarios para realizar mi investigación. A Flor de María López de Henríquez y Rita Evelyn Valencia de Recinos del Departamento de Micología de la Facultad de Medicina por su apoyo y asesoría. Al Lic. William Merino por apoyo logístico, y a Gerardo por enseñarme y ayudarme a preparar medios de cultivo.

A las Doctoras Daniela Heikel e Ingrid Salas de la Universidad de Costa Rica por su valioso apoyo en la identificación molecular de las muestras.

Al Ing. Lemus (Q. E. P. D) quien me apoyó con la estadística a inicios de la investigación y al Lic. Rene Peña por su asesoría y apoyo para culminar el análisis estadístico.

A todos mis compañeros juntos a los cuales vivimos bonitas experiencias, sufrimos y departimos. A Fernanda Ramos por su cariño, apoyarme y motivarme para finalizar esta investigación.

Al internet y a Sci-hub.

INDICE

INDICE DE TABLAS.....	I
INDICE DE FIGURAS	I
RESUMEN	III
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo general.....	2
2.2 Objetivos específicos	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Antecedentes	3
3.2. Características generales de la “paloma de castilla” (<i>Columba livia</i> Gmelin, 1789) ..	4
3.2.1 Taxonomía de “paloma de castilla” (<i>Columba livia</i>).....	4
3.2.2 Morfología de “paloma de castilla” (<i>Columba livia</i>).....	4
3.2.3 Hábitos de la “paloma de castilla” (<i>Columba livia</i>).....	5
3.2.4 Nido y ciclo de vida “paloma de castilla” (<i>Columba livia</i>)	5
3.2.5 Distribución geográfica “paloma de castilla” (<i>Columba livia</i>).....	6
3.3 Enfermedades zoonóticas.....	6
3.4 <i>Cryptococcus neoformans</i> , sus tipos moleculares y criptococosis	6
3.4.1 <i>Cryptococcus neoformans</i>	6
3.4.2 Criptococosis	7
3.5 Relación número de palomas e incidencia de <i>Cryptococcus neoformans</i>	9
3.6 La “paloma de castilla” (<i>Columba livia</i>) como portador de enfermedades.	9
3.7 La “paloma de castilla” (<i>Columba livia</i>) en El Salvador.....	10
4. HIPÓTESIS	11
5. METODOLOGÍA.....	12
5.3 Metodología de Laboratorio:	19
6. RESULTADOS	25
7. DISCUSIÓN	34
8. CONCLUSIONES.....	38
9. RECOMENDACIONES	40

10. BIBLIOGRAFÍA	41
11. ANEXOS	45
Anexo 1. Preparación del extracto de semilla de girasol. Esquema por: Guillermo Funes, 2018.	45
Anexo 2. Preparación del Agar Semilla de Girasol. Esquema por: Guillermo Funes, 2018.	45
Anexo 4. Resiembra en Agar semilla de Girasol. Esquema por: Guillermo Funes, 2018.	46
Anexo 5. Siembra en Agar Glucosado Sabouraud. Esquema por: Guillermo Funes, 2018.	47
Anexo 6. Preparación de suspensiones e Lactofenol Azul Algodón. Esquema por: Guillermo Funes, 2018.	47
Anexo 7. Siembra en Urea de Christensen. Esquema por: Guillermo Funes, 2018.	47
Anexo 8. Heces paloma de castilla acumuladas en el Parque El Calvario Santa Ana. Foto por: Guillermo Funes, 2017.....	48
Anexo 9. Parque El Calvario, Santa Ana. Los árboles y la estructura central proveen de sombra; ideal para el desarrollo de <i>C. neoformans</i> . Foto por: Guillermo Funes, 2017....	48
Anexo 10. Heces de paloma de castilla acumuladas en el Parque Central de Usulután. Foto por: Guillermo Funes, 2017.....	49
Anexo 11. Plaza Gerardo Barrios, a pesar de la gran cantidad de palomas de castilla, el suelo recibe buena radiación solar, lo que va en detrimento del desarrollo de <i>C. neoformans</i> . Foto por: Guillermo Funes, 2017.....	49
Anexo 12. Ciclo de vida de <i>Cryptococcus neoformans</i>	50
GLOSARIO	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la “paloma de castilla” (<i>Columba livia</i>).....	4
Tabla 2. Clasificación taxonómica de la levadura <i>Cryptococcus neoformans</i>	7
Tabla 3. Variedad, serotipo y tipo molecular (según la técnica RFLP URA5) de la especie <i>Cryptococcus neoformans</i>	7
Tabla 4. Coordenadas de los sitios de muestreo por departamento.....	13
Tabla 5. Cepas del complejo <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i> del Hospital Westmead, Australia utilizadas como control en las pruebas moleculares.....	24
Tabla 6. Muestras positivas por sitio de estudio.....	27
Tabla 7. Detalle de resultados de pruebas e identificación molecular.....	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización de los sitios de muestreo.....	14
Figura 2. Fotografía de la Plaza Libertad y “palomas de castilla” sobre el monumento central de dicha plaza.....	15
Figura 3. Fotografía de la Plaza Gerardo Barrios, se observan muchas palomas sobre el monumento central.....	15
Figura 4. Individuos de “paloma de castilla” (<i>Columba livia</i>) alimentándose en el Parque San Martín.....	16
Figura 5. Parque Daniel Hernández, “palomas de castillas” siendo alimentadas.....	16
Figura 6. “Palomas de castilla” (<i>Columba livia</i>) sobre catedral de Santa Ana.....	17
Figura 7. Iglesia del parque central de Suchitoto. Se observan “palomas de castilla” (<i>Columba livia</i>) sobre la estructura.....	17
Figura 8. Parque Rafael Campo, Sonsonate. Se observan “palomas de castilla” cerca de la estructura central.....	18
Figura 9. Parque Guzmán, San Miguel, tanto como en el parque como la iglesia se observan decenas de “palomas de castilla”.....	19
Figura 10. Recolección de heces en el atrio de la Iglesia de Suchitoto.....	19

Figura 11. Siembra en Agar Semilla de Girasol en la cámara de flujo laminar.....	21
Figura 12. Siembra en Agar Glucosado Sabouraud.....	22
Figura 13. Colonias cafés en Agar Semilla de Girasol, presuntivas de <i>C. neoformans</i>	28
Figura 14. Vista al microscopio de levaduras capsuladas, característica morfológica de <i>C. neoformans</i>	28
Figura 15. Crecimiento de colonias beige en Agar Glucosado Sabouraud.....	29
Figura 16. A la izquierda se observa el color del medio original, y a la derecha el medio después de la inoculación.....	30
Figura 17. Genotipos del complejo <i>C. neoformans/C. gattii</i> y las muestras 39, 45 y 58, detectados según la restricción enzimática del gen URA5.....	31
Figura 18. Porcentaje de muestras positivas y negativas.....	32
Figura 19. Muestras positivas por sitio de estudio.....	32
Figura 20. Curva de la normal con la zona de rechazo sombreada que empieza desde -1.65 hacia la izquierda.....	33
Figura 21. Promedio de palomas y muestras positivas encontradas por sitio de estudio.....	34
Figura 22. Diagrama de dispersión de la variable muestras positivas comparadas con el número promedio de palomas por sitio de estudio.....	35

RESUMEN

En este estudio se tomaron heces de “paloma de castilla” (*Coumba livia*) de parques y plazas públicas de El Salvador. Se muestrearon 11 sitios de 8 departamentos, de cada sitio se tomaron 6 muestras. Se analizaron un total de 66 muestras, de las cuales en 8 (12%) se encontró evidencia de la presencia de *Cryptococcus neoformans*. El bajo porcentaje de heces positivas encontradas, se debe a los factores ambientales de los sitios muestreados.

Esta levadura patógena, se desarrolla en lugares donde hay heces acumuladas y con poca radiación solar. La mayoría de los sitios estudiados estaban bien iluminados y algunos de ellos eran limpiados constantemente. En contraste, aquellos parques o plazas donde se encontró a *C. neoformans*, fueron sitios con poca limpieza lo que daba lugar a la acumulación de heces y/o con poca iluminación solar.

No se encontró una relación positiva entre el número de palomas y la presencia de dicha levadura. El desarrollo de *C. neoformans*, no es influenciada solamente por el número de palomas, si no también, como se expuso anteriormente, a la influencia de factores ambientales. Los resultados no deben interpretarse como que muchas palomas son inofensivas, sino más bien, que en donde las condiciones estén dadas, pocas palomas pueden generar las heces suficientes para representar un riesgo a la salud pública.

Se deben de estudiar los otros 60 diferentes patógenos relacionados con esta especie de palomas, ya que es probable que alguno de ellos se vea favorecido con la gran cantidad de individuos observados en algunos lugares en este estudio. Así como también, vigilar las infraestructuras de unidades de salud y hospitales para evitar la anidación de esta paloma, lo que implicaría un serio riesgo para la salud de pacientes inmunodeprimidos.

También se debe procurar por parte de las respectivas alcaldías e instituciones de salud una mejor limpieza de parques y plazas del interior del país, para evitar un riesgo de contagio entre sus visitantes y además implementar medidas encaminadas a evitar la alimentación de estas palomas.

1. INTRODUCCIÓN

La “paloma de castilla” (*Columba livia*) es frecuentemente señalada como causante de enfermedades y del deterioro de monumentos y edificios en las ciudades de todo el mundo. De acuerdo con Johnston (1998), muchas personas se quejan constantemente sobre la “paloma de castilla” (*C. livia*), y sostienen que son un problema para los intereses humanos por sus hábitos de anidación, la acumulación de excretas en edificios y monumentos y por ser fuente potencial de infecciones zoonóticas. Se estima que esta especie de paloma porta 60 diferentes organismos patógenos a humanos, y *Cryptococcus neoformans* es uno de los cinco agentes que son transmitidos a humanos regularmente (Acha & Szyfres 2001, Haag-Wackernagel & Moch 2004).

Solo en Estados Unidos los costos estimados por daños que causa la “paloma de castilla” (*C. livia*) son de \$1.1 billones de dólares al año (Pimentel *et al* 2005). En El Salvador se han registrado 435 casos de criptococosis en un periodo de 8 años (2009-2016) y en el periodo del 2009 al 2013 se registraron 19 casos fatales (MINSAL 2014, MINSAL 2017). En este sentido, esta investigación pretende brindar una noción de este problema en el país, además de brindar información e insumos a las autoridades correspondientes para ejecutar las medidas más apropiadas para un control eficaz de dicha especie.

Uno de los objetivos de esta investigación fue buscar la presencia *C. neoformans* en lugares públicos de 8 de los departamentos más densamente poblados del país. Este patógeno supone un riesgo para la salud pública por el hecho que puede ser propagado por el aire y lo parques y plazas públicas son, probablemente, los sitios de mayor afluencia en las ciudades; ya sea para esparcimiento o para comercio. La levadura *C. neoformans*, fue encontrada en sitios donde existen las condiciones ambientales para su desarrollo; la evidencia sugiere que el número de “paloma de castilla” (*C. livia*) en dichos sitios no es un factor fundamental en la presencia de dicha levadura. El desarrollo de esta levadura parece estar determinada por factores ambientales y de limpieza en los parques y plazas públicas estudiadas, por lo que debe ponerse énfasis en la limpieza de dichos lugares a fin de disminuir el desarrollo de esta levadura y la posibilidad de adquirir criptococosis.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Aislar *Cryptococcus neoformans* de heces de “paloma de castilla” (*Columba livia*) provenientes de lugares públicos de los departamentos de San Salvador, La Libertad, Santa Ana, Sonsonate, San Miguel, Usulután, La Paz y Cuscatlán, de El Salvador.

2.2 Objetivos específicos:

Identificar la presencia de *C. neoformans* en heces de “paloma de castilla” (*C. livia*) provenientes de lugares públicos de los departamentos de San Salvador, La Libertad, Santa Ana, Sonsonate, San Miguel, Usulután, La Paz y Cuscatlán.

Determinar si existe una relación entre la incidencia de *C. neoformans* y el número de palomas en los sitios de estudio.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Antecedentes

Debido a los conflictos que esta especie suscita al público en general y las autoridades ambientales y sanitarias por daños a la infraestructura pública y ser portadores de agentes patógenos, esta especie ha sido objeto de innumerables estudios de diversa índole, como ectoparásitos (Haag-Wackernagel 2005), densidad poblacional (Senar *et al* 2009), percepción del público y su relación con las palomas (Ramírez *et al* 2008, Ryan 2011), entre otros.

Sin embargo, los estudios sobre agentes zoonóticos asociados a esta especie, han brindado importante información sobre los riesgos a la salud pública que esta especie puede representar. Muchos estudios a nivel mundial se han enfocado en el aislamiento de la *C. neoformans*, por ejemplo, en Nigeria, Nweze *et al* (2015), aislaron *C. neoformans* en 39 de 177 (22%) muestras de heces de esta paloma provenientes de 10 locaciones de dicho país, y en India Xavier *et al* (2013), encontraron a esta levadura en 22 de 33 (60.6%) en muestras del mismo tipo.

Ya en América, Caecido *et al* (1996) buscaron la presencia de *C. neoformans* en excretas de “paloma de castilla” (*C. livia*) recolectadas en las 20 comunas del perímetro urbano de la ciudad de Santiago de Cali, Colombia, y encontraron a esta levadura en 59 de 119 (49.5%) muestras analizadas, cabe mencionar que los autores recolectaron muestras tanto de lugares de percha y de nidos; aislando la levadura con mayor frecuencia en las muestras de los nidos.

Colom *et al* (1997), analizaron 92 muestras ambientales de Alicante, España, en búsqueda de levaduras del género *Cryptococcus*, encontrando a *C. neoformans* en 73 muestras (79.3%). Estos autores analizaron y compararon muestras de heces de palomas urbanas y de palomas enjauladas, encontrando en las muestras de palomas enjauladas la mayor presencia de *C. neoformans*.

De igual manera, en el perímetro urbano de Ica, Perú, Curo *et al* (2005) evidenciaron la presencia de *C. neoformans* en 17 de 124 muestras (13.7%). Estos autores recolectaron muestras de palomares y también ocuparon cajas Petri expuestas al aire para la recolección de esporas de esta levadura. En Mérida, Venezuela, Pérez de Salazar *et al* (2011), analizaron muestras de polvo transportado por el aire y provenientes de aceras, tanto de áreas concurridas y no concurridas por palomas de castilla. En este estudio se encontró *Cryptococcus* spp. en ambas muestras. La especie *C. neoformans* solo se encontró en un 2% de la muestra.

En México, Canonico-Gonzalez *et al* (2013), analizaron 50 muestras tomadas aleatoriamente en 3 municipalidades de la ciudad de Monterrey, aislando dos especies del género *Cryptococcus*: *C. neoformans* y *C. albidus* en 10 de las muestras obtenidas. El porcentaje de aislamiento de la especie *C. neoformans* fue de 5%.

En El Salvador, existe solamente un estudio llevado a cabo con esta especie. Ayala de Chavarría *et al* (2011), aislaron *C. neoformans* de muestras ambientales contaminadas con heces de “paloma de castilla” (*C. livia*), de un total de 52 muestras (material obtenido de nidos con excremento de palomas o sólo excretas acumuladas de palomas), en 19 se aisló *C. neoformans*, en 36.5% de las muestras.

3.2. Características generales de la “paloma de castilla” (*Columba livia* Gmelin, 1789)

3.2.1 Taxonomía de “paloma de castilla” (*Columba livia*)

La “paloma de castilla” (*C. livia*), pertenece al reino animal, del filo Chordata, de la clase Aves, del orden de los Columbiformes, de la familia Columbidae, científicamente se le conoce como *Columba livia* (Terres 1995) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la “paloma de castilla” (*Columba livia*) (Terres, 1995).

Reino	Animal
Filo	Chordata
Clase	Aves
Orden	Columbiformes
Familia	Columbidae
Nombre científico	<i>Columba livia</i> (Gmelin, 1789)

3.2.2 Morfología de “paloma de castilla” (*Columba livia*)

Los adultos de “paloma de castilla” (*C. livia*) son gris oscuro en gran parte con tonalidades púrpura y verde en el cuello; alas grises, cobertoras medianas y secundarias con las puntas negras, lo cual forman dos barras negras que atraviesan el ala cuando esta doblada. El pico es negro y las patas color magenta (Stiles & Skutch 2007). Las aves que se asemejan más a sus ancestros silvestres tienen la cabeza y el cuello más oscuro que la espalda, barras negras en las alas interiores, rabadilla blanca.

El macho es un tanto más grande que la hembra, aunque el macho y la hembra pueden no presentar alguna diferencia física obvia, lo que puede deberse a que comparten de igual manera el cuidado parental del pichón. Algunas especies de la ciudad y el campo son totalmente blancos, otros son una mezcla de blanco y gris sin la rabadilla blanca (Terres 1995, National Geographic 1999, Haag-Wackernagel s. f.).

3.2.3 Hábitos de la “paloma de castilla” (*Columba livia*)

Los individuos silvestres habitan principalmente áreas urbanas, en donde anidan en estructuras hechas por el hombre, la hembra pone dos huevos que ambos padres incuban alternadamente. Se alimentan de semillas y desperdicios en calles y plazas y cerca de mercados. Puede ser muy manso en los parques de las ciudades, donde incluso puede alimentarse de la mano de personas. Desafortunadamente, cantidades enormes de alimento, junto con la ausencia de enemigos, provoca grandes poblaciones de palomas que en muchos casos puede causar problemas (Terres 1995, Stiles & Skutch 2007, Haag-Wackernagel s.f.).

3.2.4 Nido y ciclo de vida “paloma de castilla” (*Columba livia*)

El tamaño de la puesta es de dos huevos, los padres incuban los huevos alrededor de 18 días, la hembra desde finales de la tarde hasta la media mañana y el macho desde la mitad de la mañana hasta el final de la tarde; los pichones están listos para dejar el nido en el día 30 después de su nacimiento, y la mayoría ya se han ido para el día 35, los padres habrán producido otro par de huevos cerca del día 20, traslapando la segunda puesta con los pichones de la primera (Johnston 1998).

Esta paloma anida en construcciones, tejados, edificios, ventanas y estructuras hechas por el hombre. Durante los primeros días, las crías son alimentadas con una especie de “leche”, esta “leche de paloma” es producida, bajo la influencia de la hormona prolactina, por células de la pared del buche de ambos padres. Esta leche es muy nutritiva, contiene principalmente proteínas y grasa que hacen que el pichón crezca rápidamente. Por eso, este tipo de palomas son uno de los vertebrados que más rápido crecen (Terres 1995).

Esta leche hace que los padres no necesiten buscar alimento especial para la cría (como otras aves insectívoras o semilleras), los padres pueden alimentarse de cualquier cosa y luego transformarlo en la leche (Haag-Wackernagel s. f.).

3.2.5 Distribución geográfica “paloma de castilla” (*Columba livia*)

En su rango nativo es residente desde Noruega, Rusia y el norte de China, al sur a través de las Islas Británicas y al oeste de Europa hasta Madeira y las Islas Azores, Egipto y el medio oriente de India. Pero ahora se ha establecido en la mayoría de las grandes ciudades del mundo, en Norte, Centro y Suramérica, en el Caribe y las Islas de Hawaii. Aparentemente, fue introducida por primera vez a América por franceses en Port Royal, Nova Scotia, en Canadá en 1606 (Terres 1995).

3.3 Enfermedades zoonóticas

Se ha definido como zoonosis a “*aquellas enfermedades que se transmiten naturalmente de los animales vertebrados al humano y viceversa*”. Las enfermedades que resultan de la transmisión de parásitos zoonóticos son comunes. Los humanos pueden infectarse a través de alimentos, agua y de contacto directo con los animales. La mayoría de las zoonosis parasitarias son enfermedades que se descuidan, a pesar de causar una considerable carga global en el deterioro de la salud humana. Las zoonosis y las enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales continúan registrándose en altas tasas de incidencia en muchos países, causando significativa morbilidad y mortalidad (OMS 1982, Acha y Szyfres 2001, Torgerson y Macpherson 2011).

3.4 *Cryptococcus neoformans*, sus tipos moleculares y criptococosis

3.4.1 *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus es una levadura saprofítica que se desarrolla en ciertos suelos. El agente tiene una forma globular ovoide, es encapsulado, gram-positivo. Las recientes investigaciones han demostrado que *C. neoformans* tiene una forma sexual y es un basidiomiceto. (Acha y Szyfres 2001). Esta levadura tiene dos fases, una anamorfa y otra teleomorfa; la clasificación taxonómica en estudios posteriores y en secuencias de nucleótidos de ARN ribosomal, de acuerdo con Baró 2002, se encuentra en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la levadura *Cryptococcus neoformans* (Baró 2002).

	Fase anamorfa	Fase teleomorfa
Phyllum	Deuteromycetes	Basidiomycota
Orden	Cryptococcales	Filobasidiales
Familia	Cryptococcaceae	Filobasidiaceae
Género	<i>Cryptococcus</i>	<i>Filobasidiella</i>
Especie	<i>neoformans</i>	<i>neoformans</i>

Con la aplicación de diversas técnicas moleculares, hoy en día se conocen 8 tipos moleculares del complejo *C. neoformans/C. gatii*. La especie *C. neoformans* tiene 2 variedades (*grubii* y *neoformans*) y 3 serotipos (A, D y el híbrido AD) (Tabla 3), y *C. gatii* tiene solo 2 serotipos (B y C).

Los 8 tipos moleculares de esta especie son: tipos VNI y VNII (*C. neoformans* var. *grubii*), tipo VNIII (*C. neoformans* serotipo AD), tipo VNIV (*C. neoformans* var. *neoformans*, serotipo D), y los tipos VGI, VGII, VGIII y VGIV (*C. gatii*, serotipos B y C) (Meyer *et al.* 2003, Cattana *et al.* 2013).

Tabla 3. Variedad, serotipo y tipo molecular (según la técnica RFLP URA5) de la especie *Cryptococcus neoformans* (Meyer *et al.* 2003, Cattana *et al.* 2013).

Especie	Variedad	Serotipo	Tipo molecular
<i>C. neoformans</i>	<i>grubii</i>	A	VNI
		A	VNII
Híbrido AD		AD	VNIII
<i>C. neoformans</i>	<i>neoformans</i>	D	VNIV

3.4.2 Criptococosis

La criptococosis es una micosis oportunista. Se manifiesta principalmente como una encefalitis o una meningoencefalitis que afecta tanto a humanos como a animales. Es causada principalmente por dos especies de hongos: *Cryptococcus neoformans* y *C. gatii*, estas especies habitan en la naturaleza, sin embargo *C. neoformans* se ha aislado a partir de heces de palomas (Columbiformes) loros y pericos (Psittaciformes) (Pérez de Salazar *et al.* 2011).

En el ambiente *C. neoformans* es un saprofito distribuido por todo el mundo. Una fuente de infección evidente son las deyecciones desecadas de paloma. El hongo penetra en el cuerpo por el aparato respiratorio, causando una infección pulmonar que suele ser transitoria. Algunas infecciones pulmonares se propagan a la piel, los huesos, las vísceras y al sistema nervioso central (Prescott *et al* 2002).

En el humano se dan casos esporádicos, con una mayor incidencia en hombres y mujeres. De 1965 a 1977 en los Estados Unidos se documentaron 1,260 casos de criptococosis. En los Estados Unidos y en Europa, la criptococosis se presenta sobre todo en pacientes con defectos del sistema inmunitario (especialmente SIDA). La enfermedad se registró con más frecuencia en todo el mundo a medida que aumentó el número de enfermos de SIDA, de hecho, en los Estados Unidos la criptococosis es la cuarta causa potencialmente letal en pacientes de SIDA (Acha y Szyfres 2001).

Los síntomas más notorios de la forma meníngea son dolor de cabeza y disturbios visuales. Otros síntomas pueden incluir confusión, alteraciones de la personalidad, agitación y letargia. La meningoencefalitis criptococócica puede tener un curso prolongado de semanas o meses y es casi siempre mortal si no es tratada adecuadamente. El humano es resistente a *Cryptococcus neoformans*. Hay enfermos de criptococosis que no presentan factores predisponentes evidentes, pero el hongo es en gran medida un agente patógeno oportunista (Acha y Szyfres 2001).

Koneman *et al* (2008), describen diversas manifestaciones clínicas de la criptococosis y los agrupan en 4 bloques. La criptococosis del sistema nervioso central, criptococosis pulmonar, criptococosis cutánea y criptococosis diseminada. Estos mismos autores señalan que en la actualidad, se la considera una enfermedad que define al SIDA y deben realizarse pruebas para VIH siempre que se aísla *C. neoformans* en muestras clínicas o cuando las pruebas de detección de antígeno sean positivas. No obstante, se han detectado casos recientes de criptococosis en huéspedes inmunocompetentes.

Existen serotipos que son ubicuos y se han aislado de varias fuentes ambientales, tales como el suelo, ciertas plantas, heces de pájaros, entre otros. El agente causal se encuentra con particular frecuencia en los palomares y en el suelo contaminado por excrementos de paloma. La creatinina que contiene la materia fecal de las palomas sirve como fuente de nitrógeno para *C. neoformans*, cuyo desarrollo favorece y prolonga su supervivencia en el suelo, pero las palomas no se enferman de criptococosis. El humano se infecta por vía aerógena al inhalar polvo que contiene el agente causal; *C. neoformans* en la naturaleza no tiene cápsula y se encapsula en los pulmones, lo que le permite resistir a la fagocitosis (Acha y Szyfres 2001).

Para el control de esta enfermedad, el control de la población de palomas podría prevenir una parte de los casos. Debe evitarse la exposición del hombre a acumulaciones de excrementos de paloma en especial en al alféizar de las ventanas, en palomares, perchas y nidos de aves. La eliminación de excrementos de paloma debe ser precedida por la descontaminación química o por el humedecimiento con agua o aceite para evitar los aerosoles (Acha y Szyfres 2001).

En El Salvador, de acuerdo con estadísticas del Ministerio de Salud (MINSAL), del 2009 al 2016 se registraron 435 casos de criptococosis atendidos en la red de establecimientos pública a nivel nacional, y un total de 19 muertes en estos cinco años, siendo San Salvador el departamento que más casos reporta (MINSAL 2014, MINSAL 2017).

3.5 Relación número de palomas e incidencia de *Cryptococcus neoformans*.

Caecido *et al* (1996), establecieron que el aislamiento de *C. neoformans* era más frecuente en lugares donde había más de 15 palomas, quizá como un resultado directo de la mayor cantidad de excretas, sin embargo, estos autores tomaron muestras de nidos, y señalan que es más frecuente aislar a esta levadura en nidos, debido a las excretas acumuladas.

3.6 La “paloma de castilla” (*Columba livia*) como portador de enfermedades.

Las aves urbanas podrían considerarse como animales de compañía, especialmente para niños y gente mayor. Es común que la gente encuentre placer en observarlas y alimentarlas. Sin embargo, algunas especies de aves urbanas se congregan en concentraciones demasiado elevadas y pueden producir excrementos que dañan los edificios y vehículos además de causar problemas de polución con sus excrementos (CIEH 2008).

La “paloma de castilla” (*C. livia*) y las palomas en general, han sido históricamente considerada como un símbolo de paz y entendimiento entre las personas y, en general, se soslaya su papel como transmisora de agentes de numerosas enfermedades zoonóticas, que incluso pueden conducir a la muerte (Gonzales-Acuña *et al* 2007).

Cerca de 233 publicaciones proveen firme evidencia que la “paloma de castilla” (*C. livia*) es fuente de una gran variedad de agentes zoonóticos (Magnito *et al* 2010). De acuerdo con Haag-Wackernagel & Moch (2004), estudios revelan que estas palomas alojaban al menos 60 diferentes organismos patógenos para el humano, de los cuales 5 son virus, 9 bacterias, 45 hongos y 1 protozoo. Sin embargo, solo 5 patógenos son transmitidos a humanos frecuentemente estos son: *Chlamydophila psittaci*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida parapsilosis*, *Histoplasma capsulatu* y *Aspergillus* spp.

3.7 La “paloma de castilla” (*Columba livia*) en El Salvador.

Desde el 2002 la Dirección General de Patrimonio Natural del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN) ha recibido más de 100 denuncias sobre problemas atribuidos a esta especie. De estas, más de la mitad provienen del Gran San Salvador, específicamente de sectores populosos como Soyapango, la Zacamil y Mejicanos. Además, se han recibido notas sobre problemas o inconvenientes en hospitales, centros educativos, empresas de procesamiento de alimento en crudo (granos) e infraestructura productiva (MARN s.f.).

En El Salvador se han documentado casos de afectaciones a la salud humana, con una probable responsabilidad de esta paloma. Un caso de fibroma pulmonar en un empleado que trabaja en una bodega donde palomas de castilla permanecían y defecaban es atribuido al “polvillo” de las palomas. Otro caso es el de una persona de saneamiento ambiental, quien trabajaba limpiando canaletas, la cual adquirió criptococosis cerebral quedando ciego y sordo a causa de esta enfermedad, aun cuando aparentemente era un paciente inmunocompetente (Chicas 2008).

En cuanto al marco legal, existe en el país legislación relacionada con animales que puedan transmitir enfermedades al humano y su regulación. El artículo 79 del Código de Salud del MINSAL establece que *“el ministerio (el MINSAL) deberá dictar las medidas que correspondan para proteger a la población contra los insectos, roedores; perros u otros animales que pudieren transmitir enfermedades al ser humano o alterar su bienestar. Cuando se compruebe su peligrosidad, deberán ser retirados o eliminados por su poseedor o directamente por el Ministerio”*. El art. 12 de la Ley de Conservación de Vida Silvestre sostiene que *“para el control de especies de la vida silvestre que dañen o amenacen la salud humana, la agricultura y la ganadería del país, se establecerán normas reglamentarias”* (MINSAL 1988, MARN 1994).

El MARN, mediante el Acuerdo 052, autorizó durante el año 2014, a particulares que así lo creyesen conveniente, la libertad para ejecutar medidas para el control, manejo y erradicación de esta especie. Este acuerdo temporal permitió la eliminación de fuentes de alimento, agua, nidos e individuos, el MARN actualmente trabaja para que este acuerdo sea definitivo (MARN 2014).

4. HIPÓTESIS

H_0 = La presencia de *Cryptococcus neoformans* en las muestras analizadas es igual o mayor al 50%.

H_a = La presencia de *Cryptococcus neoformans* en las muestras analizadas es menor al 50%.

H_0 = No hay una relación positiva entre el número de palomas y la presencia de *Cryptococcus neoformans* en los sitios de estudio.

H_a = Hay una relación positiva entre el número de palomas y la presencia de *Cryptococcus neoformans* en los sitios de estudio.

5. METODOLOGÍA

5.1 Lugares de estudio:

La recolección de las muestras fecales de “paloma de castilla” (*C. livia*), se realizó en lugares donde hay una gran afluencia de personas y palomas (atrio de catedrales, plazas y parques públicos) de los departamentos más densamente poblados del país según la DIGESTYC, los cuales son: San Salvador, La Libertad, Santa Ana, Sonsonate, San Miguel, Usulután, La Paz y Cuscatlán (fig. 1). En la Tabla 4, se detallan las coordenadas de cada sitio.

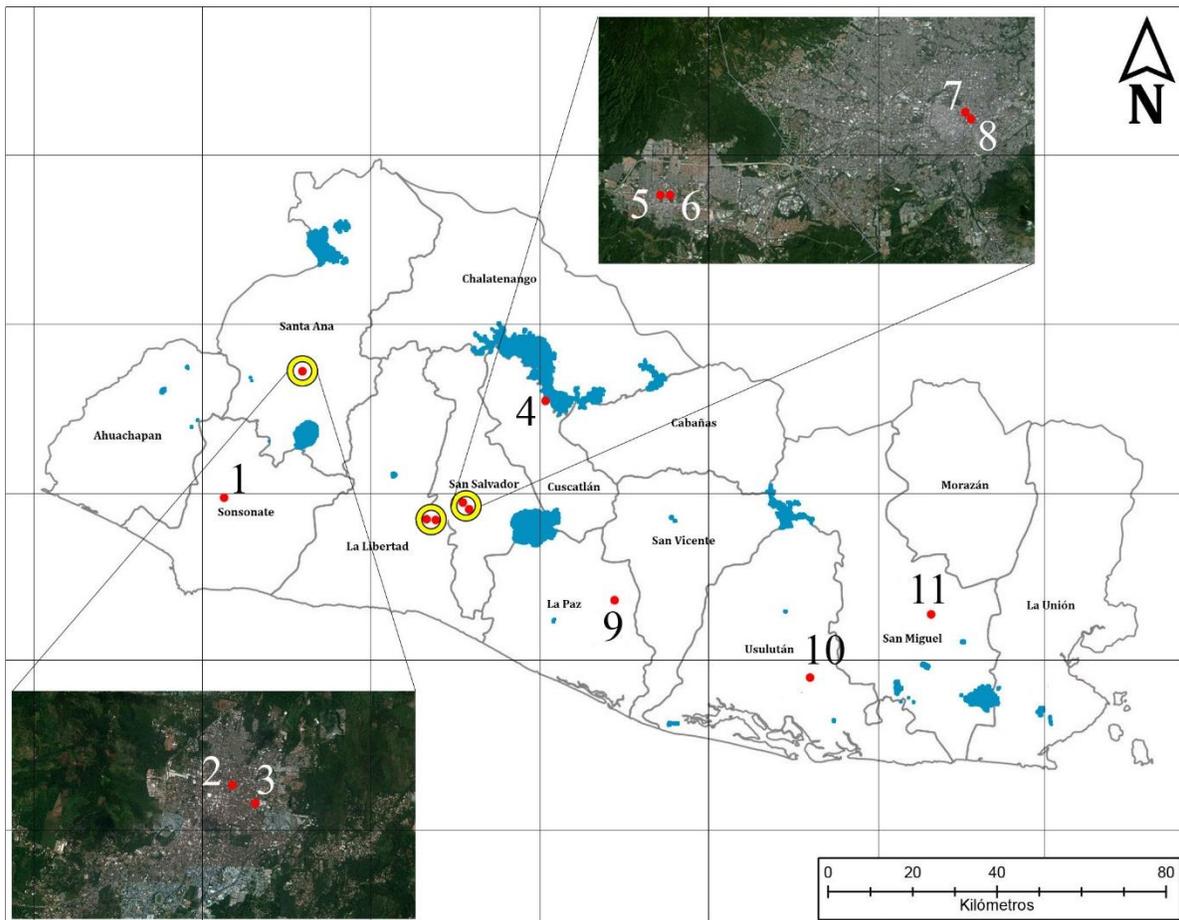


Figura 1. Localización de los sitios de muestreo: Parque Rafael Campo (1), Parque El Calvario (2), Catedral de Santa Ana (3), Parque central de Suchitoto (4), Parque San Martín (5), Parque Daniel Hernández (6), Plaza Gerardo Barrios (7), Plaza Libertad (8), Plaza Cívica (9), Parque central de Usulután (10) y Parque Guzmán (11). Mapa preparado por: Ricardo Pérez.

Tabla 4. Coordenadas de los sitios de muestreo por departamento.

Departamento	Sitio	Coordenadas
San Salvador	Plaza Libertad	N 13° 41' 51.2'', O 89° 11' 22.2''
	Plaza Gerardo Barrios	N 13° 41' 56.6'', O 89° 11' 28.8''
La Libertad	Parque San Martín	N 13° 40' 25.1'', O 89° 17' 09.0''
	Parque Daniel Hernández	N 13° 40' 25.1'', O 89° 17' 18.6''
Santa Ana	Catedral de Santa Ana	N 13° 59' 41.9'', O 89° 33' 21.9''
	Parque El Calvario	N 13° 59' 24.9'', O 89° 33' 48.1''
Usulután	Parque Central	N 13° 20' 41.8'', O 88° 26' 23.0''
Cuscatlán	Parque Central de Suchitoto	N 13° 56' 12.4'', O 89° 01' 34.0''
Sonsonate	Parque Rafael Campos	N 13° 43' 14.6'', O 89° 43' 40.1''
La Paz	Plaza Cívica	N 13° 30' 30.7'', O 88° 52' 11.4''
San Miguel	Parque Guzmán	N 13° 28' 58.2'', O 88° 10' 31.7''

A continuación, se describen algunos de los sitios de estudio.

Plaza Libertad (N 13° 41' 51.2'', O 89° 11' 22.2''): esta plaza se encuentra ubicada en el centro histórico del departamento de San Salvador. Se observó gran cantidad de palomas, y heces acumuladas en el monumento principal (fig. 2).



Figura 2. Fotografía de la Plaza Libertad y “palomas de catilla” sobre el monumento central de dicha plaza.
Fotografía por: Guillermo Funes, San Salvador 2017.

Plaza Gerardo Barrios o Plaza Cívica (N 13° 41' 56.6'', O 89° 11' 28.8''): esta plaza se encuentra frente a la Catedral Metropolitana y al Palacio Nacional (fig. 3). A diario, cientos de personas se reúnen en esta plaza, y también es lugar de reunión de centenares de palomas que llegan a ser alimentadas.



Figura 3. Fotografía de la Plaza Gerardo Barrios, se observan muchas palomas sobre el monumento central. Fotografía por: Guillermo Funes, San Salvador 2017.

Parque San Martín (N 13° 40' 25.1'', O 89° 17' 09.0''): este parque está ubicado en el municipio de Santa Tecla, La Libertad. Es un conocido y céntrico lugar, concurrido con muchas personas que lo visitan para descansar y vendedores informales. Las palomas, al igual que en otros parques, son alimentadas por personas (fig. 4).



Figura 4. Individuos de “paloma de castilla” alimentándose en el Parque San Martín, Santa Tecla. Fotografía por: Guillermo Funes, La Libertad 2017.

Parque Daniel Hernández (N 13° 40' 25.1'', O 89° 17' 18.6''): este parque, junto con la Plaza San Martín, representan sitios emblemáticos en el centro de Santa Tecla. Este parque también se encuentra ubicado en el centro de Santa Tecla (fig. 5). En ambos sitios puede evidenciarse una gran afluencia de personas y palomas, estas últimas atraídas por la costumbre de los visitantes de proporcionarles alimento.



Figura 5. Parque Daniel Hernández en Santa Tecla, “palomas de catillas” siendo alimentadas. Fotografía por: Guillermo Funes, La Libertad 2017.

Catedral de Santa Ana (N 13° 59' 41.9'', O 89° 33' 21.9''): la emblemática Catedral de Santa Ana, es visitado tanto por feligreses como por turistas nacionales y extranjeros. Está ubicada en el centro de la ciudad de Santa Ana, departamento de Santa Ana (fig. 6).

Al igual que otros lugares, las personas alimentan a las palomas, resultando en un gran número de palomas atraídas al sitio, lo que incluso ha contribuido al deterioro de su infraestructura, siendo incluso necesario colocar una malla para evitar que dichas palomas se posen en la misma.



Figura 6. “Palomas de castilla” (*Columba livia*) sobre catedral de Santa Ana. Fotografía por: Guillermo Funes, Santa Ana 2017.

Parque El Calvario (N 13° 59' 24.9'', O 89° 33' 48.1''): un concurrido parque del departamento de Santa Ana. En medio de este parque -como en muchos otros- hay una estructura central, donde las “palomas de castilla” permanecen perchadas, bajando ocasionalmente a comer. El parque también es visitado por muchas personas y vendedores.

Parque Central de Suchitoto (N 13° 56' 12.4'', O 89° 01' 34.0''): ubicado en el departamento de Cuscatlán, Suchitoto es visitado por muchos turistas. En la plaza central, se pueden observar muchas palomas perchadas en la iglesia y en la plaza frente a esta (fig. 7).



Figura 7. Iglesia del parque central de Suchitoto. Se observan “palomas de castilla” (*Columba livia*) sobre la estructura. Fotografía por: Guillermo Funes, Cuscatlán 2017.

Parque Central de Usulután (N 13° 20' 41.8'', O 88° 26' 23.0''): este parque se encuentra ubicado en el centro de la ciudad de Usulután. Por el hecho de estar rodeado de almacenes y ventas informales, en este parque y sus alrededores concurre una gran cantidad de personas. Como es habitual, se encuentran muchas “palomas de castilla” alimentándose y perchadas en los alrededores o en la iglesia frente al parque llamada iglesia Santa Catarina.

Parque Rafael Campo (N 13° 43' 14.6'', O 89° 43' 40.1''): ubicado en el departamento de Sonsonate, este parque es un lugar donde confluyen muchas personas y “palomas de castilla”. Comparte las mismas características de muchos parques del país: rodeado de comercio formal e informal, frente a él hay una iglesia o catedral y en el centro hay una estructura central techada (la cual, como en otros parques, es utilizado por las palomas para percharse) (fig. 8).



Figura 8. Parque Rafael Campo, Sonsonate. Se observan “palomas de castilla” cerca de la estructura central.
Fotografía por: Guillermo Funes, Sonsonate 2017.

Plaza cívica (N 13° 30' 30.7'', O 88° 52' 11.4''): como es tradición, este parque se ubica en corazón del centro del municipio (en este caso del municipio de Zacatecoluca), y frente a este hay una iglesia que es utilizada por las palomas. Se tomaron muestras de la plaza y de los alrededores de la iglesia frente a esta plaza.

Parque Guzmán (N 13° 28' 58.2'', O 88° 10' 31.7''): este parque se encuentra ubicado en el departamento de San Miguel. Frente a este parque donde se posan decenas de palomas, el parque es frecuentado por muchos visitantes y vendedores (fig. 9).



Figura 9. Parque Guzmán, San Miguel, tanto como en el parque como la iglesia se observan decenas de “palomas de castilla”. Fotografía por: Guillermo Funes, San Miguel 2017.

5.2 Metodología de Campo:

5.2.1 Recolección

En cada sitio se recolectó material fecal, dicho material se analizó para determinar la presencia de *C. neoformans*. Se buscó heces en los sitios donde se pudo evidenciar que efectivamente eran heces de “paloma de castilla” (*C. livia*) (Fig. 10). Se tomaron en cuenta también aspectos como la morfología de las heces de esta especie, para evitar recolectar material fecal de otra especie. Generalmente, cada sitio de estudio se visitó durante el transcurso de la mañana, desde la 7:00 a. m hasta las 12:00 del mediodía (Fig. 10).

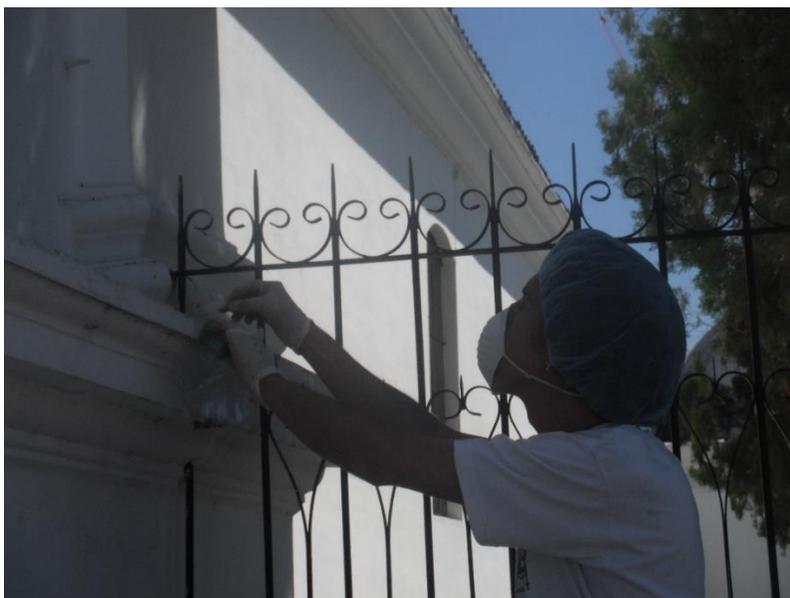


Figura 10. Recolección de heces en el atrio de la Iglesia de Suchitoto. Septiembre de 2017.

Se utilizaron pequeñas espátulas plásticas estériles y se utilizó una espátula por muestra recolectada. Se tomaron 2 muestras de heces por sitio. Se realizaron 3 viajes de recolecta a cada sitio. Se documentó todos los datos de campo como; lugar, hora y fecha. Todas las muestras obtenidas mediante la recolección con la espátula, se depositaron en bolsas plásticas estériles Ziploc y se transportaron el mismo día o el día posterior de su recolección hacia los laboratorios del Centro de Investigaciones y Desarrollo en Salud (CENSALUD) ubicado en las instalaciones de la Universidad de El Salvador, en un contenedor plástico seco, para ser procesadas.

5.3 Metodología de Laboratorio:

5.3.1 Preparación de medios de cultivo

Para aislar e identificar *C. neoformans*, primero, se cultivaron las muestras en Agar semilla de girasol, este es un medio de cultivo selectivo y diferencial para este tipo de levadura. Se ha comprobado que es uno de los mejores medios para su aislamiento, además de ser simple de preparar y sin mayores costos (Katiyar *et al* 2011).

Para la preparación de este medio de cultivo, se utilizaron los siguientes elementos:

Extracto de semillas de girasol.....	350 ml
Glucosa.....	1 g
Agar-agar.....	18 g
Cloranfenicol.....	0.05 g
Agua destilada.....	650 ml

Para obtener el extracto de semillas de girasol, se utilizó 70 g de semillas de girasol con cáscaras molidas (molidas en un molino de nixtamal industrial), luego se agregaron 350 ml de agua destilada. Esto se calentó en un “Hot Plate” hasta la ebullición. Luego, se filtró a través de una gasa estéril, descartando el material sólido.

El extracto de semillas de girasol (350 ml), la glucosa, el cloranfenicol y el agar-agar se colocaron en un Erlenmeyer con 650 ml de agua destilada y, nuevamente en el “Hot Plate” se calentó hasta la ebullición. Posteriormente, el medio se autoclavó por 15 minutos a 121 °C. Se vertieron aproximadamente 20 ml del medio en cajas Petri y se refrigeró.

5.3.2 Siembra inicial

Para este procedimiento, se siguió la metodología que se detalla en parte en Ayala de Chavarría *et al* (2011). Se colocaron las excretas en un frasco con 30 ml de solución salina 0.85%. Luego, se colocó en un “Hot Plate”, utilizando únicamente la función del “Magnetic Stirrer”. Se revolvió por 10 minutos y se dejó sedimentar.

Posteriormente, se tomó 1.0 ml del sobrenadante y se diluyó en otro frasco que contenía 9 ml de solución salina 0.85%, y se tomó 0.1 ml con una micropipeta y se colocó sobre el Agar Semilla de Girasol y se expandió sobre el medio con una espátula de Driglaski (conocida también como espátula en L) (Fig. 11). Por cada muestra se sacaron dos cajas Petri, es decir, de la dilución 1 en 9, se tomó 0.1 ml dos veces. Luego, se incubó a 37 °C de 3 a 7 días.

En este medio se esperaba observar el crecimiento de colonias brillantes u opacas, cremosas, de color marrón, que son presuntivas de *C. neoformans*.



Figura 11. Siembra de *Cryptococcus neoformans* en Agar Semilla de Girasol en la cámara de flujo laminar.

5.3.3 Segunda siembra

Las colonias sospechosas que crecieron en el Agar Semilla de Girasol, se resembraron de nuevo en cajas Petri con Agar Semilla de Girasol, para obtener un cultivo puro.

5.3.4 Suspensión en Lactofenol Azul Algodón

Con las colonias que crecieron en este segundo cultivo en Agar semilla de Girasol se preparó una suspensión con Lactofenol Azul Algodón. Para preparar esta suspensión se agregó una gota de Lactofenol Azul Algodón sobre un portaobjetos y se tomó una muestra de la colonia sospechosa con un asa microbiológica, se colocó en un cubreobjetos y se observó al microscopio hasta llegar a 40x. Se pretendía observar levaduras capsuladas, características del género *Cryptococcus* (Ayala de Chavarría *et al* 2011).

5.3.5 Siembra en Agar Glucosado Sabouraud

Se tomaron muestras de colonias del segundo cultivo en Agar Semilla de Girasol y se sembraron en tubos de ensayo con Agar Glucosado Sabouraud (Merck) en biselado, utilizando la técnica del estriado con un asa y se incubaron a 28°C (Fig. 12).

Se esperaba ver el crecimiento de colonias beige. A las colonias del Agar Glucosado Sabouraud se les realizó la prueba de Producción de Ureasa.



Figura 12. Siembra de *Cryptococcus neoformans* en Agar Glucosado Sabouraud.

5.3.6 Prueba de Producción de Ureasa

Para la prueba de Producción de Ureasa, se utilizó Agar Urea de Christensen. Se tomó las colonias que crecieron en el Agar Glucosado Sabouraud y se sembraron en el Agar Urea de Christensen. Se incubó a 28°C. Se esperaba observar un cambio del medio de amarillo a rosado-fucsia, lo cual evidenciaría la presencia del género *Cryptococcus neoformans*.

5.3.7 Identificación molecular de *Cryptococcus neoformans*

Las colonias sospechosas se mandaron a la Universidad de Costa Rica (UCR) para la confirmación de la especie.

Para preparar los aislamientos para su envío, se tomó con un asa microbiológica una muestra de la colonia sospechosa que había crecido en el Agar Glucosado Sabouraud, y se colocó en un tubo Eppendorf con un 1.0 ml de solución salina al 0.85% estéril, debidamente rotulado.

En los laboratorios de la Facultad de Micología de la UCR, se inocularon en agar L-dopa (composición: L- asparagina, glucosa, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, tiamina HCl, biotina, L-dopa, agar y agua destilada; pH final de 5.6), Agar Urea (composición: peptona, NaCl, glucosa, KH_2PO_4 , rojo de fenol como indicador, urea, agua destilada y agar; pH final de 6.8) y agar CGB (Canavanina-Glicina Azul de Bromotimol).

La identificación a nivel de especie se realizó, primeramente, con el API® 20C AUX (BioMérieux, Francia). Este equipo logra discriminar entre las distintas especies de *Cryptococcus*; sin embargo, en el caso de las especies del complejo *C. neoformans/C. gattii*, ambas son identificadas como *C. neoformans*. Por lo tanto, las levaduras que el API® 20C AUX identificó como *C. neoformans* fueron inoculadas en agar CGB (composición: glicina, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, tiamina HCl, L-canavanina sulfato, agua destilada, azul de bromotimol y agar; pH final de 5.6).

5.3.8 Caracterización genotípica de los aislamientos de *Cryptococcus neoformans*

Para llevar a cabo la caracterización genotípica se realizó una extracción de ADN mediante choque térmico. Para esto se tomó cinco asadas de levaduras crecidas en Agar Glucosado Saboroud y se colocaron en un tubo de 1.5 mL con 500 μL de agua destilada estéril. Se realizaron tres ciclos de incubación a distintas temperaturas bajo las siguientes condiciones: 5 minutos a 100 °C y 15 minutos a -70 °C. Luego se centrifugó el tubo durante 5 minutos a 12 000 rpm. El sobrenadante se almacenó a -20 °C durante un máximo de 24 horas.

Posteriormente, se realizó una tipificación mediante la técnica de restricción enzimática del gen URA5, con las enzimas Sau96I y HhaI (Escandón et al., 2006). La amplificación se realizó con los imprimadores URA5 (5' ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC TCC 3') y SJ01 (5' TTA AGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC 3'). Las condiciones de la mezcla para el PCR con un volumen de 50 μL fueron: 50 ng de ADN, 1X de amortiguador de la DreamTaq (KCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 20 mM MgCl_2), 0.2 mM de la mezcla de nucleótidos, 50 ng de cada imprimador y 1.5 U de la DreamTaq polimerasa (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Se llevó a cabo en 35 ciclos de amplificación: desnaturalización inicial 91 °C por 3 minutos, desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, alineamiento a 62 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 2 minutos y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 minutos (Meyer et al., 1993). 17 μL del producto de PCR fueron digeridos con las enzimas Sau96I (10 U/ μL) y HhaI (20 U/ μL). La restricción se realizó a 37 °C durante toda la noche en baño de María.

Las digestiones se corrieron en geles de agarosa al 2.5 % con buffer TAE a 80 V durante 3.5 horas. Los geles se tiñeron con Gelred y se visualizaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta.

El perfil de restricción se comparó, visualmente, contra el de las cepas de referencia empleadas como controles de los patrones moleculares VNI- VNIV y VGI-VGIV que se describen a continuación:

Tabla 5. Cepas del complejo *C. neoformans/C. gattii* del Hospital Westmead, Australia utilizadas como control en las pruebas moleculares.

Código de la colección de hongos vivos del Hospital Westmead	Especie	Patrón molecular
WM 148	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNI
WM 626	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNII
WM 629	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VNIV
WM 628	<i>C. neoformans</i> híbrido	VNIII
WM 179	<i>C. gattii</i>	VGI
WM 178	<i>C. gattii</i>	VGII
WM 161	<i>C. gattii</i>	VGIII
WM 779	<i>C. gattii</i>	VGIV

5.4 Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos se tabularon en hojas electrónicas del programa Microsoft Excel, para el análisis y presentación de los datos se utilizó este mismo programa, R y Geogebra. Para establecer la normalidad de los datos, se hizo uso de la prueba de normalidad de Shapiro.

5.4.1 Presencia de *Cryptococcus neoformans*

Se probaron las hipótesis que la presencia de *C. neoformans* es menor, igual o mayor al 50% en las muestras analizadas, a través de una prueba de proporciones. El objetivo de esta prueba es evaluar las afirmaciones con respecto a una proporción (o porcentaje) de la población. Dado que no existe un estándar del porcentaje aislado de esta levadura en heces de paloma de castilla (el porcentaje aislado varía en cada estudio), se optó por tomar la probabilidad de la presencia de esta levadura en un 50%.

Se buscó un valor Z teórico (Z_{tabla}), utilizando una tabla Z obtenida de Canavaos (1988), y se comparó con el valor Z_0 , el cual fue obtenido mediante una fórmula con valores que se obtuvieron durante el estudio. Para obtener el valor de Z_{tabla} , se necesita establecer un nivel de significancia. Para este estudio, se estableció un nivel de significancia de 0.05.

Este valor se busca en una tabla de la normal estándar; una vez que se encuentra se busca el correspondiente valor de Z (en forma horizontal), y a este se le suma el valor que está arriba del valor de 0.05. Dado que la hipótesis nula incluye el igual o mayor que, esta prueba es de una cola, esto significa que el área de rechazo es a la izquierda del valor de Z_{tabla} . Si el valor de Z_0 es menor al de Z_{tabla} , se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, dado que un número menor se ubicaría a la izquierda del valor de Z_{tabla} . Si el valor de Z_0 es mayor al de Z_{tabla} , se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alternativa.

Para obtener el valor de Z_0 , se utilizó la siguiente fórmula:

$$Z = \frac{x - nP_0}{\sqrt{nP_0(1 - P_0)}}$$

Donde

x = observaciones positivas

n = observaciones totales

P_0 = proporción teórica

5.4.2 Relación entre el número de palomas y la presencia de *Cryptococcus neoformans*

Para determinar si existe una relación entre el número de palomas y la incidencia de la levadura, fue necesario llevar a cabo una estimación del número de palomas por cada sitio de estudio. Para esto, se utilizó una metodología similar a la utilizada por Senar *et al* (2009), la cual consistió en caminar lentamente por todo el parque o plaza, contando una por una todas las palomas observadas. Este autor utilizó cuadrículas, pero esto no fue necesario de hacer ya que cada parque o plaza se tomó como una cuadrícula. En ocasiones cuando las palomas se congregaban para alimentarse se tomó una fotografía para luego ser contadas en una computadora, o se utilizaba una combinación de ambos procedimientos (conteo y estimación a través de fotografías). La mayoría de observaciones y estimaciones se hicieron en el transcurso de la mañana (8:00 a. m. a 12:00 p. m.).

Para refutar la hipótesis, se utilizó una correlación de Spearman (dado que los datos no eran normales), para esta prueba se tomó un nivel de significancia de 0.05. Se elaboró un diagrama de dispersión de datos, y se calculó el coeficiente de correlación de Spearman.

Este coeficiente va desde -1 a 1, si el valor del coeficiente es cercano a 1 la relación o asociación es lineal positiva, si el valor del coeficiente es cercano a -1 la relación o asociación es lineal negativa y, si el valor del coeficiente es cercano a cero no hay relación o asociación lineal (Bonilla, 1993).

6. RESULTADOS

Se muestrearon 11 sitios de 8 departamentos de El Salvador, de cada sitio se tomaron 6 muestras. Se analizaron un total de 66 muestras, de las cuales se aislaron 8 colonias (Tabla 5). Estas 8 colonias dieron positivo a las pruebas realizadas (de morfología y de producción de Ureasa).

Tabla 6. Muestras positivas por sitio de estudio.

Parque/Plaza	Muestras recolectadas	Muestras positivas
Libertad	6	0
Cívica	6	2
Gerardo Barrios	6	0
Daniel Hernández	6	0
San Martín	6	0
El Calvario	6	2
Catedral Santa Ana	6	0
Rafael Campos	6	1
Central de Usulután	6	2
Parque Guzmán	6	1
Central de Suchitoto	6	0
Total	66	8

En el Agar semilla de Girasol, después de 3 ó 4 días de incubación a 37°C, se observó el crecimiento de colonias aisladas color café (Fig. 13). Estas colonias eran consideradas presuntivas de *C. neoformans*. De estas colonias se hicieron preparaciones al fresco utilizando Lactofenol Azul Algodón, para observar las levaduras capsuladas al microscopio (Fig. 14)

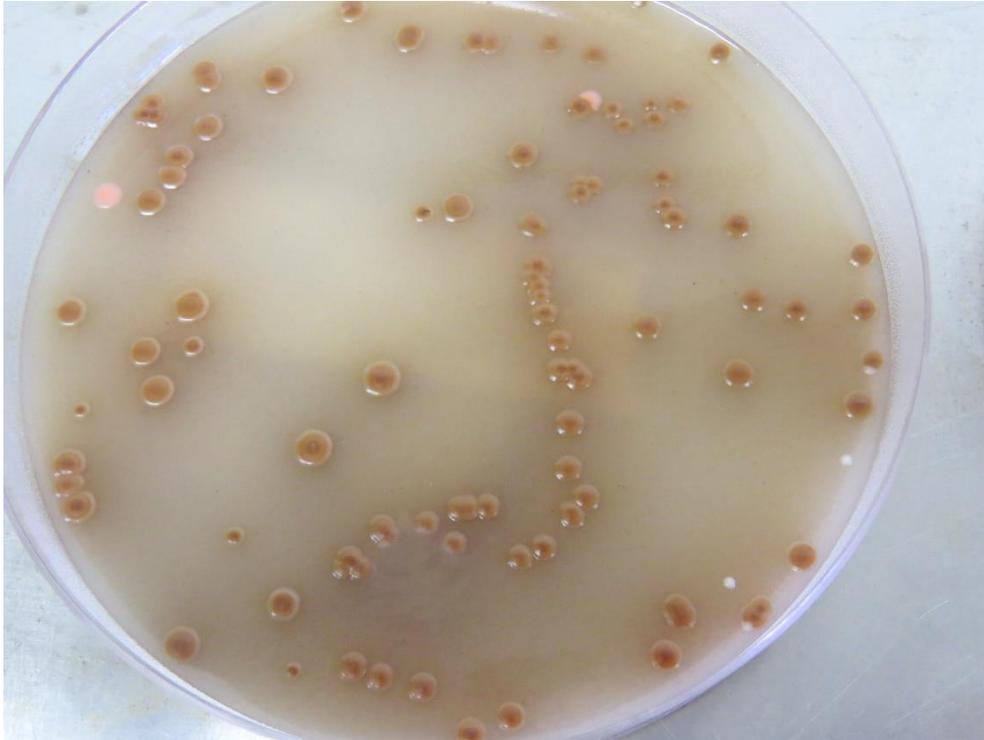


Figura 13. Colonias cafés en Agar Semilla de Girasol, presuntivas de *C. neoformans*.

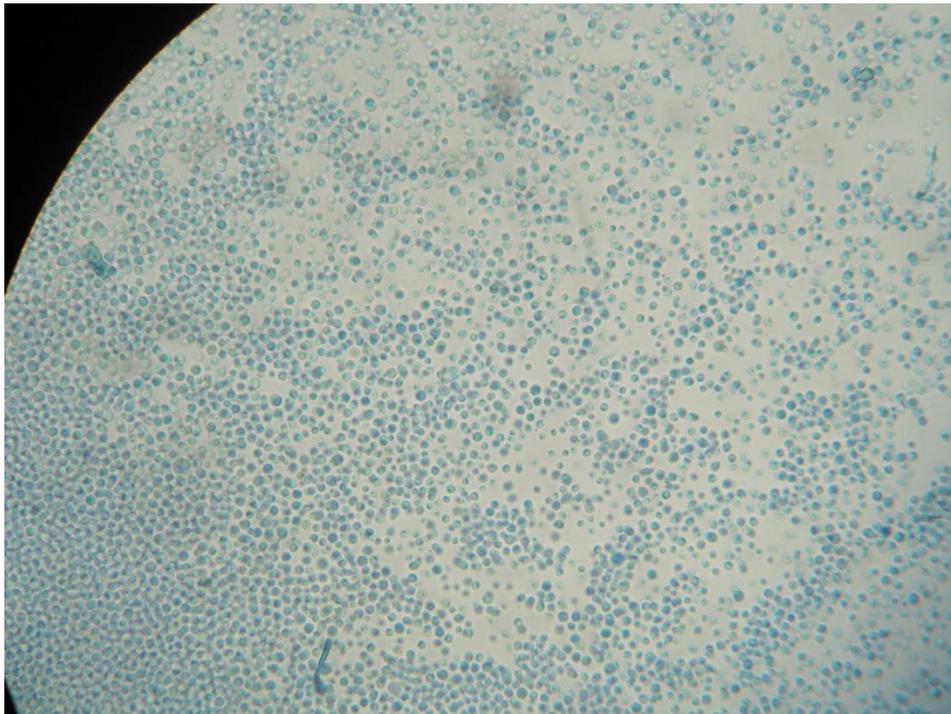


Figura 14. Vista al microscopio de levaduras encapsuladas, característica morfológica de *C. neoformans*.

De las colonias cafés se realizó un repique: con un asa microbiológica se tomó parte de las colonias cafés y se realizó un estriado en una nueva placa de Agar Semilla de Girasol para tener un cultivo puro. De las colonias cafés que crecieron en esta nueva placa, se obtuvo una muestra de ellas y se sembraron en los tubos con Agar Glucosado Sabouraud. En este medio se observó, tal como se esperaba, el crecimiento de colonias beiges (Fig. 15).



Figura 15. Crecimiento de colonias beige de *Cryptococcus neoformans* en Agar Glucosado Sabouraud.

De las colonias que crecieron en el Agar Glucosado Sabouraud, se tomó nuevamente una muestra con un asa microbiológica y se inoculó en tubos con Urea de Christensen. Se observó un viraje de color en el medio, de amarillo a rosado-fucsia, indicativo que la levadura se trataba de *C. neoformans* (Fig. 16).



Figura 16. A la izquierda se observa el color del medio original de Urea de Christensen, y a la derecha el medio después de la inoculación de *Cryptococcus neoformans*.

De las 8 colonias enviadas a los laboratorios de la UCR, 3 dieron positivo para el agar L dopa y para el Agar Urea y negativo para el agar CGB, lo que confirmó que estos 3 aislados se trataban de *C. neoformans*. Las muestras confirmadas eran las muestras 39, 45 y 58 (ver Tabla 6). Utilizando restricción enzimática, fue posible conocer el tipo molecular de las 3 muestras confirmadas, las cuales presentaron patrón de restricción de VNI (muestras 39 y 45) y VNII (muestra 58). Estos son uno de los 8 tipos moleculares conocidos del complejo *C. neoformans/gattii* y ambos pertenecen a la variedad *grubii* (Fig. 17).

Tabla 7. Detalle de resultados de pruebas e identificación molecular.

No. muestra	Plaza/parque	Colonias en Agar Semilla de Girasol	Colonias en Agar Glucosado Sabouraud	Viraje a morado en Urea de Christensen	Confirmación molecular
39	Cívica	Cafés	Beiges	Si	+
40	Cívica	Cafés	Beiges	Si	-
45	El Calvario	Cafés	Beiges	Si	+
56	El Calvario	Cafés	Beiges	Si	-
58	Rafael Campos	Cafés	Beiges	Si	+
59	Central de Usulután	Cafés	Beiges	Si	-
61	Guzmán	Cafés	Beiges	Si	-
65	Central de Usulután	Cafés	Beiges	Si	-

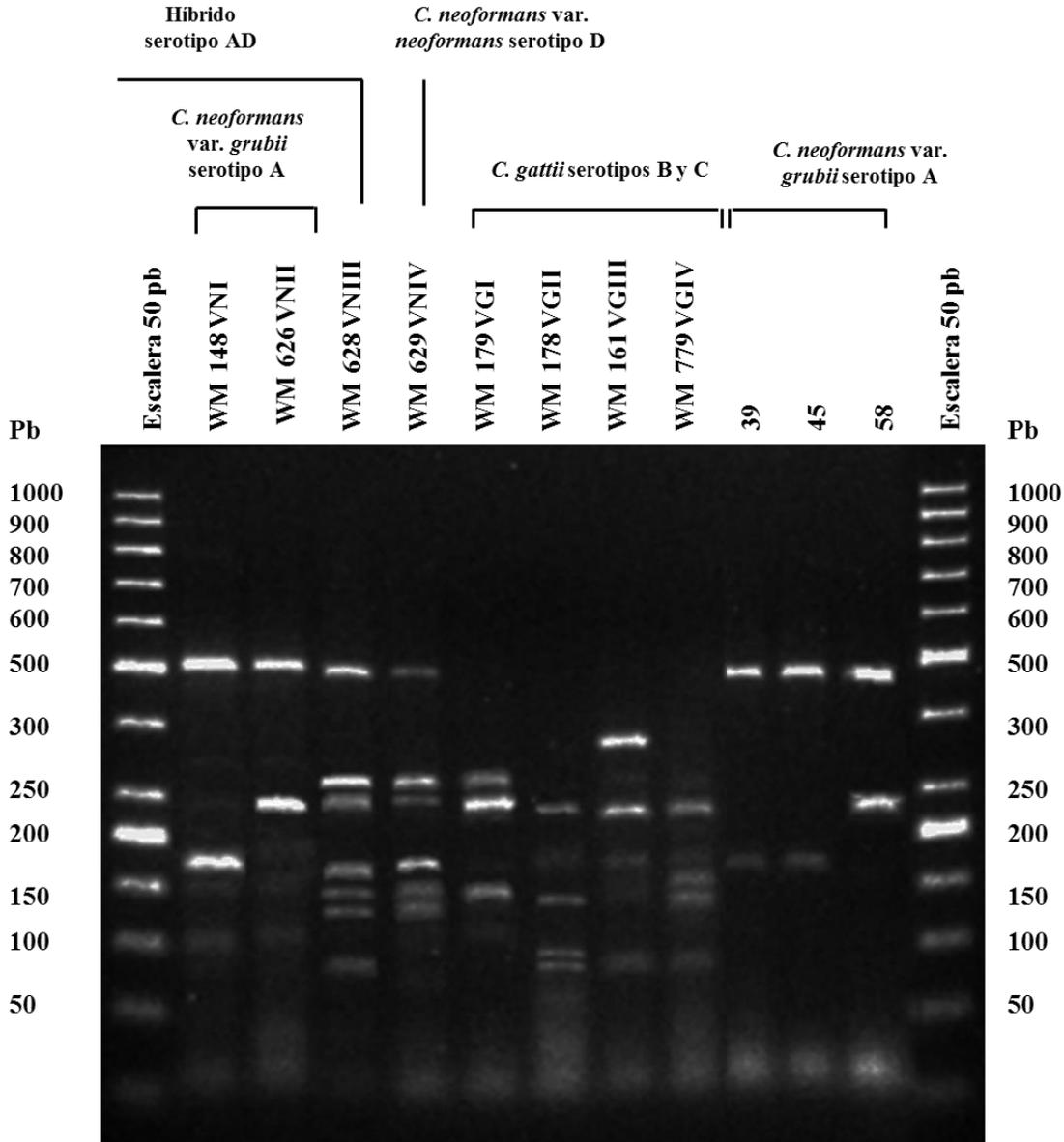


Figura 17. Genotipos del complejo *C. neoformans/C. gattii* y las muestras 39, 45 y 58, detectados según la restricción enzimática del gen *URA5*. WM = Hospital Westmead; VG = variante *gattii*; VN = variante *neoformans*. Marcador de peso molecular (GeneRuler 50 pb DNA Ladder, Thermo Scientific®).

Dado que las 8 colonias aisladas dieron positivos para las pruebas realizadas en el país, se tomaron como *C. neoformans* las 8 colonias (aunque a nivel molecular solo se confirmaron 3). En términos de porcentaje solo 12% de las muestras analizadas dieron resultados positivos (Fig. 18). De los 11 sitios estudiados, en 5 se encontraron muestras con *C. neoformans*. Estos sitios fueron: Plaza Cívica (La Paz), Parque El Calvario (Santa Ana), Parque Rafael Campos (Sonsonate), Parque Central de Usulután y Parque Guzmán (San Miguel).

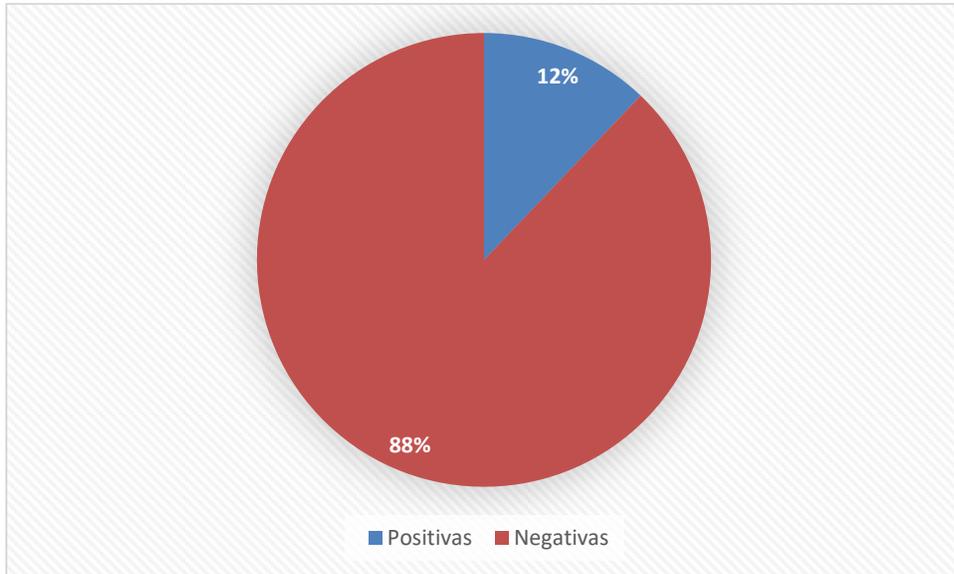


Figura 18. Porcentaje de muestras positivas y negativas.

El Parque El Calvario, Plaza Cívica y en el Parque Central de Usulután fueron los sitios donde se encontró una mayor cantidad de muestras con *C. neoformans*: 2 en cada sitio. En el Parque Rafael Campos y el Parque Guzmán solo en una muestra se encontró la levadura (Fig. 19).

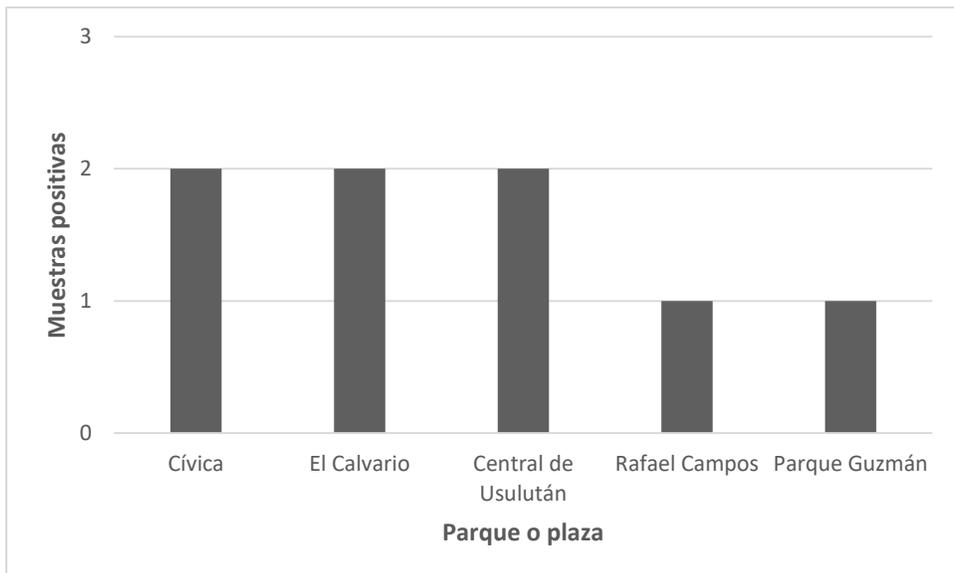


Figura 19. Muestras positivas a *Cryptococcus neoformans* por sitio de estudio.

En cuanto a la prueba de proporciones, el valor de Z_{tabla} es de -1.65, y el valor obtenido mediante la ecuación es -6.15. Este valor se ubica en la zona de rechazo, dado que está a la izquierda -1.65, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa que enuncia que la de *C. neoformans* en las muestras analizadas es menor al 50%. En la Fig. 20, se puede ver la curva de la normal, y la zona de rechazo sombreada. Al haber solo 8 muestras positivas de 66 (12%), el valor obtenido de Z_0 (-6.15) es muy bajo, que ni siquiera puede ser ubicado en el gráfico dado que la recta termina en -4.5.

El valor de p fue de $3.764e-10$, el cual es extremadamente bajo debido a la poca proporción positiva en relación al total de muestras analizadas. El hecho que se haya obtenido un valor menor que 0.05, lleva también a rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa ($n= 66$, $X^2= 37.879$, p valor= $3.764e-10$).

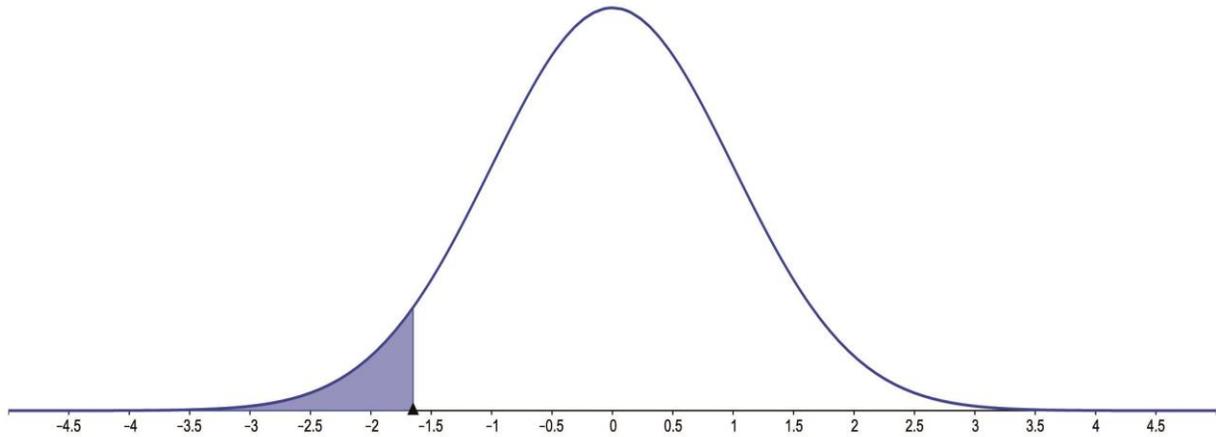


Figura 20. Curva de la normal con la zona de rechazo sombreada que empieza desde -1.65 hacia la izquierda.

De la estimación del número de palomas por sitio de estudio, se obtuvo que el máximo número estimado de palomas fue de 485 en el Parque Gerardo Barrios en San Salvador. El mínimo fue de 25 en el Parque Guzmán del departamento de San Miguel. En promedio, el Parque Gerardo Barrios en San Salvador, también presentó en valor más alto con 369 palomas en promedio. El Parque San Martín en Santa Tecla, presentó el promedio de palomas más bajo con 59 palomas (fig. 21).

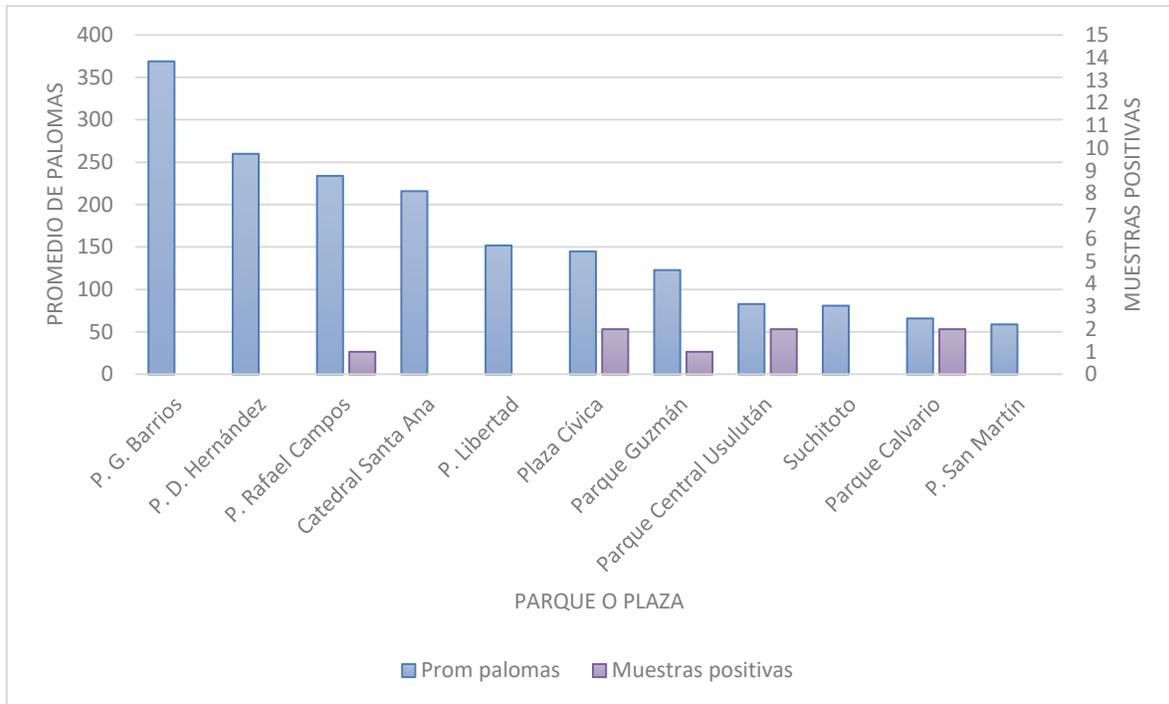


Figura 21. Promedio de palomas y muestras positivas encontradas por sitio de estudio.

La Fig. 21 muestra también una tendencia de encontrar mayor incidencia de *C. neoformans* en lugares con pocas palomas. En los lugares con grandes números de palomas no se encontró a dicha levadura. Esto también se ve reflejado en el gráfico de dispersión (Fig. 22), en el cual se observa una relación negativa entre ambas variables. Al obtener el coeficiente de relación de Spearman para las variables promedio de número de palomas y muestras positivas se obtiene un valor de -0.31. La prueba de Shapiro se realizó en la variable respuesta (muestras positivas), dando un valor de p extremadamente bajo, indicando que esta variable no tenía una distribución normal ($n= 66$, $W = 0.38158$, $p \text{ valor}= 3.506e-15$).

El valor de p de la correlación de Spearman es de 0.45. Con estos resultados se acepta la hipótesis nula que afirma que no hay una relación positiva entre el número de palomas y la presencia de *C. neoformans* en los sitios de estudio y se rechaza la hipótesis alternativa que enuncia que hay una relación positiva entre ambas variables ($n= 33$, $S = 8084.9$, $p \text{ valor}= 0.451$).

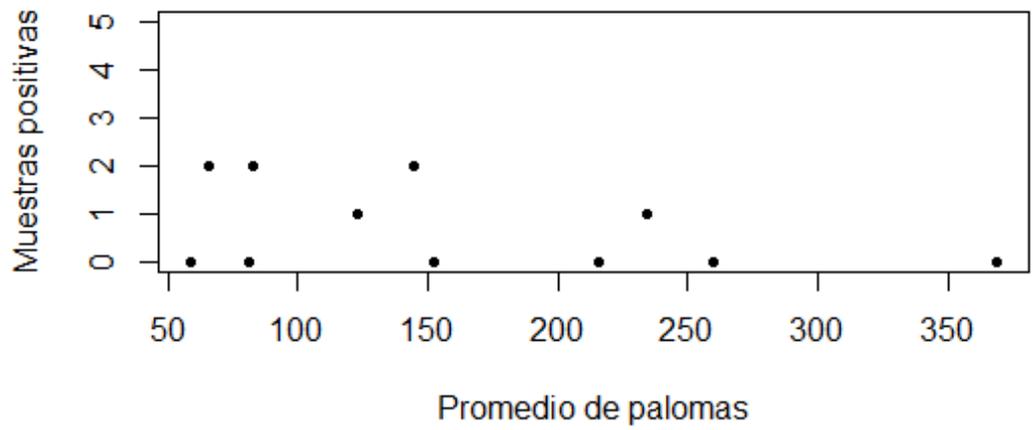


Figura 22. Diagrama de dispersión de la variable muestras positivas comparadas con el número promedio de palomas por sitio de estudio.

7. DISCUSIÓN

9.1 Genotipo de *Cryptococcus neoformans*.

Los hallazgos de este estudio concuerdan con el hecho que la variedad denominada *grubii* (VNI y VNII), es la variedad de *C. neoformans* que más prevalece en el ambiente. Fue esta la variedad que se aisló con mayor frecuencia en un estudio que analizó muestras de varios países de América Latina; en Guatemala 93.3% de las muestras de *C. neoformans* analizadas pertenecían a esta variedad y en México, 69.6% de los aislados eran de esta variedad (Meyer *et al* 2003). Su relevancia en materia de salud pública es que esta variedad es la causante de la mayoría de casos de criptococosis en el mundo, y de la mayoría de las criptococosis en pacientes con SIDA (Ellis *et al* 2000, Meyer *et al* 2003, Cattana *et al* 2013).

9.2 Porcentaje de aislamiento de *Cryptococcus neoformans* y factores ambientales determinantes.

Se han llevado a cabo numerosos estudios concernientes a la presencia de *C. neoformans* en lugares públicos de diversas ciudades del continente. Principalmente en aquellos lugares donde se observa una notable presencia de “palomas de castilla” (*C. livia*). En términos de porcentaje, la mayoría de estudios presentan grandes variaciones en los porcentajes de muestras positivas.

En este estudio, en 12% de las muestras se encontró dicha levadura. Este resultado es comparable con estudios como el de Curo *et al* (2005) en Perú, quienes evidenciaron la presencia de *C. neoformans* en 17 de 124 muestras (13.7%), y el de Nweze *et al* (2015) en Nigeria, quienes aislaron *C. neoformans* en 39 de 177 (22%). En el estudio llevado a cabo en el país por docentes de la Universidad de El Salvador (Ayala de Chavarría *et al* 2011), se aisló *C. neoformans*, en 36.5% de las muestras. Sin embargo, teniendo en cuenta que hay estudios donde el porcentaje de aislamiento es bajo; desde solo el 5% (Canonico-Gonzalez *et al* 2013) hasta el 79.3% (Colom *et al* 1997), es de tener en cuenta factores importantes al comparar estos estudios, como la metodología y los lugares de donde se obtuvieron las muestras de heces de “palomas de castilla” (*C. livia*).

En el caso del estudio de Ayala de Chavarría *et al* (2011), los autores analizaron muestras provenientes de lugares públicos como parques, iglesias, edificios y hospitales, y también muestras provenientes de nidos de palomas. Todas las muestras analizadas provenientes de nidos resultaron positivas. En el presente estudio no se analizaron muestras provenientes de nido, los cuales tienen heces acumuladas, que tienen más probabilidades de estar contaminadas con *C. neoformans*, que muestras provenientes de suelo o aceras (Caecido *et al* 1996, Prescott *et al* 2002, Curo *et al* 2005, Ayala de Chavarría *et al* 2011).

Todas las muestras obtenidas en el presente estudio fueron del suelo, o repisas de monumentos y/o estructuras de los parques y plazas. Estudios con alto porcentaje de aislamiento de *C. neoformans* han obtenido muestras de palomas enjauladas donde las heces se acumulan, como el de Colom *et al* (1997), que encontraron *C. neoformans* en 73 de 92 muestras analizadas (79.3%); 72 de las cuales provenían de heces de aves enjauladas. De igual manera, Caecido *et al* (1996) encontraron a esta levadura en 59 de 119 muestras analizadas (49.5%); estos autores recolectaron muestras tanto de lugares de percha y de nidos, aislando la levadura con mayor frecuencia en las muestras de los nidos. El objetivo de este estudio fue examinar las heces de “palomas de castilla” (*C. livia*), que se encontraran más cerca de las personas que visitan los parques y plazas públicas, por esa razón no se tomaron muestras de nidos.

El piso (o superficies expuestas) de los parques y plazas que reciben buena radiación solar, como la mayoría de los sitios muestreados en el presente estudio, son poco propicios para que en las heces de paloma se desarrolle *C. neoformans*. En un estudio llevado a cabo por Quinteros *et al* (2005), se encontró que 88% de las muestras positivas con *C. neoformans* se aisló de pisos que presentaron temperaturas entre 12 y 18 °C.

Otro factor igualmente importante es la frecuencia con la que se limpian dichos lugares. Los datos obtenidos, reflejan que los 5 parques y/o plazas de los cuales se obtuvieron muestras de heces, en las cuales se pudo evidenciar presencia de *C. neoformans*, son en su mayoría del interior del país (Fig. 18). Estos sitios (a juzgar por la cantidad y condiciones de las heces de paloma y del estado general del parque) no son limpiados tan frecuentemente como las plazas/parques de ciudades céntricas como San Salvador y Santa Tecla. Si un parque o plaza es limpiado frecuentemente, no hay lugar para la acumulación de heces de paloma y, consecuentemente, la probabilidad del desarrollo de *C. neoformans* es mucho menor. Los factores ambientales y limpieza llevada a cabo en algunos parques ayudan a explicar el hecho que solo en 8 de 66 muestras (12%) fue posible encontrar a esta levadura, un porcentaje de aislamiento mucho menor al 50% (Fig. 18 y Fig. 20).

9.3 Relación entre el número de palomas y la presencia de *Cryptococcus neoformans*

En el presente estudio no se encontró una relación positiva entre el número de “palomas de castilla” (*C. livia*) y la presencia de *C. neoformans*. Se esperaba que, a mayor número de palomas, más serían las muestras de heces de esta paloma donde se encontrara a dicha levadura, pero los datos sugieren que, al menos en los sitios de estudio, existe una relación negativa entre ambas variables, el coeficiente de variación fue de -0.31; de acuerdo con este resultado, entre más palomas menos es la incidencia de *C. neoformans*, y entre menos palomas, mayor es la incidencia de la levadura.

Sin embargo, la presencia o no de *C. neoformans*, no parece estar limitada a la abundancia de palomas en un parque o plaza pública; a pesar que un estadístico nos diga que a más palomas no hay presencia de esta levadura (o viceversa), se tiene que considerar otros factores fundamentales. En las plazas/parques de ciudades céntricas como San Salvador y Santa Tecla, a pesar de tener los mayores números de palomas, no se encontró evidencia de la presencia de la levadura. Los sitios de estas dos últimas ciudades estaban bien iluminados, y tienen regímenes de limpieza más constantes y estrictos.

En dichos parques siempre se observaban cuadrillas de limpieza, y cuando fue posible, se indagó que tan frecuente eran limpiados eran los parques. Los parques de San Salvador y Santa Tecla eran limpiados al menos dos veces diarias de lunes a viernes, por lo que, a pesar de tener en promedio 369 y 260 palomas respectivamente (Fig. 21), no se encontraron heces con *C. neoformans*. En algunos parques del interior del país no fue posible saber los horarios de limpieza, pero algunos eran limpiados ocasionalmente durante la semana.

Fue notable el caso del Parque El Calvario en Santa Ana, que está casi en abandono. En la estructura central de dicho parque se encontró abundante material fecal de paloma (Anexo 8) debido a la falta de limpieza. A esto se suma el hecho que en el parque hay poca incidencia de los rayos de sol debido a los frondosos árboles que no son podados (Anexo 9). Esto explica porque en este sitio se encontraron 2 muestras con *C. neoformans*, a pesar que se estimó un promedio de tan solo 66 palomas (Fig. 20). Una situación parecida se observó en los parques de Usulután (Parque Central de Usulután) y Plaza Cívica, Zacatecoluca (La Paz). Estos parques y plazas aparentemente se limpiaban de manera regular, sin embargo, sitios específicos en dichos lugares que no eran limpiados adecuadamente, dando lugar a la acumulación de heces (Anexos 10).

Como se expuso anteriormente, la presencia de *C. neoformans*, es más frecuente en lugares con condiciones específicas (donde hay heces acumuladas y estas están bajo la sombra o poca radiación solar). En el presente estudio, *C. neoformans* se encontró en Plaza Cívica, Parque El Calvario, Parque Rafael Campos, Parque Central de Usulután y Parque Guzmán; en los cuales el denominador común era precisamente la presencia de heces acumuladas (debido a la poca limpieza), de “palomas de castilla” (*C. livia*), y poca iluminación. Se ha demostrado la radiación solar directa, poca humedad, y altas temperaturas afectan negativamente el desarrollo de *C. neoformans* (Ishaq *et al* 1968, Ruiz *et al* 1981, Levitz 1991), por lo que su presencia es una cuestión multifactorial.

Caecido *et al* 1996, encontraron que la presencia de *C. neoformans*, era más común en lugares donde había al menos 15 palomas, pero como se ha mencionado anteriormente, el número de palomas no es el único factor que determina la presencia de esta levadura. Si bien es cierto en este estudio se encontró a *C. neoformans* en lugares con más de 15 palomas; es probable encontrar a esta levadura en lugares con menos de 15 palomas si las condiciones ambientales son favorables.

A partir de los hallazgos de este estudio, se puede interpretar que *C. neoformans* se desarrollará donde haya heces de “paloma de castilla” (*C. livia*) y en las condiciones ambientales propicias. El número de palomas en los sitios de estudio, no parece estar directamente relacionado con la incidencia de dicha levadura. La premisa fundamental de este estudio no debe de ser que las grandes cantidades de palomas vistas en algunos parques y plazas son inofensivas, sino más bien, si las condiciones están dadas, pocas palomas pueden generar heces suficientes para que esta levadura se desarrolle, representando un problema en materia de salud pública. También, es importante considerar que este estudio se enfocó solo en esta levadura; teniendo en cuenta que esta especie de paloma porta 60 diferentes organismos patógenos a humanos (Haag-Wackernagel & Moch 2004), podría haber una relación positiva más directa con otros organismos patógenos que con *C. neoformans*.

De acuerdo con las estadísticas del MINSAL, San Salvador es el departamento que más casos de criptococosis registra. En este estudio, en ninguno de los parques de San Salvador se encontraron heces con *C. neoformans*. Sin embargo, como se vio anteriormente, las heces acumuladas y en condiciones ambientales óptimas favorecerán el desarrollo de esta levadura patógena, por lo que es probable un buen porcentaje de los casos de criptococosis, sean personas que estén en lugares poco ventilados y cerca de estructuras donde anidan palomas de castilla. Se ha demostrado que las heces de estas palomas, en interiores, protegidas del ambiente, representan un mayor peligro para el humano, dado que estas están más frecuentemente contaminadas con *C. neoformans*, que heces de exteriores expuestas al ambiente (Littman y Schneirson 1958).

8. CONCLUSIONES

- El porcentaje de aislamiento positivo de *Cryptococcus neoformans* en estudio fue mucho menor al 50% esperado. Solo el 12% de las muestras analizadas dio positiva a *C. neoformans*, este bajo porcentaje de aislamiento de la levadura, probablemente se deba a las condiciones ambientales y de limpieza de la mayoría de sitios muestreados: buena radiación solar, altas temperaturas del suelo y poca acumulación de heces; condiciones que van en detrimento del desarrollo de *C. neoformans*. En contraste, los parques y plazas donde se encontró evidencia de la presencia de *C. neoformans*, son por lo general sitios donde las condiciones son favorables para el desarrollo de esta: poca limpieza y relativamente sombreados, lo que favorece la acumulación de heces y poca exposición de la levadura a la radiación solar.
- Los sitios donde se encontró evidencia de la presencia de *C. neoformans* fueron Plaza Cívica, Parque El Calvario, Parque Rafael Campos, Parque Central de Usulután y Parque Guzmán. Estos sitios se localizan en el interior del país, por lo que se supone que poco presupuesto es destinado a la limpieza de basura y heces, y al mantenimiento de estos. Aquellos parques o plazas de ciudades céntricas como San Salvador y Santa Tecla que probablemente destinan más presupuesto para limpieza, a pesar de tener más palomas en promedio, no se encontró heces positivas con dicha levadura. Sin embargo, teniendo en cuenta que 60 diferentes organismos patógenos a humanos están relacionadas a esta paloma, es importante considerar que pueden existir otros organismos que sí se vean favorecidos en esas condiciones particulares.
- A pesar que las pruebas estadísticas de este estudio, reflejan que entre más individuos de “paloma de castilla” (*C. livia*) menos es la incidencia de *C. neoformans* y viceversa; en realidad deberían tomarse en cuenta la rigurosidad de la limpieza del sitio y factores ambientales. De acuerdo con la literatura, las condiciones ambientales podrían ser factor determinante en la incidencia de esta levadura, por lo que se debe de tener especial atención en aquellos lugares sombreados donde las heces se acumulen, y en los nidos de dichas palomas, especialmente si estos se localizan cerca de hospitales y unidades de salud.

- En aquellos departamentos donde se registran más casos de criptococosis según las estadísticas del MINSAL, se debe poner especial atención, ya que es posible que los focos de infección sean en casas o lugares poco ventilados donde estas palomas anidan. Las plazas y parques donde en este estudio se encontró *C. neoformans*, por el contrario, pueden representar un serio riesgo a la salud de personas con defensas bajas, dado que la variedad encontrada, conocida como *grubii*, es la causante de la mayoría de casos de criptococosis en el mundo y es la que se aísla más comúnmente en pacientes con VIH.

9. RECOMENDACIONES

- Las autoridades del Ministerio de Salud y las alcaldías deberían de evitar la acumulación de heces en parques y plazas y principalmente cerca de hospitales y unidades de salud, por medio de una limpieza constante. Los hospitales y unidades de salud deberían de ser vigilados estrictamente para evitar que estas palomas aniden dentro de su infraestructura. Como se sabe, en los nidos es donde hay una mayor incidencia de *C. neoformans*, debido a la acumulación de heces, poniendo en serio riesgo a la salud de personas inmunodeprimidas. Así como también realizar podas en los árboles de los parques para permitir una buena iluminación solar que impida el desarrollo de esta levadura.
- Aunque la constante limpieza de algún parque o plaza disminuya la probabilidad de desarrollo de *C. neoformans*, se debe tener en cuenta los otros 60 organismos que pueden estar relacionados con la “paloma de castilla” (*C. livia*) (otros hongos, bacterias y protozoarios) y que pueden ser un riesgo para la salud pública. Por lo que se debe contemplar un control ético y eficaz de esta paloma en lugares donde hay grandes cantidades, y realizar estudios con estos otros tipos de agentes zoonóticos, y si ven favorecidos o no con las condiciones de parques y plazas públicas.
- Se debe regular la alimentación a palomas por partes de las personas que visitan los parques o plazas. La disponibilidad de alimento es el factor fundamental que hace que las poblaciones de estas aumenten, generando grandes cantidades de heces, aumentando el riesgo de transmisión de enfermedades (especialmente en aquellos sitios donde no se realiza limpieza regularmente) y, causando daños a edificios y monumentos.
- Los equipos de limpieza de parques y plazas que están constantemente expuestos a las heces de estas palomas deberían de utilizar el equipo adecuado como guantes y mascarilla, para evitar una posible infección al tener contacto con heces contaminadas. También se debe de desechar adecuadamente las heces retiradas del suelo, repisas o monumentos, con el fin que no se acumulen y sean propicios para el desarrollo de *C. neoformans*.
- Realizar estudios cuantificando factores ambientales como la radiación solar y la temperatura, para determinar su relación con esta levadura. Así como también si esta levadura crece en heces de otro tipo de aves abundantes en las ciudades o que pueden estar cerca de los humanos como aves de corral y compañías como pericos.

10. BIBLIOGRAFÍA

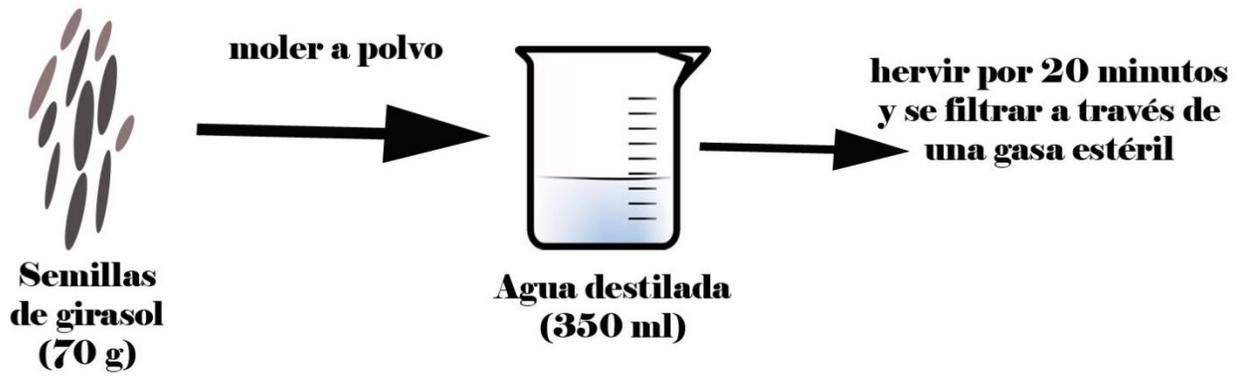
- Acha P. y Szyfres B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Volumen I. Bacteriosis y Micosis. Tercera edición. Organización Panamericana de la Salud.
- Ayala de Chavarría D., Henríquez F. y Recinos R. 2011. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras del ambiente contaminadas con excrementos de palomas en diferentes zonas en El Salvador. *Minerva Revista en Línea CIC-UES*, Vol. 2 (1): 21-27.
- Baró M. 2002. Epidemiología de la Criptococosis en España. Caracterización de los aislados de *Cryptococcus neoformans*. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Bonilla G. 1993. Estadística I elementos de estadística descriptiva y probabilidad, 2ed. UCA Editores, San Salvador, El Salvador.
- Caecido L, Álvarez M, Llanos C. y Molina D. 1996. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas del perímetro urbano de Cali. *Colombia Médica*. 27 (3-4): 106-109.
- Canavaos G. 1988. Probabilidad y estadística, aplicaciones y métodos. McGraw-Hill. Ciudad de México
- Canonico-González Y., Adame-Rodríguez J., Mercado-Hernández R. y Aréchiga-Carvajal E. 2013. *Cryptococcus* spp. isolation from excreta of pigeons (*Columba livia*) in and around Monterrey, Mexico. *Springer plus* 2:632.
- Cattana M., Tracogna M., Fernández M., Carol M., Sosa M. y Giusiano G. 2013. Genotipificación de aislamientos clínicos del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* obtenidos en el Hospital «Dr. Julio C. Perrando», de la ciudad de Resistencia (Chaco, Argentina). *Rev Argent Microbiol* 45(2):89-92.
- Chicas R. 2008. Las enfermedades viajan con las aves. *Revista Comunica En Línea*, Año 5, No. 12.
- Curo M, Salinas M. y Casquero J. 2005. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas, suelo y aire de los palomares del perímetro urbano de Ica. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 22 (4): 262-266
- DIGESTYC (Dirección General de Estadísticas y Censos). 2008. Resultados Oficiales de los Censos Nacionales VI de Población y V de Vivienda 2007. Ministerio de Economía.
- de Lima V., Langoni H., da Silva A., Pezerico S., Barbosa de Castro A., da Silva R. y Araujo J. 2011. *Chlamydophila psittaci* and *Toxoplasma gondii* infection in pigeons (*Columba livia*) from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 175: 9–14.

- Ellis D., Marriott D., Hajjeh R., Warnock D., Meyer W. y Barton R. 2000. Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Medical Mycology* 38, Supplement 1: 173–182.
- Gonzales-Acuña D., Silva G., Moreno S., Cerda L., Donoso E., Cabello C. y López M. 2007. Detección de algunos agentes zoonóticos en la paloma doméstica (*Columba livia*) en la ciudad de Chillán, Chile. *Rev Chil Infect.* 24 (3): 199-203.
- Haag-Wackernagel D. y Moch H. 2004. Health hazards posed by feral pigeons. *Journal of Infection.* 48 (4): 307-313.
- Haag-Wackernagel D. Sin fecha. Culture history of the pigeon. Disponible en: <https://anatomie.unibas.ch/IntegrativeBiology/haag/Culture-History-Pigeon/feral-pigeon-haag.html>.
- Haag-Wackernagel D. 2005. Parasites from feral pigeons as a health hazard for humans. *Ann Appl Biol.* 147: 203–210.
- Isahq C., Bulmer G. y Felton F. 1968. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 35:81-90.
- Johnston R. 1998. Feral Pigeon. *The Kansas School Naturalist.* 45 (2): 1-16.
- Katiyar R., Deorukhkar S. y Saini S. 2011. Comparison of Different Media for the Pigment Production of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* (Suppl-1). 5(6): 1187-1189.
- Koneman E., Winn W., Allen S., Procop G., Janda W., Schreckenberger P. y Woods G. 2008. *Koneman Diagnostico Microbiológico* 6ta ed. Editorial Médica Panamericana.
- Levitz S. 1991. The Ecology of *Cryptococcus neoformans* and the Epidemiology of Cryptococcosis. *Reviews of Infectious Diseases* 13:1163-1169.
- Littman M. y Schneierson S. 1959. *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City. *Am J Hyg* 69: 49-59.
- MARN (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales). Sin fecha. Control, manejo y erradicación de “paloma doméstica” (*Columba livia*, Gmelin 1789) en El Salvador.
- MARN. 1994. Ley de Conservación de Vida Silvestre. *Diario Oficial* No. 96, Tomo No. 323.
- MARN. 2014. Acuerdo 052: Control, manejo y erradicación de “paloma de castilla” (*Columba livia*) en El Salvador.
- Magnino S., Haag-Wackernagel D., Geigenfeind I., Helmecke S., Dovc A., Prukner-Radovic E., Residbegovic E., Ilieski V., Laroucau K., Donati M., Martinov S. y Kaleta

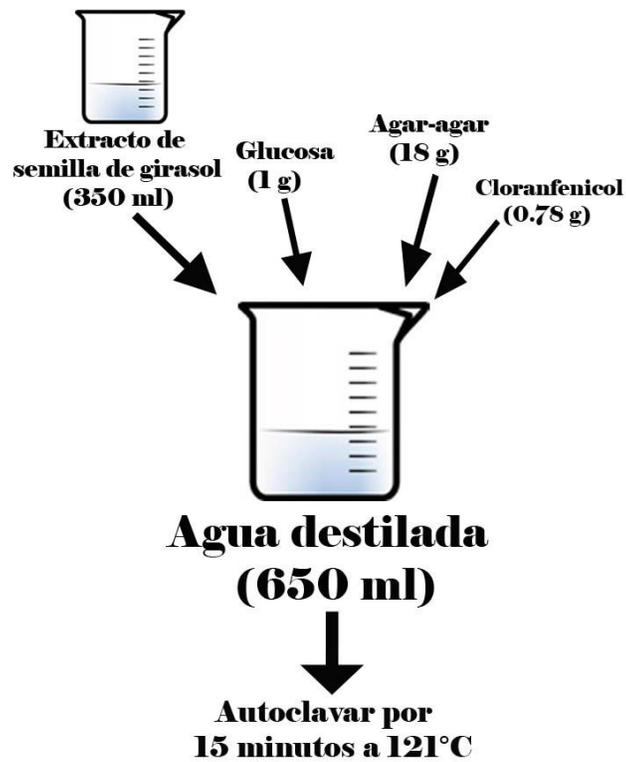
- E. 2008. Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: review of data and focus on public health implications. *Veterinary Microbiology*. 135 (1-2): 1-43.
- Meyer W., Castañeda A., Jackson S., Huynh M., Castañeda E. y el IberoAmerican Cryptococcal Study Group. 2003. Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates. *Emerging Infectious Diseases* 9(2): 189-195.
- MINSAL (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social). 1988. Código de Salud. Diario Oficial No. 149, Tomo No. 404.
- MINSAL. 2014. Casos y muertes por Criptococosis en el periodo de los años del 2009 al 2013 registrados por la red de establecimientos del MINSAL.
- MINSAL. 2017. Consultas de primera vez y subsecuentes por Criptococosis, brindadas en establecimientos de salud del MINSAL, por departamento, años 2012 a 2016.
- Mitchell T. y Perfect J. 1995. Cryptococcosis in the Era of AIDS—100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clinical microbiology reviews* 8 (4): 515–548.
- National Geographic. 1999. Field Guide to the Birds of North America. Third Edition.
- Nweze E., Kechia F., Dibua U., Eze C. y Onoja U. 2015. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from environmental samples collected in southeastern Nigeria. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 57(4): 295-298.
- OMS (Organización Mundial para Salud). 1982. Zoonosis bacterianas y víricas. Informe de un comité de expertos de la OMS, con la participación de la FAO. Serie de informes técnicos.
- Pérez de Salazar C., del Valle Gómez L., Jiménez M., Salazar O., Roselló A., Peña J. y Mata-Essayag S. 2011. Detección de *Cryptococcus* spp. colectado en el polvo y aire de la ciudad de Mérida, Venezuela. *Multiciencias* 11(2): 146-152.
- Pimentel D., Zuniga R. y Morrison D. 2005. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics* 52: 273– 288
- Prescott L., Harley J. y Klein D. 2002. Microbiología, 5ta ed. McGraw-Hill
- Quinteros E., Castañeda E. y Ruiz A. 2005. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca-Colombia. *Rev Iberoam Micol* 22: 93-98.

- Ramírez O., Amador M., Camacho L., Carranza I., Chaves E., Moya A., Vega M., Verdesia J. y Quiros W. 2008. Conocimiento popular de la Paloma de Castilla (*Columba livia*) en el Parque Central de Alajuela. Boletín Zeledonia. 12 (1): 16-19.
- Ruiz A., Fromtling R. y Bulmer G. 1981. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a Natural Site. Infection and immunity 31(2): 560-563.
- Ryan A. 2011. The distribution, density, and movements of feral pigeons *Columba livia* and their relationship with people. Tesis de maestría.
- Senar J., Carrillo J., Arroyo L., Montalvo T. y Percacho V. 2009. Estima de la abundancia de palomas (*Columba livia* var.) de la ciudad de Barcelona y valoración de la efectividad del control por eliminación de individuos. Arxius de Miscel·lània Zoològica 7: 62-71.
- Stiles G. y Skutch A. 2007. Guía de Aves de Costa Rica. 4ed. Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio.
- Terres J. 1995. The Audubon Society Encyclopedia of North American Birds. Wings Books.
- Torgerson P. y Macpherson C. 2011. The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. Veterinary Parasitology. En prensa
- Xavier T., Auxilia A., Kannan M., Rose A. y Senthil S. 2013. Isolation and Identification of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings in Tiruchirappalli district of Tamil Nadu, South India. Int.J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2 (11): 404-409.

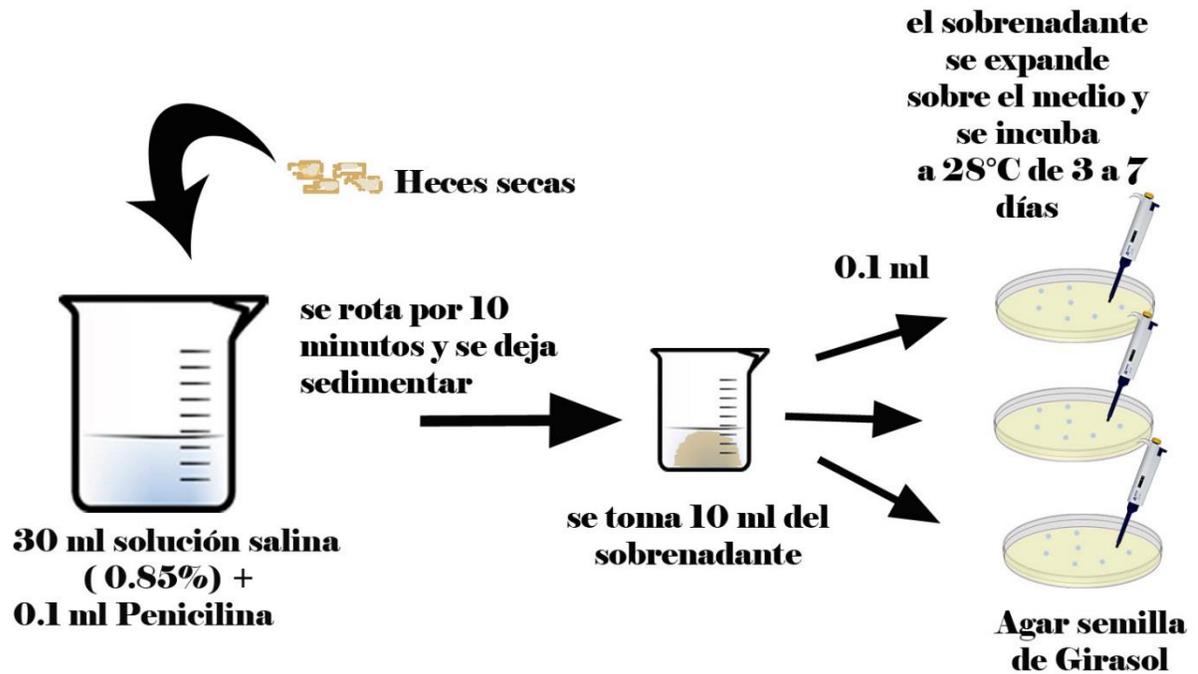
11. ANEXOS



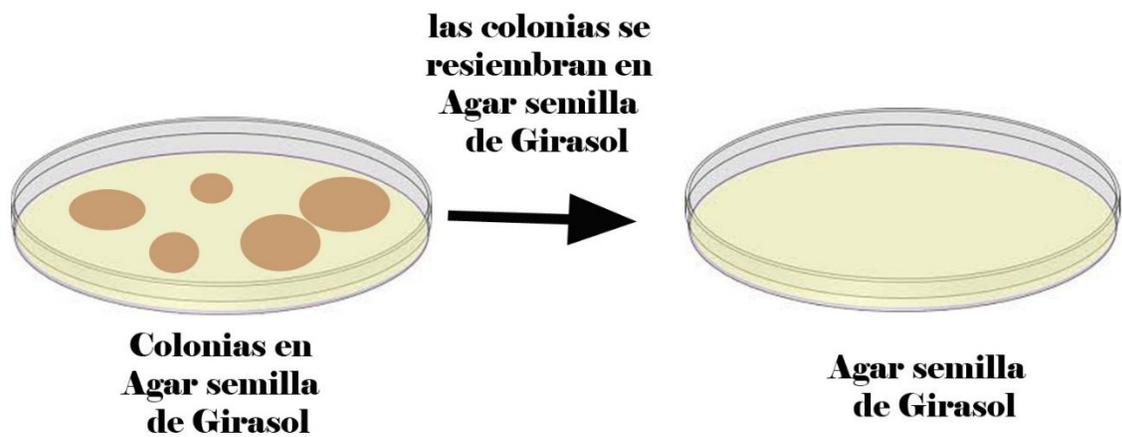
Anexo 1. Preparación del extracto de semilla de girasol. Esquema por: Guillermo Funes, 2018.



Anexo 2. Preparación del Agar Semilla de Girasol. Esquema por: Guillermo Funes, 2018.



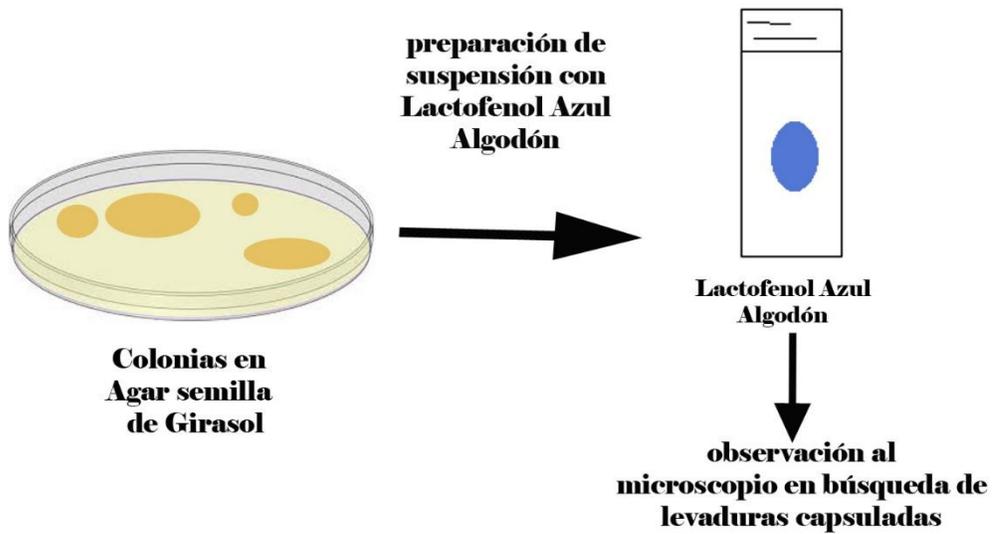
Anexo 3. Colocación de heces en solución salina, y siembra en Agar Semilla de Girasol. Esquema por: Guillermo Funes, 2018.



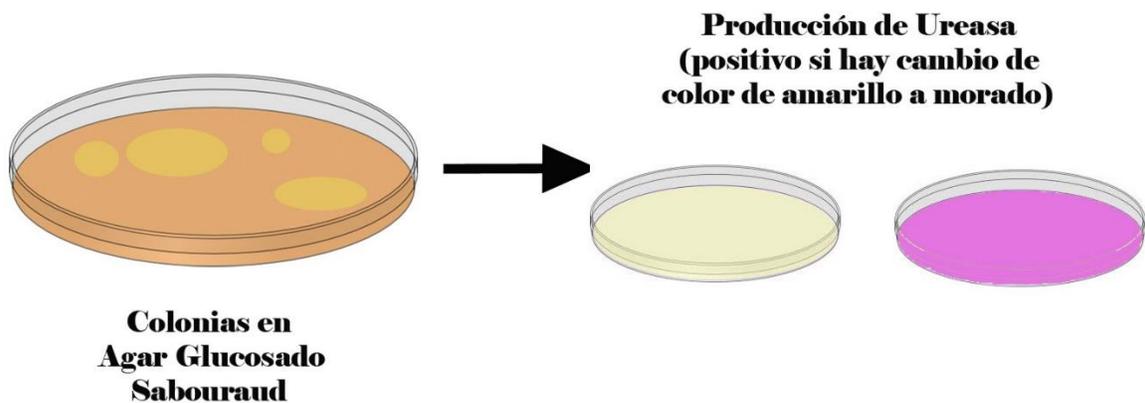
Anexo 4. Resiembra en Agar semilla de Girasol. Esquema por: Guillermo Funes, 2018.



Anexo 5. Siembra en Agar Glucosado Sabouraud. Esquema por: Guillermo Funes, 2018.



Anexo 6. Preparación de suspensiones e Lactofenol Azul Algodón. Esquema por: Guillermo Funes, 2018.



Anexo 7. Siembra en Urea de Christensen. Esquema por: Guillermo Funes, 2018.



Anexo 8. Heces de paloma de castilla acumuladas en el Parque El Calvario Santa Ana. Foto por: Guillermo Funes, 2017.



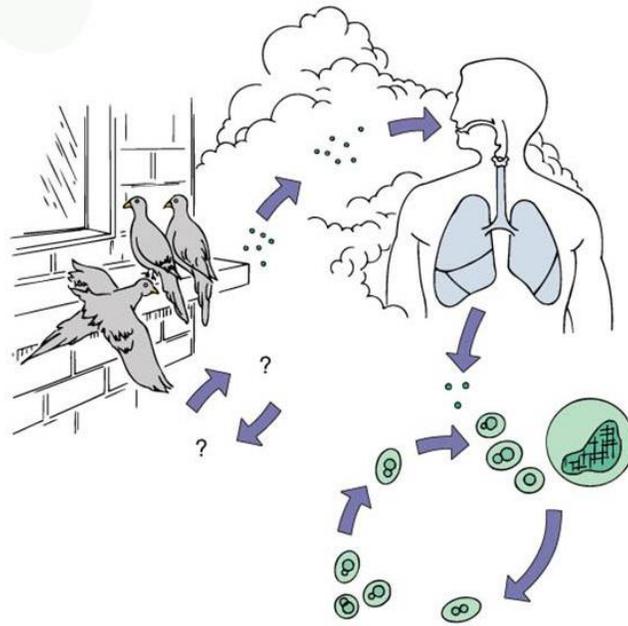
Anexo 9. Parque El Calvario, Santa Ana. Los árboles y la estructura central proveen de sombra; ideal para el desarrollo de *C. neoformans*. Foto por: Guillermo Funes, 2017.



Anexo 10. Heces de paloma de castilla acumuladas en el Parque Central de Usulután. Foto por: Guillermo Funes, 2017.



Anexo 11. Plaza Gerardo Barrios, a pesar de la gran cantidad de palomas de castilla, el suelo recibe buena radiación solar, lo que va en detrimento del desarrollo de *C. neoformans*. Foto por: Guillermo Funes, 2017.



Anexo 12. Ciclo de vida de *Cryptococcus neoformans*. Fuente: <http://slideplayer.com/slide/10687427/>

GLOSARIO

Agente Zoonótico: Microorganismo cuyo reservorio es uno o varios animales; todo parásito, bacteria, virus u organismo que pueda provocar una zoonosis.

Criptococosis: La criptococosis es una infección pulmonar o generalizada que se adquiere a través de la inhalación de tierra contaminada con las levaduras encapsuladas *Cryptococcus neoformans* o *C. gattii*. Los síntomas que produce son los de la neumonía, la meningitis o el compromiso de la piel, los huesos o las vísceras.

Encefalitis: Es la irritación e hinchazón (inflamación) del cerebro, casi siempre debido a infecciones.

Fase anamorfa: fase conídica, imperfecta o asexual en los ascomicetos y algunos basidiomicetos, en la que se producen conidios.

Fase teleomorfa: fase ascógena, perfecta o sexual en los ascomicetos, en la que se producen ascas.

Genotipo: Conjunto de los genes que existen en el núcleo celular de cada individuo.

Enfermedad zoonótica: Una enfermedad zoonótica es una enfermedad que puede transmitirse entre animales y seres humanos. Las enfermedades zoonóticas pueden ser provocadas por virus, bacterias, parásitos y hongos.

Meningoencefalitis: Inflamación simultánea del encéfalo y las meninges debida a una infección vírica o bacteriana.

Organismo patógeno: Organismos, incluidos virus, bacterias o quistes, capaces de causar una enfermedad (tifus, cólera, disentería) en un receptor (por ejemplo una persona)

Restricción enzimática: es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto en concreto, llamado sitio o diana de restricción, o en un sitio no muy lejano a este.

Serotipo: microorganismo que puede causar una infección y que se clasifica de acuerdo a los antígenos que exhibe en la superficie de sus células.