

***Cryptococcus neoformans* en heces de palomas mensajeras y de Castilla (*Columba livia*) en Lima, Perú**

***Cryptococcus neoformans* in faeces of feral and homing pigeons (*Columba livia*) in Lima, Peru**

Ricardo Timmermann F.¹, Siever Morales-Cauti^{1,2,3}, Eglinton Villacaqui A.¹

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas domésticas (*Columba livia*) en lugares públicos de la ciudad de Lima, Perú, en 2015-2016. Se recolectaron muestras de heces secas en palomares de palomas mensajeras criadas en cautiverio y en ambientes públicos de palomas de Castilla. Las muestras fueron procesadas y sembradas en agar Sabouraud dextrosa, e incubadas a 37 °C hasta por 10 días. Las colonias fueron identificadas a través de la evaluación macroscópica, visualización de cápsula con tinta china, prueba de ureasa, asimilación de azúcares, reducción rápida de nitrato, prueba de fenoloxidasas y crecimiento en agar CGB. Se determinó una frecuencia de 5.16% (16/310) de muestras positivas a *C. neoformans* en heces de ambos tipos de palomas evaluadas. En las heces de palomas de Castilla fue de 8.89% (16/180), en tanto que no hubo muestras positivas en las palomas mensajeras. En la simulación estocástica Beta Pert (@Risk 5.5®) se determinó una prevalencia mínima y máxima para el estudio de 4.59 y 5.61%, respectivamente. Se concluye que *Cryptococcus neoformans* se encuentra presente en heces de palomas Castilla en la ciudad de Lima, Perú.

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

¹ Laboratorio de Microbiología, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Científica

versidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ E mail: sieverm@hotmail.com

Artículo derivado de la tesis del Bach. Ricardo Ernesto Timmermann Flores para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista «Presencia de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas mensajeras y de castilla de la ciudad de Lima, Perú»

Recibido: 20 de junio de 2019

Aceptado para publicación: 17 de abril de 2020

Publicado: 29 de septiembre de 2020

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the prevalence of *Cryptococcus neoformans* in faeces of domestic pigeons (*Columba livia*) in public places in the city of Lima, Peru, in 2015-2016. Samples of dried faeces were collected from pigeon lofts from captive-bred racing pigeons and from public places for free-living pigeons. The samples were processed and cultured on Sabouraud dextrose agar and incubated at 37 °C up to 10 days. Colonies were identified through macroscopic evaluation, capsule visualization with Indian ink, urease test, sugar assimilation, rapid nitrate reduction, phenol oxidase test and growth on CGB agar. A frequency of 5.16% (16/310) of positive samples for *C. neoformans* in faeces of both types of pigeons was determined. In the faeces of homing pigeons was 8.89% (16/180), while there were no positive samples in the captive-bred racing pigeons. The stochastic Beta Pert simulation (@Risk 5.5®) a minimum and maximum prevalence for the study of 4.59 and 5.61%, respectively. *Cryptococcus neoformans* is present in the feces of homing pigeons in the city of Lima, Peru.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, pigeon droppings, homing pigeons, feral pigeons

INTRODUCCIÓN

Criptococosis es una enfermedad infecciosa de distribución mundial, producida por el hongo *Cryptococcus*, una levadura encapsulada (Galnares-Olalde *et al.*, 2014). Se reconocen dos especies de *Cryptococcus* que comúnmente causan enfermedades en el humano: *C. neoformans* y *C. gattii* (Menezes *et al.*, 2011; Maziarz y Perfect, 2016). Esta levadura se transmite por vía respiratoria a partir de la inhalación de excretas de aves, principalmente palomas, en áreas urbanas densamente pobladas, afectando animales y personas (Acha y Szyfres, 2001; Galnares-Olalde *et al.*, 2014; May *et al.*, 2015).

Esta enfermedad presenta retos en aspectos como la epidemiología, diagnóstico y terapéutica. Se han identificado múltiples mecanismos de virulencia que permiten a los criptococos infectar, diseminar y finalmente producir la muerte al humano (May *et al.*, 2015). Sin embargo, la criptococosis humana solo se reconoció como una amenaza importante con el inicio de la pandemia del SIDA

en la década del 80, cuando estas infecciones fúngicas se convirtieron en una enfermedad común en pacientes con procesos de inmunosupresión o inmunocomprometidos (Galnares-Oalde, 2014; Firacative *et al.*, 2018).

De manera inicial, se identificaron cuatro serotipos (A, B, C, D), un híbrido AD y ocho subtipos moleculares (May *et al.*, 2016; Maziarz y Perfect, 2016). Posteriormente, debido a las diferencias entre serotipos, se clasificaron como *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *Grubii* (Maziarz y Perfect, 2016) y *C. gattii* (Kwon-Chung *et al.*, 2002). Se le encuentra comúnmente como una levadura encapsulada y redonda en muestras de aire, suelo y heces, aunque también como basidiosporas (Lin y Heitman, 2006).

El hongo no causa enfermedad en humanos inmunológicamente competentes, pero en individuos con compromiso del sistema inmune puede causar neumonía y meningoencefalitis (Kronstad *et al.*, 2011; Galnares-Olalde *et al.*, 2014). La presencia de heces de aves en el suelo incrementa la posibilidad

de inhalar partículas aéreas del hongo (Criseo *et al.*, 1995; Kuroki *et al.*, 2004). *C. neoformans* ha sido aislada en muchos países (Curo, 2005; Cermeño *et al.*, 2006; Lin y Heitman, 2006; Firacative *et al.*, 2018). El presente trabajo tuvo como objetivo el aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas mensajeras y de Castilla (*Columba livia*) en la ciudad de Lima.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El estudio se llevó a cabo entre setiembre de 2015 y enero de 2016 en lugares públicos de la ciudad de Lima, Perú, con abundancia de palomas domésticas (*Columba livia*), tanto de vida libre (palomas de Castilla) como palomas mensajeras. La ciudad se encuentra a una altitud de 150 msnm, en promedio, con temperatura mínima y máxima promedio de 13 y 30 °C, respectivamente y humedad relativa de 88%.

Se ubicaron espacios públicos con abundancia de palomas de Castilla para la colección de heces, que fueron denominados Iglesia 1, 2, 3 y 4, y una granja interactiva «Lugar público 1». Asimismo, las muestras de heces de palomas mensajeras se colectaron en palomares especializados de la Asociación Peruana de Colombófilos (APCO), a los cuales se les denominó como Palomar 1, 2, 3 y 4.

Muestras y Análisis de Laboratorio

Las muestras de heces secas fueron tomadas del suelo y de los nidos de palomas entre octubre de 2015 y enero de 2016. Se tomaron 130 muestras de palomas mensajeras y 180 de palomas domésticas asilvestradas (palomas de Castilla). Se optó por colectar heces secas, considerando que el hongo desarrolla mejor en esas condiciones (Kamari *et al.*, 2017). El número de muestras por espacio público fue calculado por amplitud de área del muestreo: 30, 40, 12 y 30 para la

Iglesia 1, 2 3 y 4, respectivamente, y 68 para Lugar público 1. Para las palomas mensajeras (población finita) fue de 90, 10, 15 y 15 muestras para el Palomar 1, 2, 3 y 4, respectivamente.

Las heces secas (20-100 g) fueron colectadas en bolsas de cierre hermético y transportadas a temperatura ambiente al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Científica del Sur, Lima, donde fueron procesadas con las medidas de bioseguridad respectivas, según la técnica descrita por Cermeño (2006). Para esto, se tomó 1 g de heces por muestra que fue disuelta en 10 ml de solución salina estéril al 0.85%, pasadas por un agitador eléctrico por 5 min y dejadas en reposo por 30 min. Se tomó 0.1 ml del sobrenadante y se sembró en tubos Falcon de 50 ml con Agar Sabouraud Dextrosa (ASD) con cloranfenicol en posición de pico de flauta. El cultivo se hizo por 2-10 días a 37 °C (Canelo y Casquero, 2000; Perfect *et al.*, 2010). Las colonias sospechosas fueron seleccionadas por sus características típicas, como ser ligeramente redondeadas o planas, de consistencia mucoide, lisas, con olor agradable y de color crema (INS, 2007). Se utilizaron para realizar las pruebas microscópicas y bioquímicas correspondientes.

Estas fueron:

- *Observación de la cápsula en tinta china*. En el examen directo con tinta china se visualizó la cápsula de polisacárido de *C. neoformans* como un halo claro y nítido alrededor del hongo (INS, 2007).
- *Prueba de ureasa*. Las colonias sospechosas fueron inoculadas en medio Christensen e incubadas a 37 °C por 6 h (INS, 2007). Las muestras que presentaron color rojo grosella fueron consideradas como positivas.
- *Prueba de asimilación de carbohidratos*. Las muestras que resultaron positivas a las pruebas previas fueron incubadas en agar hierro-triple azúcar a

Cuadro 1. Frecuencia de *Cryptococcus neoformans* según el lugar de muestreo y tipo paloma en la ciudad de Lima (n=310)

Paloma	Lugar de muestreo	Muestras (n)	Positivas		IC 95%	
			(n)	(%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
Palomas de Castilla	Iglesia 1	30	10	33.3	16.5	50.2
	Iglesia 2	40	1	2.5	0	7.3
	Iglesia 3	12	1	8.3	0	24.0
	Iglesia 4	30	0	0	0	5.0 ¹
	Lugar público 1	68	4	5.9	0.29	11.5
Sub total		180	16	8.89	4.7	13.1
Palomas Mensajeras	Palomar 1	90	0	0	0.00	5.0 ¹
	Palomar 2	10	0	0	0	5.0 ¹
	Palomar 3	15	0	0	0	5.0 ¹
	Palomar 4	15	0	0	0	5.0 ¹
Sub total		130	0	0	0	5.0 ¹
Total		310	16	5.16	2.7	7.6

¹ Debido al margen de error de muestreo establecido, se considera un 5% como valor máximo

37 °C por 18 h. Los resultados de las muestras deberían ser positivas a glucosa y sacarosa, y negativas a lactosa.

- *Prueba de reducción de nitratos.* Se evaluó la reducción de nitratos en nitritos. Para ello, se inoculó el medio con nitrato y se incubó a 45°C por 10 min. Se agregó al tubo dos gotas de alfa-naftilamina (reactivo A) y dos gotas de ácido sulfanílico (reactivo B). El resultado positivo a la prueba de reducción de nitratos se evidencia por un cambio de color a rojo (INS, 2007).
- *Prueba de la enzima fenoloxidasas.* Se colocó una ansada de las colonias sospechosas sobre un papel Whatman esterilizado (2 cm²). Se añadieron 2-3 gotas de la solución L-DOPA (3.0 mg/ml) citrato férrico y se incubó a 28 °C por un tiempo máximo de 18 h (Menezes *et al.*,

2011). Se consideraron como positivas las muestras que produjeron una tinción marrón oscura.

- *Siembra en Agar CGB.* Las muestras fueron sembradas en el medio canavanina glicina azul de bromotimol sódico (CGB) (Hardy Diagnostics®) e incubadas a 28 °C por 5 días con el fin de diferenciar *C. neoformans* de *C. gattii* (Kwon-Chung *et al.*, 2002). El resultado positivo se evidencia por el crecimiento en el agar y un cambio de color a azul verdoso.

Para el análisis estadístico se establecieron tablas de frecuencias e intervalos de confianza al 95%. Se determinó la curva de distribución Beta Pert para la proporción de *Cryptococcus neoformans* mediante el programa de análisis de riesgo @Risk 5.5 ® con 1000 interacciones.

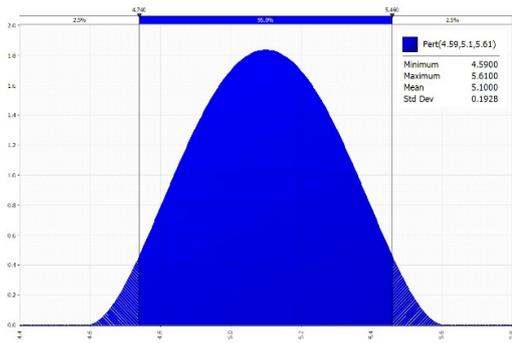


Figura 1. Curva de distribución beta pert para la proporción de *Cryptococcus neoformans* en heces secas de palomas domésticas (*Columba livia*). Programa de análisis de riesgo @Risk 5.5 ®

RESULTADOS

Se encontró una frecuencia de 5.16% (16/310), IC95% de 2.7-7.6% de muestras positivas a *C. neoformans* (Cuadro 1). En la distribución estocástica para análisis de riesgo se determinó una frecuencia de 4.59-5.61% al 95% (Figura 1) de muestras positivas a *C. neoformans* en el caso de las palomas de Castilla, mientras que no se encontraron muestras positivas para las palomas mensajeras.

DISCUSIÓN

Cryptococcus neoformans es un hongo común en las heces de aves y otros ambientes (Kamari *et al.*, 2017). El presente estudio determinó una proporción de 5.16% (16/310) de muestras de heces de palomas positivas a *C. neoformans* en la ciudad de Lima; corroborando la presencia de este patógeno en Lima (Huamán *et al.*, 2018). Las frecuencias de muestras positivas en heces de palomas en otros países varían desde 1.4% hasta valores tan altos como 34% (Curo, 2005; Cermeño *et al.*, 2006; Zarrini *et al.*, 2010;

Soltani *et al.*, 2013; Huamán *et al.*, 2018), así como en heces de canarios y gallinas (Criseo *et al.*, 1995; Kuroki *et al.*, 2004; Cafarchia *et al.*, 2006). Esto evidencia su importancia como patógeno y el riesgo que representa para la salud pública (Kuroki *et al.*, 2004; Messina *et al.*, 2014; Firacative *et al.*, 2018), afectando el pulmón y el sistema nervioso central, aunque puede afectar también otros órganos como el riñón, próstata, y huesos (Galnares-Olalde *et al.*, 2014). Por otro lado, se evidencia la asociación que hay entre este hongo y las heces de las palomas (Lin y Heitman, 2006; Acha *et al.*, 2001; Zarrini *et al.*, 2010; Soltani *et al.*, 2013).

La ausencia de *C. neoformans* en las muestras de heces de las palomas mensajeras criadas en cautiverio en los cuatro palomares del estudio se debería posiblemente al manejo de los ambientes de crianza y a las actividades periódicas de desinfección que se realizan calendarizados, limpieza de excretas del suelo y de los nidales (Krangvichain *et al.*, 2016; Huamán *et al.*, 2018).

La temperatura ambiental promedio en la ciudad Lima varía entre 18 y 30 °C y se conoce que los hongos del género *Cryptococcus* tienen la habilidad de crecer en un rango variado de temperatura, En el trabajo de Cermeño *et al.* (2006) se tuvieron temperaturas entre 23.8 y 28.2°C, en el de Zarrini *et al.* (2010) entre 19 y 32 °C. Por otro lado, solo *C. neoformans* y *C. gattii* tienen la capacidad de crecer a temperaturas mayores de 35 °C, de allí que se utiliza 37 °C como temperatura estándar para su desarrollo en el laboratorio y como una de las primeras pruebas diferenciales (Perfect *et al.*, 2010).

El reporte de *Cryptococcus neoformans* en Lima es de importancia epidemiológica, debido a su relevancia para la salud pública, reconocida como la principal causa de meningitis micótica en el mundo (Firacative *et al.*, 2018); relacionada a infecciones por el virus del VIH, donde se identifica su rol oportunista (Messina *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

Se reporta una frecuencia de 5.16% de heces secas de palomas positivas a *Cryptococcus neoformans*.

LITERATURA CITADA

1. **Acha P, Szyfres B. 2001.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Volumen I. Bacteriosis y micosis. 3° ed. Washington DC: Organización Panamericana de la Salud. 398 p.
2. **Cafarchia C, Camarda A, Romito D, Campolo M, Quaglia NC, Tullio D, et al. 2006.** Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. *Mycopathologia* 161: 229-234. doi: 10.1007/s11046-005-0194-z
3. **Canelo C, Casquero J. 2000.** Fenoloxidasa modificada: clave para identificar cepas de *Cryptococcus neoformans*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 17: 5-8.
4. **Cermeño JR, Hernández I, Cabello I, Orellán Y, Cermeño JJ, Albornoz R, Padrón E, et al. 2006.** *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* en excretas de palomas (*Columba livia*) en el Estado Bolívar, Venezuela. *Rev Latinoam Microbiol* 48: 6-9.
5. **Criseo GI, Bolignano MS, De Leo F, Staib F. 1995.** Evidence of canary droppings as an important reservoir of *Cryptococcus neoformans*. *Zbl Bakt S* 282: 244-54.
6. **Curo M, Salinas M, 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: 262-266.
7. **Firacative C, Lizarazo J, Illnait-Zaragozi M, Castañeda E. 2018.** The status of cryptococcosis in Latin America. *Mem I Oswaldo Cruz* 113: e170554. doi: 10.1590/0074-02760170554
8. **Galnares-Olaldea JA, Loza-Jalilb S, Gómez-Peña F, Muñoz-Abrahamo O, Pavía-Aubrya V, Luna-Gallardo D. 2014.** Criptococosis meníngea en un paciente inmunocompetente: reporte de un caso y revisión de la literatura *Rev Méd Hosp Gral México* 77: 137-141. doi: 10.1016/j.hgmx.2014.08.004.
9. **Huamán A, Béjar V, Sáez G, Guevara J, Sevilla R, Tapia M, Castillo E, et al. 2018.** *Cryptococcus neoformans* en heces de palomas (*Columba livia*) en Lima Metropolitana. *Rev Méd Hered* 29: 85 - 89. doi: 10.20453/rmh.v29i2.3347
10. **[INS] Instituto Nacional de Salud. 2007.** Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Lima: INS. 100 p.
11. **Kamari A, Sepahvand A, Mohammadi R. 2017.** Isolation and molecular characterization of *Cryptococcus* species isolated from pigeon nests and *Eucalyptus* trees. *Curr Med Mycol* 3: 20-25. doi: 10.29252/cmm.3.2.20
12. **Krangvichain P, Niyomtham W, Prapasarakul N. 2016.** Occurrence and susceptibilities to disinfectants of *Cryptococcus neoformans* in fecal droppings from pigeons in Bangkok, Thailand. *J Vet Med Sci* 78: 391-396. doi: 10.1292/jvms.15-0594
13. **Kronstad J, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths E, Geddes J, et al. 2011.** Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol* 9: 193-203. doi: 10.1038/nrmicro2522
14. **Kuroki M, Phichaichumpon C, Yasuoka A, Chiranairadul P, Chosa T, Sirinirund P, Miyazaki T, et al. 2004.** Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* from an

- endemic region of HIV-associated cryptococcosis in Thailand. *Yeast* 21: 809-812. doi: 10.1002/yea.1112
15. **Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. 2002.** Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomyces, Tremellomycetidae). *Taxon* 51: 804-806.
 16. **Lin X, Heitman J. 2006.** The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu Rev Microbiol* 60: 69-105. doi: 10.1146/annurev.micro.-60.080805.142102
 17. **May RC, Stone NR, Wiesner DL, Bicanic T, Nielsen K. 2015.** *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol* 14: 106-17. doi: 10.1038/nrmicro.2015.6
 18. **Maziarz EK, Perfect JR. 2016.** Cryptococcosis. *Infect Dis Clin N Am* 30: 179-206. doi: 10.1016/j.idc.-2015.10.006
 19. **Menezes R, Amante MP, Pedroso R. 2011.** Different culture media containing methyl dopa for melanin production by *Cryptococcus* species. *Soc Bras Med Trop* 44: 591-594. doi: 10.1590/S0037-86822011000500012
 20. **Messina FA, Negronia F, Maiolo EI, Arechavala A, Villafañe MF, Santiso G, Bianchi M, et al. 2014.** Criptococcosis meníngea en pacientes con diabetes y sida. *Enferm Infecc Micr Cl* 32: 242-245. doi: 10.1016/j.eimc.2013.11.001
 21. **Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, et al. 2010.** Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 50: 291-322. doi: 10.1086/649858
 22. **Soltani M, Bayat M, Hashemi S, Zia M, Pestechian N. 2013;** Isolation of *Cryptococcus neoformans* and other opportunistic fungi from pigeon droppings. *J Res Med Sci* 18: 56-60.
 23. **Zarrini M, Jorfi M, Amirrajab N, Rostami M. 2010.** Isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings in Ahwaz, Iran. *Turk J Med Sci* 40: 313316. doi:10.3906/sag-0808-10