

CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS (SANFELICE) VUILLEMIN
EN AVES CONFINADAS Y RECINTOS HOSPITALARIOS DE LA REGION
METROPOLITANA (CHILE)*

Stefan Sammann B., M. Cristina Díaz L.,
Lucía Salamanca F., Valeria Prado J.
Facultad de Medicina, Sede Oriente
Universidad de Chile - Santiago

Palabras clave: *Cryptococcus neoformans*, excrementos de aves, recintos hospitalarios

Key words: *Cryptococcus neoformans*, birds dropping, hospitals

RESUMEN

Cryptococcus neoformans ha sido reconocido como causa frecuente de micosis profundas. La inmunosupresión celular es un factor predisponente fundamental para padecer criptococosis, y su frecuencia ha aumentado conjuntamente con el número de individuos con alteraciones en su sistema inmune, sobretodo después de la aparición del SIDA. No se han descrito casos de contagio interhumano, por lo cual el estudio de su presencia en el ambiente adquiere especial relevancia, demostrándose que, las deyecciones de diversas aves, constituyen su reservorio natural más importante.

En nuestra investigación se aisló por primera vez en Chile esta levadura desde su fuente natural (deyecciones de aves), aprovechando la formación de un pigmento tipo melanina en algunos medios de cultivo.

Se analizaron un total de 225 muestras de excretas de aves, comparando el rendimiento de cuatro medios de cultivo diferenciales en base a *Guizotia abyssinica* (Staib agar) o ácido caféico con y sin un inhibidor de hongos filamentosos (bifenilo). Durante el período de julio a octubre de 1991 se recolectaron 81 muestras de deposiciones de palomas de recintos hospitalarios, expuestas a la lluvia y a la influencia directa de los rayos solares. Durante el período de marzo a mayo de 1993 se recolectaron 144 muestras de excretas protegidas, provenientes del Zoológico de Santiago, desde un criadero de aves exóticas y de cuatro Hospitales. Las 81 muestras no protegidas fueron todas negativas para *C. neoformans*, mientras que de las 144 muestras protegidas, 35 (24.3%) resultaron positivas. El medio de cultivo más efectivo para recuperar a *C. neoformans* de las aves, fue el de Staib con bifenilo (88.6%). Las 35 cepas aisladas fueron biotipificadas mediante el medio CGB (canavanina-glicina-azul de bromotimol), resultando ser todas, como se esperaba, del serotipo AD.

Se recomienda a las personas inmunocomprometidas, a no frecuentar los lugares donde habita *C. neoformans* y en lo posible evitar tener aves enjauladas como mascotas.

SUMMARY

[*Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin in confined birds and hospital areas of the Metropolitan Region (Chile)]

Cryptococcus neoformans has come to be recognized as a relatively common cause of deep-seated mycotic infection. Defective cell-mediated immunity is an important predisposing factor for suffering cryptococcosis. Its frequency has risen along with the number of persons with abnormal host immune response, especially after the appearance of AIDS. Interhuman infection has not yet been described therefore it's detection in nature acquires a special relevance. In this regard, bird droppings have been found to form the most important natural reservoir.

This investigation tried to isolate the yeast for the first time from a natural source (bird excreta) in Chile, using it's ability to form a melanin-like pigment on some culture media.

A total of 225 samples of bird droppings were examined, comparing four selective culture media, containing *Guizotia abyssinica* (Staib agar) or caffeic acid, with and without a mold inhibitor (biphenyl).

During the period of July to October 1991, 81 samples of pigeon droppings exposed to the rain and direct sunlight were examined, and during March to May 1993, 144 protected samples were analyzed; from the Santiago Zoological Garden, an exotic pet bird hatchery and four hospitals. The 81 non protected samples were all negative for *C. neoformans*, meanwhile 35 (24.3%) from the 144 protected samples were positive.

The best result was obtained by Staib agar with biphenyl (88.6% of strains detected).

The 35 strains isolated were separated into their serotypes by the CGB agar (canavanine, glycine and bromothymol blue agar), and resulted to be all, as expected, to belong to serotype A or D.

It is recommended for immunocompromised persons not to expose themselves to places where *C. neoformans* can be found and to be cautious with birds as pets.

* Tomado de la Tesis de Magister de Stefan Sammann Bartling, aprobada en la Fac. de Medicina de la Universidad de Chile el 15 de Nov. de 1993.

INTRODUCCION

Cryptococcus neoformans es uno de los hongos patógenos más importantes que ha sido reconocido como causa frecuente de micosis profundas. Puede afectar cualquier órgano del cuerpo, pero los sitios preponderantes de infección son los pulmones y el sistema nervioso central, seguido por las afecciones cutáneas (15, 42).

Recientemente se ha constatado que la próstata juega un rol importante como reservorio, siendo la responsable de la mayoría de las reactivaciones, por la baja penetración a la glándula de los antimicóticos de uso habitual, la Anfotericina B y la 5 Flucitosina (28,29,30,33).

La inmunosupresión celular es un factor predisponente fundamental para padecer criptococosis y su frecuencia ha aumentado conjuntamente con el número de individuos con alteraciones en su sistema inmune. Antiguamente estaba siempre relacionada con las enfermedades linfoproliferativas, corticoterapias o con el tratamiento inmunosupresor por trasplantes de órganos, pero ultimamente se asocia sobre todo con la enfermedad del SIDA (12,13,14,18,19,27,31). Actualmente, la criptococosis ocupa el cuarto lugar dentro de las infecciones oportunistas en personas afectadas por SIDA en los Estados Unidos (15). Existen también trabajos nacionales que relacionan estas dos enfermedades. Es así que, en un estudio realizado el año 89, de un total de 17 enfermos VIH (+), en 3 (18%) se constató una criptococosis (12) y en un trabajo publicado reciente, de 13 casos de criptococosis meníngeas diagnosticadas, 9 (69%) correspondieron a personas VIH(+) (17).

La infructuosa búsqueda del hongo hasta el momento en suelos chilenos (41,43), motivó la realización de este trabajo para intentar demostrar su presencia en el medio ambiente y así determinar si constituye un riesgo para los enfermos con inmunodeficiencias en nuestro país. Para su efecto, se analizaron principalmente deposiciones secas de distintas aves confinadas y de recintos hospitalarios, utilizando dos medios de cultivo que en la literatura han demostrado un buen rendimiento para su aislamiento.

El objetivo general de este trabajo fue pesquisar la presencia de *Cryptococcus neoformans* en deyecciones de aves confinadas y recintos hospitalarios de la región Metropolitana. Los objetivos específicos fueron: 1). Cultivar deyecciones de aves para aislar *C. neoformans*. 2). Evaluar el rendimiento comparativo de cuatro medios de cultivo para *Cryptococcus neoformans*, en base a semillas de *Guizotia abyssinica* o ácido caféico (TCC), con y sin inhibidor de hongos filamentosos y 3). Diferenciar los cepas aisladas en sus serovariedades AD y BC.

MATERIAL Y METODOS

Este trabajo se encuentra subdividido en dos partes: la primera, se realizó durante los meses de julio a octubre del año 1991, en la cual se tomaron muestras de deposiciones de palomas, expuestas a la influencia del medio ambiente, de cuatro recintos hospitalarios y la segunda, durante los meses de marzo, abril y mayo de 1993. En éstas se tomaron muestras de deposiciones secas de diversas aves, protegidas de la lluvia y de la influencia directa de los rayos solares.

Primera parte:

Se tomaron 81 muestras en cuatro hospitales de Santiago, en cuyos recintos habitan palomas. Los hospitales fueron: Hospital del Salvador, Hospital Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y Cirugía Torácica Dr. Enrique Laval M., Hospital Clínico de la Universidad de Chile José Joaquín Aguirre y el Hospital Paula Jaraquemada. En cada lugar se tomaron 18 muestras: 6 de heces frescas de palomas, 6 de deposiciones secas y 6 de tierra contaminada con deyecciones, salvo en el Hospital Salvador donde se alcanzó a tomar y analizar 9 muestras adicionales (3 de cada grupo).

Para la toma de muestra, se utilizó el método de Gugnani modificado (5), que consiste en lo siguiente: 5 grs (app.) de deposiciones, se suspendieron en 30 ml de suero fisiológico en un frasco estéril que contenía cloranfenicol en una concentración de 0.1 mgr/ml. Si la muestra no podía sembrarse en el mismo día, se mantuvo refrigerada a 4°C. La muestra se homogenizó agitándola rigurosamente, primero en forma manual y posteriormente durante 15 min. en un agitador Eberbach. Después de 30 min. de decantación, se sembró 0.1 a 0.5 ml del sobrenadante en los medios de cultivo seleccionados, que se incubaron a 37 y 26°C. Los cultivos se observaron después de 24 hrs. y por un período de 14 días (35).

Los medios de cultivo escogidos fueron el medio de Staib, Corn Meal Tween 80 Agar (CTA)(8), ligeramente modificado por nosotros y el Tween 40 Corn Meal Cafeic Acid Agar en base a maicena (TCC).

El medio de Staib o Birdseed agar, se preparó de la siguiente forma: se muelen 50 grs de *G. abyssinica* en un pulverizador y se le agregan 1000 ml de agua destilada; se hierve la mezcla durante 30 min., posteriormente se pasa por un filtro de papel y se le agrega 1 gr de dextrosa, 1 gr de KH_2PO_4 , 1 gr de creatinina, 15 grs de agar, 0.1 gr de cloranfenicol y los restantes ml de agua destilada para completar nuevamente los 1000 ml. El medio adquiere

un color café verdoso, semitransparente. *C. neoformans* en este medio presenta colonias características, de un color café claro a café oscuro. El TCC se preparó agregando a 1000 ml de agua destilada 40 grs de maicena, 18 grs de agar, 3 ml de Tween 40, 0.3 gr de ácido caféico y 0.1 gr de cloranfenicol. El color final del medio es blanco, con superficie finamente granular y *Cryptococcus* crece formando colonias de color café oscuro a negro. Ambos medios se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 min. con 15 lb/in² de presión.

Para la biotipificación se usó el medio CGB (canavanina-glicina-agar azul de bromotimol), con los siguientes ingredientes: 880 ml de agua destilada, 20 grs de agar, 100 ml de solución A y 20 ml de solución B. La solución A, se prepara agregando a 100 ml de agua destilada, 10 grs de glicina, 1 gr de KH₂PO₄, 1 gr de MgSO₄, 1 mg de HCL de tiamina y 30 g de L-Canavanina, ajustándose a pH 5.6. La solución se esteriliza mediante filtración (0.45µm Nalgene). La solución B, consiste en 100 ml de agua con 0.4 gr de azul de bromotimol. Para la preparación final, a 880 ml de agua destilada se le agregan 20 ml de la solución B y 20 grs de agar y se autoclavan. Posteriormente, antes de enfriarse, se agregan los 100 ml de la solución A. El color final es amarillento-verdoso (Ph 5.8 ± 0.1). Un resultado positivo para *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotipo BC), consiste en un viraje de color del agar, a azul cobalto (ph 7.0), por la producción y acumulación de amonio a partir de la glicina. (7, 10).

La identificación final de las posibles cepas de *Cryptococcus* y de algunas otras levaduras, se hicieron mediante pruebas de filamentización, morfología, prueba de tubos germinales, examen directo con tinta china, crecimiento a 37°C, detección de ureasa, asimilación de nitrógeno y de hidratos de carbono (11). Para la asimilación de nitrógeno se ocupó el nitrato de potasio y para el auxanograma se ocuparon 6 hidratos de carbono: dextrosa, galactosa, lactosa, sacarosa, maltosa e inositol.

Segunda Parte:

Se recolectaron un total de 144 muestras en la Región Metropolitana. De éstas, 48 fueron tomadas de jaulas de aves en el Zoológico del Parque Metropolitano de Santiago, 53 en un criadero de aves exóticas, y 43 en 4 recintos hospitalarios de Santiago: Hospital de la FACH, Hospital Instituto Oncológico Dr. Caupolicán Pardo Correa, Hospital José Joaquín Aguirre y del Hospital Clínico de la Universidad Católica de Chile. Las 43 muestras recolectadas en los hospitales en esta segunda parte, fueron las únicas que correspondieron a deposiciones de palomas.

Para la toma de muestra, se utilizó el método de Gugnani modificado antes descrito. Se mantuvo las mismas precauciones y se empleó el mismo procesamiento de las muestras, con la excepción que se eliminó la incubación de los medios de cultivo a 37°C, incubándolos todos a 26°C. También se alargó el tiempo de observación de las muestras de 2 a 4 semanas. Las fórmulas de los medios, GA y TCC utilizados, se mantuvieron y se añadieron dos medios iguales a los anteriores, GBI (de Staib) y TBI (ác. caféico), con la única diferencia que a los últimos dos se les agregó bifenilo al 0.1% (un inhibidor de hongos filamentosos). Esto se logró disolviendo 1gr. de bifenilo en 20 ml de alcohol absoluto y agregándolo al medio. El medio para la biotipificación no sufrió modificaciones.

Para comparar el rendimiento de los 4 medios de cultivo, se usó ANOVA con p= 0.05.

RESULTADOS

Primera Parte:

No se pesquizó *Cryptococcus neoformans* en las 81 muestras estudiadas, pero sí algunas especies de importancia médica como: *Candida albicans* (Robin) Berkhout, *Candida krusei* (Castellani) Berkhout, *Candida pseudotropicalis* (Castellani) Basgall, *Candida parapsilosis* (Ashford) Langerton et Talice, *Candida tropicalis* (Castellani) Berkhout, *Torulopsis stellata* (Kreomer et Krumbholz) Lodder, *Torulopsis candida* (Saito) Lodder y *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner. Los hongos que se aislaron con mayor frecuencia fueron: *Rhodotorula spp.* (39.5%), *C. krusei* (27.2%), seguidas por *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arn var. *melanigenum* Hermanides - Nijhof (18.5%). (Tabla 1)

Segunda Parte:

En 35 (24.3%) de las 144 muestras protegidas se aisló *C. neoformans*. Su distribución según su procedencia fue: 11 de 48 muestras (22.9%) tomadas en el Zoológico, 8 de 53 muestras (15.1%) del criadero y 16 de 43 muestras (37.2%) de los hospitales.

Las muestras positivas de Hospitales se distribuyeron en los distintos recintos como sigue: 4 de 11 muestras (36.4%) del Hospital de la FACH, 2 de 5 muestras (40%) del Hospital J. J. Aguirre, 3 de 20 muestras (15%) del Hospital Caupolicán Pardo y 6 de 7 muestras (85.7%) del Hospital Clínico de la Universidad Católica.

Tabla 1

Distribución de Hongos Levaduriformes aislados en 81 muestras no protegidas

Hongo /Muestra	Frescas n=27	Secas n=27	Tierra n=27	Total n=81
<i>Rhodotorula</i>				
spp.	10	8	14	32 (39.5%)
<i>C. krusei</i>	10	3	5	22 (27.2%)
<i>C. parapsilosis</i>	2	0	1	3
<i>C. pseudotropicalis</i>	2	2	1	5
<i>C. tropicalis</i>	2	0	2	4
<i>C. albicans</i>	1	1	1	3
<i>T. stellata</i>	2	0	0	2
<i>T. candida</i>	0	0	1	1
<i>A. pullulans</i> var.				
<i>melanigenum</i>	2	7	6	15 (18.5%)
<i>C. laurentii</i>	0	2	0	2
<i>C. neoformans</i>	0	0	0	0
Total	31	23	31	89

De las especies de aves con desarrollo de *C. neoformans* en sus deyecciones, tanto del Zoológico como del criadero, fueron positivas 19 muestras de un total de 41 estudiadas: 11 de ellas correspondieron al Zoológico y 8 al criadero.

El gallo de roca tuvo el mayor número de muestras positivas en las del Zoológico y las gallinas en las del criadero. Las 8 muestras positivas del criadero, corresponden a 7 jaulas distintas, de un total de 20 jaulas examinadas y las muestras agrupadas bajo el nombre de "gallinas varias" corresponden a tres jaulas diferentes (Tabla 2).

El rendimiento fue significativamente superior en el medio GBI, que en los restantes ($p < 0.001$). Entre las otras 3 no hubo diferencias de interés (Figura 1).

El tiempo promedio empleado en presentar cambios de viraje es significativamente superior para los medios TCC y TBI, que para GA y GBI ($p < 0.05$). (Tabla 3) La positividad obtenida usando combinaciones de medios, es claramente mayor cuando está presente el GBI (>91.4%), que cuando está ausente (77.1%). (Figura 2)

Todos los serotipos aislados correspondieron al AD.

Tabla 2

Especies de aves con desarrollo de *C. neoformans* en sus deyecciones

Especies de Aves	Muestras	
	Estudiadas	Positivas
ZOOLOGICO		
Catita Australiana	3	2
Tórtola Beige	4	1
Gallo de Roca	5	3
Cardenal Gris, Diuca común, Jal común, Chincol	2	2
Lechuza	2	1
Pavo Real, Loro Cachaña	4	1
Loro Cachaña	4	1
Loro Tricachue		
CRIADERO		
Codornices	2	1
Brhamas, Trintres	2	1
Cochinchina Plateada	2	1
Gallinas varias	9	4
Pavos	2	1
Total	41	19

Tabla 3

Tiempo de Detección de colonias pigmentadas de *C. neoformans* en los diferentes medios (días)

Medio Días	GA n=21	GBI n=31	TCC n=23	TBI n=24
Rango	2-8	4-12	5-13	5-13
Promedio*	.3	5.9	9.1	9.3

*D.S. p (GA-GBI) vs. (TCC-BI) < 0.05

DISCUSION

Las diferencias en la metodología observada entre la primera y segunda parte, se debieron fundamentalmente a sugerencias hechas por el Profesor Staib del Instituto Robert Koch de Berlín, que al analizar la primera parte, hizo notar lo importancia que tiene la existencia de una acumulación de deposiciones de las

aves (no sólo de palomas), bajo condiciones de sequedad y protegidas de la influencia directa de los rayos solares, para obtener un buen resultado, el que se refleja solo en la positividad obtenida en la segunda parte del trabajo (24.3%). Fue fundamental también, haber usado cuatro medios especiales para la detección de *C. neoformans*, situación que puede haber sido una de las causas principales de la negatividad en sus hallazgos en nuestro medio nacional. Así, el intento de aislamiento de *C. neoformans* en Valdivia por Zaror et al., el año 1980 (43), los cuales estudiaron principalmente deyecciones de palomas y gallinas, y el trabajo de Toro y Piontelli del año 1985 (41), quienes analizaron suelos arenosos en búsqueda de levaduras patógenas. Staib, durante los años 1984-1988, realizó un trabajo similar al nuestro, estudiando deposiciones de aves en distintos recintos cerrados de Berlín, incluyendo al zoológico (32). En ese lapso de tiempo analizó 294 muestras de 70 especies de aves, encontrando un 5.78% de *C. neoformans*. La positividad obtenida fue de un 10%, menor que nuestros hallazgos en el Zoológico (22.9%).

El análisis adicional de otras colonias levaduriformes encontradas, mostró una distribución semejante a lo realizado por Zaror et al., en la ciudad de Valdivia (43, tabla 1). Son comparables los hallazgos de levaduras de importancia médica como *C. albicans*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (3,4,13,36). También coinciden las dos primeras frecuencias de *Rhodotorula* spp. (39,5%) y *C. krusei* (27,2%). Debemos destacar los hallazgos de *A. pullulans* var. *melanigenum*, por su importancia en el diagnóstico diferencial con *Cryptococcus*. Es productor de un pigmento negro y como se aprecia en la tabla 1, es bastante frecuente en las muestras. Además tiene una primera fase de crecimiento similar a *Cryptococcus*, pero después de algunos días filamentiza y produce micelio aéreo.

En nuestra investigación, se ensayaron cuatro medios selectivos que pueden ser usados en clínica para un diagnóstico rápido, de los cuales uno es el medio de Staib y el otro contiene como principio activo al ácido caféico, ambos con y sin bifenilo. El ácido cafeico es oxidado en sus grupos hidroxilos en las posiciones 3,4 por la fenoloxidasas que se encuentra en la membrana del *C. neoformans*, dando origen a un polímero de melanina, que otorga el color café a la colonia. El medio de Staib ha demostrado ampliamente su eficacia en el aislamiento de *Cryptococcus*, mientras que los medios en base a ácido caféico cuentan con menos trabajos y demostraciones.

Otra razón por la cual se escogió el medio TCC, fue por la dificultad en obtener la semilla de *Guizotia*

abyssinica en Chile.

El mayor crecimiento y la rápida coloración café, se observó en el medio GA, hizo posible la identificación del primer *C. neoformans* aislado del ambiente (deyección de tórtola) en Chile al segundo día. El GBI mostró una positividad al cuarto, mientras que los otros dos, demoraron 10 días, por lo que en un principio se consideraron negativos. Se observó que los medios en base a maicena y ácido caféico poseen una actividad inhibitoria sobre el crecimiento de varios hongos y sobre la velocidad de crecimiento de *C. neoformans*, sobre todo el medio TBI. Con respecto a la coloración, las colonias generalmente producían un color café claro típico en los medios GA y GBI, que se oscurecía con el transcurso del tiempo, y un color café oscuro a casi negro en los medios TCC y TBI. El mejor rendimiento del medio GBI en comparación a GA, se debe fundamentalmente al menor sobrecrecimiento de hongos contaminantes en el primero, lo que facilitó el reconocimiento de *Cryptococcus*.

Cabe mencionar que algunas especies de *Penicillium* impiden el cambio de color sobre el medio de Staib, por lo cual su contaminación puede afectar el rendimiento (30). El medio TCC presentó también una actividad inhibitoria sobre los hongos contaminantes, pero menor que en los con bifenilo. Esto dificultó el aislamiento de *C. neoformans* en algunas muestras de este medio, por la menor velocidad de crecimiento de la levadura en comparación con algunos hongos filamentosos. En las muestras clínicas el problema de la contaminación fúngica es bastante menor. Pensamos que el medio GA o de Staib resulta ser el más recomendable, pero por la dificultad de obtener las semillas de *Guizotia abyssinica* creemos que el medio TCC representa una buena alternativa.

El hecho que solamente aislamos *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* mediante el medio CGB es concordante con los hallazgos de otros trabajos (10,40) y confirma nuevamente, que las deposiciones de aves no forman parte del habitat natural del *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*.

En las preparaciones microscópicas con tinta china de los cultivos primarios, pudimos comprobar, como fue descrito también por Norman Conant (2), la presencia de tubos germinales cortos. En esta etapa casi no se advierte cápsula, la que se desarrolla recién en forma más notoria en los subcultivos.

No usamos la inoculación experimental en ratones blancos para demostrar la patogenicidad de las cepas aisladas, ya que la virulencia de estas cepas ha sido demostrada en otros trabajos (15, 24).

Mucho se ha especulado sobre los mecanismos de dispersión del *C. neoformans* y el rol de la paloma en ese

aspecto (1.3,8,37,39). Con Swinne, quién aisló por primera vez el hongo del buche de las palomas (37), tuvo auge la teoría endosaprofítica, o sea que la paloma portaría el hongo en el buche. Hubo posteriormente otras investigaciones, que también tuvieron éxito en aislar el hongo de esa parte anatómica (6,9,24). A pesar que la frecuencia de portación reportada por estos investigadores fue relativamente baja (1.25% a 8.2%), permitió aceptar ampliamente el concepto de la paloma como portadora.

Es necesario tener presente que el hongo no sólo se ha aislado de deyecciones de palomas, sino también de las excretas de muchas otras aves (8,20,23,26), incluso de deposiciones de murciélagos (4) y también del aire (25, 31, 32, 37). Basándose en datos y los resultados irregulares de portación en las palomas reportados por Swinne (38,39), estos sugieren un rol más bien secundario de la vía endosaprofítica y dan una mayor importancia a los otros mecanismos de dispersión del hongo, tales como: la vía aérea y el transporte en el plumaje. Se demostró por primera vez en 1962, que las deyecciones de aves con sus componentes nitrogenados de bajo peso molecular (purinas, creatinina, urea etc.), forma un substrato nutritivo para el taxon (21). *C. neoformans* es capaz de degradar estos compuestos nitrogenados altamente concentrados, además de ser resistente a la desecación (22). Si este material orgánico es expuesto a la humedad o a la lluvia, el crecimiento concomitante de bacterias que producen una alcalinización del medio, llevan a la muerte el *Cryptococcus* (32). Estas circunstancias son las res-

ponsables de que generalmente no se recupere de lugares expuestos a la influencia del medio ambiente. La baja positividad de *C. neoformans* obtenida en deposiciones frescas (en nuestro caso fue negativa), como los trabajos de Gugnani (5) y de Restrepo (16), confirman este planteamiento. Pensamos por lo anterior, que además de la vía aérea, la portación del hongo entre el plumaje de la paloma, constituiría un mecanismo de dispersión importante. Los propágulos serían principalmente llevados de esa forma de un palomar a otro, colonizando las deposiciones secas ya previamente acumuladas. La condición de la paloma como portadora del *Cryptococcus* en su buche, se debería a degluciones accidentales.

Como el hongo se aisló de diferentes lugares geográficos de Santiago, es de suponer que se encuentra ampliamente distribuido en la región Metropolitana. En los recintos hospitalarios, fue aislado del entretecho de los edificios, donde se refugiaban las palomas y por ende existía una acumulación de heces bajo condiciones óptimas para su colonización. Con respecto al criadero y las deyecciones de las aves presuntamente positivas, cabe mencionar que en época de no apareamiento, las jaulas de las diferentes especies de gallinas se encuentran abiertas, permitiendo una libre circulación de éstas. Por esto, las excretas positivas se atribuyeron a las aves que normalmente residen en las jaulas. Esta situación no se observó en el Zoológico, ya que las jaulas siempre se mantienen cerradas y todas las aves examinadas tienen una larga permanencia en ellas.

Figura 1: Rendimiento comparativo de diferentes medios de cultivo en el aislamiento de 35 cepas de *C. neoformans* (%)

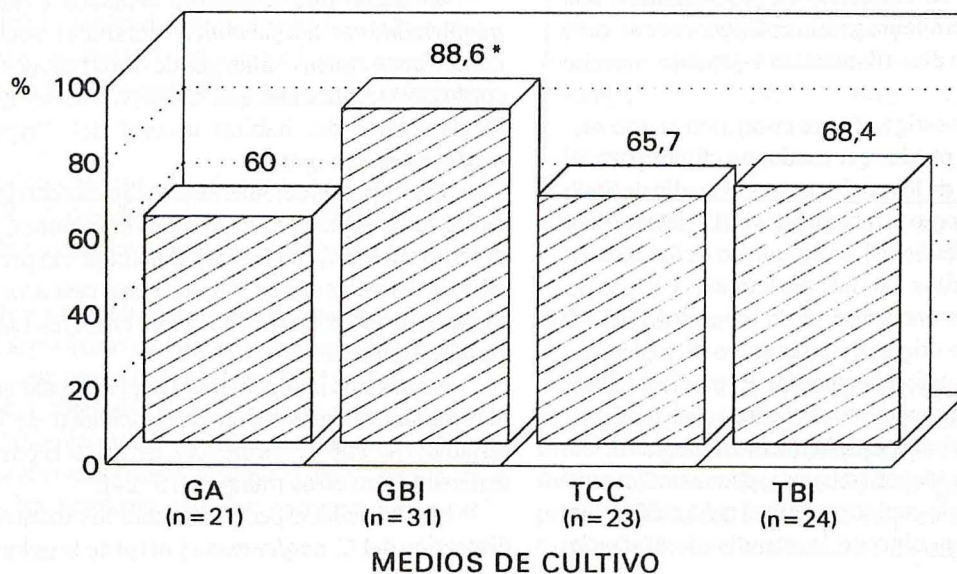
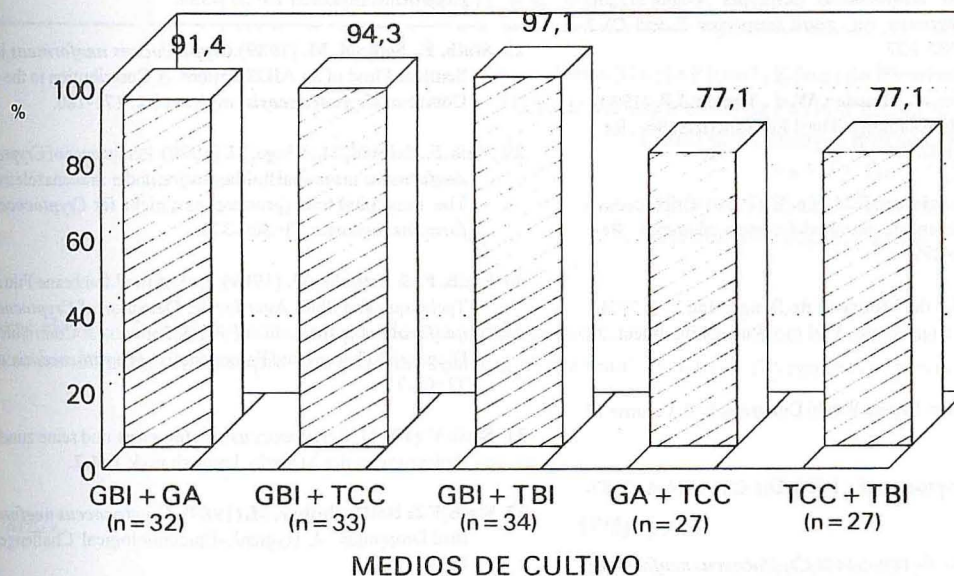


Figura 2: Rendimiento acumulativo al usar combinaciones de medios de cultivo (%)



CONCLUSIONES

Estos resultados corresponden a los primeros aislamientos de *C. neoformans* en nuestro país desde una fuente exógena natural (deyecciones de aves). Es importante destacar que las muestras positivas fueron obtenidas de lugares protegidos de la lluvia y los rayos solares y que el rendimiento de los medios de cultivo en las muestras protegidas fue satisfactorio (24.3%). La presencia de *C. neoformans* en todos los lugares examinados (Hospitales, Zoológico y Criadero), permite suponer una amplia distribución geográfica en la Región Metropolitana. Los cuatro medios de cultivo empleados resultaron ser eficaces para el aislamiento del hongo,

pero el más efectivo para recuperar la levadura de las muestras de deyecciones de aves, fue el de Staib con bifenilo (88.6%), mientras que el más rápido para detectar *C. neoformans* fue el de Staib sin bifenilo (2 días). Todas las cepas de *C. neoformans* var. *neoformans*, correspondieron a los serotipos AD.

Actualmente no puede despreciarse el riesgo de contagio en personas inmuno-comprometidas y es por lo tanto aconsejable, que éstas no se expongan a los lugares donde frecuentemente habita *C. neoformans*, ni mantengan aves enjauladas como mascotas.

Es esencial considerar en clínica el empleo rutinario de un medio de cultivo de diagnóstico rápido.

REFERENCIAS

1. Abou-Gabal, M. & Atia, M. (1977). Study of the role of pigeons in the dissemination of *Cryptococcus neoformans* in nature. Castellana, 10: 63-68.
2. Conant, N., Smith, D., Baker, R., Callaway, J. Micología Tercera Edición, Nueva Editorial Interamericana, pp. 234
3. Enmons, C.W. (1969). Pathogenic yeasts. Antonie Van Leeuwenhoek, 35: 113-127.
4. Gugnani, H.C. & Shrivastav, J.B. (1972). Occurrence of pathogenic fungi in soil in India. Indian J. Med. Res., 60: 40-47.
5. Gugnani, H.C. & Njoku-Obi, A.N.U. (1973). Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in Enugu (Nigeria). The W.A.M.J., October: 121-122.
6. Hermoso de Mendoza, Salcedo, M., Miranda, García A., Perea Remujo, J. A., Arenas, Casas A., Poveda, Guerrero, J. B., Carranza, Guzman J., Leon, Vizcaino, L. (1987). *Cryptococcus* en paloma I. Frecuencia de portadores en buche en el área urbana de Córdoba. Rev. Ibér. de Micol., 4: 121-127.
7. ISHAM Mycoses Newsletter (1984). 44:7-9 October.
8. Kaufmann, C.S. & Merz, W.G. (1982). Two rapid pigmentation tests for identification of *Cryptococcus neoformans*. J. Clin. Microbiol. 15: 339-341
9. Khan, Z.U., Pal, M., Randhawa, H.S., Sandhu, R.S. (1978). Carriage of *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons. J. Med. Microbiol., 1: 215-218.

10. Kwon-Chung Kyung, J., Polacheck, Itzhack & Bennett, J.E. (1982). Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). J. Infect. Dis., 15 (3): 535-537.
11. Lennette, E. H., Belows, A., Hausler, W. J., Truant, J.P. (1980). Manual of clinical Microbiology. Third Ed. American Soc. for Microbiol, Washington D.C.
12. Lobos, T., Acuña, G., Espinoza, R., Leon, E. (1990). Criptococosis en el curso del síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Rev. Méd. Chile 118: 296-299.
13. Lobos, T., Piemonte, L., du Monceau de Bengerdal, F. (1992). Infecciones fúngicas en pacientes VIH (+). Rev. Chile. Infect. 2: 80-87.
14. Med.Report (1988). Xth Isham World Congress: N°4/Volume 12 Berlin, July.
15. Perfect, J.R. (1989). Cryptococcosis. Infect. Dis. Clin. of N. A., 3: 77-103.
16. Restrepo, A. et al. (1968). Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de materiales contaminados con excreta de palomas en Medellín, Colombia. Antioquia Med., 18: 33-40.
17. Retamal, C., Hazbún M., Cortés P., Thompson, L. (1993). Estudio de Cryptococosis en Inmunosuprimidos. Anal Microbiol 1: 34-36.
18. Rinaldi, M., Drutz, D.J., Howell, A. (1986). Serotypes of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. J. Infect. Dis., 153: 642.
19. Shimizu, R.Y., Howard, D.H., Clancy, M.N. (1986). The variety of *Cryptococcus neoformans* in patients with AIDS. J. Infect. Dis., 154: 1042.
20. Staib, F. (1961). Vorkommen von *Cryptococcus neoformans* im Vogelmist. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 182: 562-563.
21. ----- (1962) *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica*. Zeitschrift f. Hygiene 148: 466-475.
22. ----- (1963) Zur Widerstandsfähigkeit von *Cryptococcus neoformans* gegen Austrocknung und hohe Temperaturen. Arch. Microbiol. 44. 323.
23. ----- (1962). *Cryptococcus neoformans* beim Kanarienvogel. Zbl. Bakt. Paras. I Orig. 185: 129-134.
24. ----- (1975). Zur stammspezifischen Virulenz von *Cryptococcus neoformans*. Tierexperimentelle Beobachtungen über zwei *Cryptococcus neoformans* Stämme aus Vogelfäkalien. Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A 230: 81-85.
25. Staib, F. & Bethäuser, G. (1968). Zum Nachweis von *Cryptococcus neoformans* im Staub von einem Taubenschlag. mykosen 11: 619-624.
26. Staib, F. & Schulz-Dietrich, J. (1984). *Cryptococcus neoformans* in Fecal Matter of Birds Kept in Cages-Control of *Cryptococcus neoformans* Habitats. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 179. 179-186.
27. Staib, F. (1986). Detection of *Cryptococcus neoformans* in Biopsy Specimens from the Spleen and the Liver of AIDS Patients: Critical Comments. mykosen 29: 551-555.
28. Staib, F., Seibold, M. (1989). *Cryptococcus neoformans* in the Seminal Fluid of an AIDS Patient. A Contribution to the Clinical Course of *Cryptococcosis*. mycoses 32: 171-180.
29. Staib, F., Seibold, M., L'age, M. (1990). Persistence of *Cryptococcus neoformans* in seminal fluid and urine under itraconazole treatment. The urogenital tract (prostate) as a niche for *Cryptococcus neoformans*. mycoses 33: 369-373.
30. Staib, F. & Seibold, M. (1989). Use of the Membrane Filtration Technique and Staib Agar for the Detection of *Cryptococcus neoformans* in the Urine of AIDS Patients- A Contribution to Diagnosis, Therapy and Pathogenesis of *Cryptococcosis*. mycoses 32: 63-73.
31. Staib F. (1991). *Cryptococcus neoformans* und seine zunehmende Bedeutung in der Medizin. hautnah myk 1: 4-7.
32. Staib, F. & HeiBenhuber, M. (1989). *Cryptococcus neoformans* in Bird Droppings: A Hygienic-Epidemiological Challenge. AIFO 12: 649-655.
33. Staib, F. & Seibold, M. (1990). *Cryptococcus neoformans* und seine Beziehungen zum Urogenitaltrakt. insbesondere zur Prostata. Bundesgesundheitsblatt 33:401-404
34. Staib, F. (1962). *Cryptococcus neoformans* und *Guizotia abyssinica*. Zeitschrift f. Hygiene 148: 466-475.
35. Staib, F. (1987). Kryptokokkose bei AIDS aus mykologisch-diagnostischer und -epidemiologischer Sicht. AIFO 2: 363-382.
36. Stendrup, A. (1980). Yeast Ecology. Preusser (eds.): Medical Mycology. Zbl. Bakt. Suppl. 8 Gustav Fisher Verlag Stuttgart-New York.
37. Swinne-Desgain, D. (1975). *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. Sabouraudia, 13: 303-308.
38. ----- (1976). *Cryptococcus neoformans* in the crops of pigeons following its experimental administration. Sabouraudia, 14: 313-317.
39. Swinne, D. (1979). *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. Ann. Soc. belge Méd. trop., 59: 285-299.
40. ----- (1984). Study of *Cryptococcus neoformans* Varieties. Mykosen, 27: 137-141.
41. Toro, S. M.A. & Piontelli, L. E. (1985). Yeast communities in sandy soils (A beach of V Region, Chile) II. Boletín Micológico 2: 109-118.
42. Youmans, G.P., Paterson, P.Y., Sommers, H.M. (1985). The biological and clinical basis of Infectious Diseases. Third Edition. W.B. Saunders Company Philadelphia.
43. Zaror, L., Vargas, P., Nuñez, M.C. (1981). Búsqueda de *Cryptococcus neoformans* y otros hongos levaduriformes en la ciudad de Valdivia. 1980. Boletín del Instituto de Salud Pública, 22: 69-74.