

Cryptococcus neoformans en excretas de palomas del perímetro urbano de Cali¹

Luz Dary Caicedo B., M.Sc.², María Inés Alvarez V., M.Sc.³, Carmen Elisa Llanos⁴, Dazuly Molina⁴

RESUMEN

En el perímetro urbano de Santiago de Cali, Colombia, se realizó un estudio con excretas de palomas, con el fin de establecer la presencia de *Cryptococcus neoformans*; para aislar el hongo se utilizó agar semilla de girasol. Se analizó si la presencia del hongo se relacionaba con factores como la cantidad de excretas, el tipo de nido, el número de palomas y el pH. De 119 muestras, 59 (49.6%) presentaron la levadura. Todos los aislamientos correspondieron a *C. neoformans* var *neoformans*. Se estableció que la levadura tiene una amplia distribución en la ciudad y que hay mayor probabilidad de encontrarla en excretas acumuladas ($p < 0.0001$). Los lugares de nidos más frecuentes fueron cajas de madera y cielos rasos; en estos últimos se recuperó el hongo en todas las muestras examinadas. Fue significativa la asociación entre el aislamiento y el sistema de nidación ($p < 0.05$). Se determinó que un número mayor de 15 palomas influye significativamente en el aislamiento del hongo ($p < 0.0039$). El pH no mostró relación estadísticamente significativa. Este trabajo subraya la importancia de emprender campañas que eviten la acumulación de excretas de palomas.

Palabras claves: *Cryptococcus neoformans*. Excretas de palomas. Micología.

La criptococosis es una micosis sistémica de curso subagudo o crónico y de amplia distribución mundial¹; antes del descubrimiento del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se veía en pacientes con enfermedades linforreticulares, afecciones autoinmunes y tratamientos prolongados con corticoesteroides. A partir de 1980 y como consecuencia del SIDA se ha visto un aumento mundial en la incidencia de esta micosis²⁻⁴.

El agente etiológico es una levadura encapsulada, *Cryptococcus neoformans*, que en 1951 se aisló por primera vez del suelo⁵. Luego se estableció que la fuente más importante para el mantenimiento de este hongo en la naturaleza son las excretas de palomas⁶⁻¹⁴.

Cryptococcus neoformans posee dos variedades, *C. neoformans* var *neoformans* y *C. neoformans* var *gattii*, con diferencias bioquímicas que hacen posible su identificación^{15,16}. La variedad *neoformans* se encuentra distribuida a nivel mundial y el nicho ecológico más importante se relaciona con las excretas de palomas; la variedad *gattii* se asocia con desechos provenientes de especies de *Eucaliptus* en áreas tropicales y subtropicales¹⁷⁻¹⁹.

En 1968, un estudio en Medellín, demostró *C. neoformans* en excretas de palomas⁷; luego, en 1994, Ordóñez y Castañeda¹³ informaron su aislamiento en 53.8% de 52 muestras de excretas, obtenidas en distintas ciudades de Colombia, entre ellas Santia-

go de Cali.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de *C. neoformans* en excretas de palomas del perímetro urbano de Santiago de Cali, conocer la variedad del hongo, estudiar su distribución y establecer algunos factores que inciden en su crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron 119 muestras de excretas de palomas (*Columba livia*) en las 20 comunas del perímetro urbano de la ciudad de Santiago de Cali. La elección de los sitios de nidación se hizo mediante búsqueda activa y a partir de información recibida de los habitantes de las distintas comunas.

En cada sitio de muestreo se colectaron aproximadamente 100 g de excretas secas con bajalenguas estériles y se colocaron en bolsas de 30 x 20 cm; después el material se llevó al laboratorio y se procesó el mismo día.

1. Financiado por el Centro de Investigaciones de Biología y Química de la Universidad Santiago de Cali y el Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle, Cali, Colombia.
2. Profesora, Plan Biología y Química, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia.
3. Profesora Titular, Departamento de Microbiología, Escuela de Ciencias Básicas Médicas, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
4. Estudiante de Biología y Química, Universidad Santiago de Cali, Cali, Colombia.

En cada uno de los sitios se determinaron los siguientes parámetros: los tipos de nido, el número de aves, el pH y el grado de acúmulo de las excretas (se definió como poca acumulación cuando se observaban 1 ó 2 capas de excretas y alta con más de 2 capas).

Para procesar las muestras se usó la técnica de Shields y Ajello²⁰, modificada por Pal y Baxter²¹. Se colocaron 10 g de excretas en un frasco al que se le añadieron 90 ml de solución salina estéril al 0.85%, luego se agitó por 5 minutos; se dejó sedimentar por 10 minutos y después se transfirió 1 ml del sobrenadante a un tubo con 9 ml de solución salina estéril. Posteriormente cada dilución se sembró por duplicado en cajas de Petri que contenían agar semilla de girasol como medio diferencial para el aislamiento del hongo a partir de muestras muy contaminadas²¹.

Las cajas se incubaron durante 10 días a 25° C y se examinaron diariamente para visualizar el crecimiento de levaduras de color café, presuntivas de *C. neoformans*; luego, éstas se subcultivaron en tubos con agar dextrosa de Saboraud. *C. neoformans* se identificó con base en los criterios establecidos como termotolerancia, hidrólisis de la urea, asimilación de azúcares y nitratos²¹. La variedad del *C. neoformans* se estableció con el medio de cultivo L-canavanina glicina azul de bromotimol (CGB)²³.

Los resultados se incluyeron en una base de datos y se realizaron análisis mediante el paquete estadístico EPI INFO. Se utilizaron la prueba exacta de Fischer y el Chi² con la corrección de Yates; se consideró un nivel $p < 0.05$ como significativo.

RESULTADOS

Se aisló *C. neoformans* en 59 (49.6%) de 119 muestras procesadas

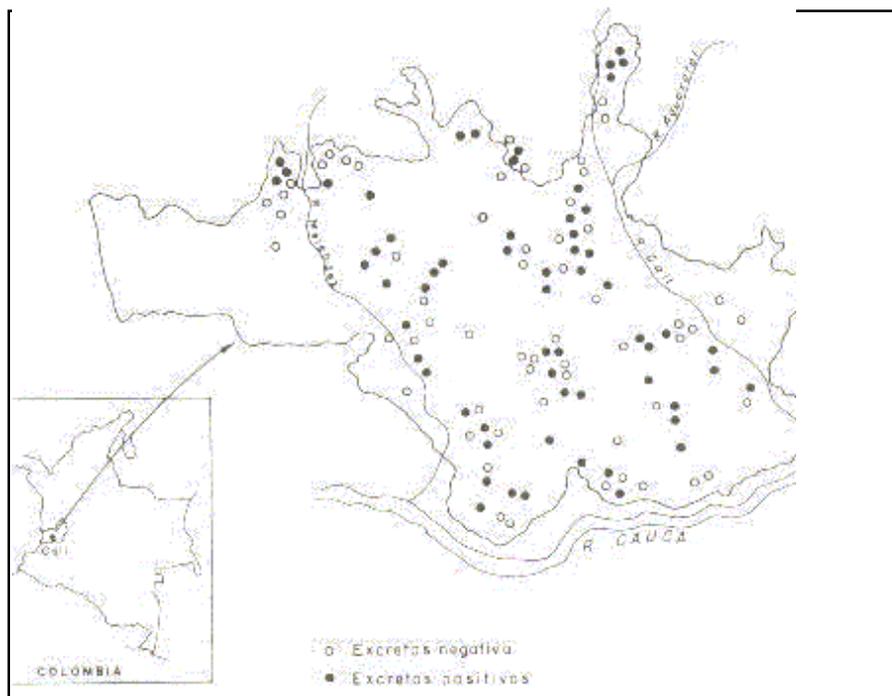


Figura 1. Sitios de recolección de excretas de palomas en el perímetro urbano de Cali.

y todos los aislamientos correspondieron a *C. neoformans* variedad *neoformans*. Se halló una distribución muy amplia del hongo en la ciudad (Figura 1).

Los lugares donde se encontraron los nidos se agruparon en cielo rasos, techos de casas, cajas de madera y otros (estructuras en cemento, debajo de lavaderos, sobre árboles, etc.). Todos los cielos rasos y techos presentaron excretas acumuladas. En el Cuadro 1 se aprecia una relación significativa entre el lugar del nido y el aislamiento del hongo. De los 6 techos examinados, todos fueron negativos, un hallazgo estadísticamente significativo (p exacta de Fisher = 0.027) cuando se comparó con el resto de los 113 sistemas de nidación examinados, de los cuales 54 (48%) fueron negativos. Todos los 14 cielos rasos examinados fueron positivos, en contraste con una cifra relativa de positividad de 43% en los restantes sistemas de nidación. Esta diferencia también fue estadísticamente signifi-

cante (Chi² con 1 grado de libertad = 13.93; $p = 0.00018$).

Respecto al número de palomas hubo un rango entre 2 a 300, con una mediana de 15. Para el análisis estadístico el número de aves se clasificó en <15 y ≥ 15 , y se observó un mayor aislamiento de la levadura en los sitios de muestreo con más de 15 palomas (Cuadro 2).

El Cuadro 3 muestra que otro factor importante para el aislamiento del hongo fueron los nidos con excretas acumuladas. De los 59 nidos hallados positivos sólo 8 correspondieron a excretas secas poco acumuladas.

El rango de pH en las excretas de palomas estuvo entre 5.5 y 8.5; no se pudo establecer una diferencia estadísticamente significativa entre el pH y el aislamiento del hongo.

DISCUSIÓN

En la revisión de la literatura nacional se encontraron sólo dos artículos relacionados con la presencia de

Cuadro 1
Aislamiento de *C. neoformans* en relación con el lugar del nido

Lugar del nido	Aislamiento		Total (%)
	- (%)	+ (%)	
Techos y cielos rasos	6 (30.0)	14 (70.0)	20 (16.8)
Cajas de madera	32 (48.5)	34 (51.5)	66 (55.5)
Otros	22 (66.7)	11 (33.3)	33 (27.7)
Total	60 (50.4)	59 (49.6)	119 (100.0)

Chi² con 2 grados de libertad = 6.92; p < 0.05

Cuadro 2
Aislamiento de *C. neoformans* en relación con el número de palomas

# de palomas	Aislamiento		Total (%)
	- (%)	+ (%)	
< 15	34 (66.7)	17 (33.3)	51 (42.8)
≥ 15	26 (38.2)	42 (61.8)	68 (57.1)
Total	60 (50.4)	59 (49.6)	119 (100.0)

Chi² (corrección de Yates) con 1 grado de libertad = 8.32; p = 0.0039

Cuadro 3
Aislamiento de *C. neoformans* en relación con la cantidad de excretas

Cantidad de excretas	Aislamiento		Total (%)
	- (%)	+ (%)	
Alta acumulación	7 (12.1)	51 (87.9)	58 (48.7)
Poca acumulación	53 (86.9)	8 (13.1)	61 (51.3)
Total	60 (50.4)	59 (49.6)	119 (100.0)

Chi² (corrección de Yates) con 1 grado de libertad = 63.61; p < 0.0001

C. neoformans en excretas de palomas; uno, en el área urbana de Medellín, donde se obtuvo el aislamiento del hongo en 18.8% de las muestras⁷; el otro corresponde al trabajo de Ordóñez y Castañeda¹³ donde informaron el hallazgo de la levadura en 28 (53.8%) de 52 muestras de excretas de palomas. Hubo 4 aislamientos en Bogotá, 5 en otros municipios de Cundinamarca, 8 en Cúcuta y 11 en Cali, que fue el primer indicio de la importancia de las excretas de palomas en esta ciudad.

El presente estudio determinó con un muestreo mayor una cifra alta (49.6%) de aislamientos de **C. neoformans** en heces de palomas; además, demostró una amplia distribución del hongo en el perímetro urbano de la ciudad.

En el Cuadro 3 se observa que un alto acúmulo de heces constituye un elemento importante para la presencia del hongo, que está de acuerdo con otros investigadores que afirman que este factor es necesario para mantener el hongo en la naturaleza^{24,25}. En el presente trabajo se encontró que en los techos y en los cielos rasos las excretas tenían una acumulación alta; sin embargo, sólo se aisló el hongo en los cielos rasos. Aunque el número de muestras en estos sitios fue pequeña (6 techos y 14 cielos rasos) quizá la ausencia de **C. neoformans** en los techos se debe a la acción letal que ejercen los rayos ultravioletas del sol sobre la levadura, pues limitan así su crecimiento²².

Se observó que los sitios donde había una alta densidad de palomas (≥15) se aisló **C. neoformans** con más frecuencia, quizá como un resultado directo de la mayor cantidad de excretas, que se pueden acumular en forma rápida y brindar al hongo las condiciones adecuadas para su crecimiento. Es también importante tener en cuenta que la cantidad de heces aumenta durante la época de incubación de los huevos y crianza de los polluelos, pues a diferencia de otras aves, como la paloma no retira la materia fecal de los nidos, esto permite que se formen pilas del sustrato en los sucesivos períodos de reproducción²⁵.

Los registros del laboratorio de micología del Hospital Universitario del Valle (HUV), Cali, Colombia³ mostraron que la criptococosis ha aumentado notoriamente a partir de 1988 debido a los casos SIDA; casi todos los casos de la micosis asociada con el SIDA se deben a **C. neoformans** var **neoformans**^{9,26,27} que fue la variedad encontrada en las excretas de palomas. Por tanto, se acentúa el riesgo potencial que tienen estos pacientes de adquirir la criptococosis en el ambiente urbano de Cali. Por último, se recomienda tomar medidas que eviten la acumulación de las excretas de palomas en la ciudad.

SUMMARY

A study to determine the presence of **Cryptococcus neoformans** in pigeon (**Columba livia**) droppings was carried out in the urban perimeter of Cali. The fungus was isolated with sunflower agar. Relationships between presence of the fungus and factors like type of nest, number of pigeons, amount of excreta and pH were studied. **C. neoformans** var. **neoformans** was isolated from 59 (49.6%) of 119 samples obtained from different districts of the city, presenting a wide distribution. Wooden boxes and flat ceilings were the types of nests more abundant, in the latter all samples were positive. Statistically significant association of **C. neoformans** and the nest type was found (p < 0.05). Also the possibility of finding

the yeast was higher in accumulated excreta ($p < 0.0001$), as well as in nests with more than 15 pigeons present ($p < 0.0039$). No significant relationship was found with pH. This paper points out the importance of undertaking campaigns to avoid the accumulation of pigeon feces.

REFERENCIAS

- Ordóñez N, Castañeda E. La criptococosis y su agente etiológico. *Medicas UIS* 1992; 6: 207-15.
- Arango M, De Bedout C, Restrepo A. Incremento de la criptococosis en asociación con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. (SIDA). *Acta Med Col* 1990; 15: 84-91.
- Álvarez MI, González LA. Criptococosis e histoplasmosis en el Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia. *Colombia Med* 1995; 26: 61-5.
- Clark R, Greer D, Atkinson W et al. Spectrum of **Cryptococcus neoformans** infection in 68 patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 768-77.
- Emmons CW. Isolation of **Cryptococcus neoformans** from soil. *J Bacteriol* 1951; 27: 652-63.
- McDonough ES, Lewis AL, Penn LA. Relationship of **Cryptococcus neoformans** to pigeons in Milwaukee, Wisconsin. *Publ Health Rep* 1966; 81: 1119-22.
- Mira CA, Anzola R, Martínez A, Llinás R, Valencia C, Restrepo A. Aislamiento de **Cryptococcus neoformans** a partir de materiales contaminados con excretas de palomas en Medellín, Colombia. *Antioquia Med* 1968; 18: 33-40.
- Pérez-Ramos S, Gutiérrez J. Isolement et identification d'especies de **Cryptococcus** des fientes de biseaux. *Rev Epidem Santé Publ* 1982; 30: 399-403.
- Swinne D. Ecology of **Cryptococcus neoformans** and epidemiology of cryptococcosis in the Old World. In Torres-Rodríguez JM (ed.) *Proceedings of the X Congress of International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM)*. Barcelona, June-July 1988, pp. 113-119.
- Rubisntein H, Marticorena B, Masih D et al. Isolation of human fungi from soil and identification of two endemic areas of **Cryptococcus neoformans** and **Coccidioides immitis**. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1989; 31: 1-6.
- Ruiz A, Vélez D, Fromtling RA. Isolation of saprophytic **Cryptococcus neoformans** from Puerto Rico. Distribution and variety. *Mycopathologia* 1989; 106: 167-70.
- Swinne DM, Deppner M, Maniratunga S, Laroche R, Floch JJ, Kadenge P. AIDS-associated cryptococcosis in Bujumbura, Burundi: an epidemiological study. *J Med Vet Myc* 1991; 29: 25-30.
- Ordóñez N, Castañeda E. Serotipificación de aislamientos clínicos y del medio ambiente de **Cryptococcus neoformans** en Colombia. *Biomédica* 1994; 14: 131-39.
- Castañón-Olivares LR, López-Martínez R. Isolation of **Cryptococcus neoformans** from pigeon (**Columba livia**) droppings in Mexico city. *Mycoses* 1994; 37: 325-27.
- Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Theodore TS. Biochemical differences between serotypes of **Cryptococcus neoformans**. *Sabouraudia* 1978; 16: 167-74.
- Polacheck I, Kyung J, Kwon-Chung J. Creatinine metabolism in **Cryptococcus neoformans** and **Cryptococcus bacillispora**. *J Bacteriol* 1980; 142: 15-20.
- Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of **Cryptococcus neoformans** var **gattii**. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1642-44.
- Ellis DH, Pfeiffer TJ. Environmental isolation of **Cryptococcus neoformans** var **gattii** from California. *J Infect Dis* 1991; 163: 929-30.
- Pfeiffer TJ, Ellis D. H. Environmental isolation of **Cryptococcus neoformans** var **gattii** from **Eucalyptus tereticornis**. *J Med Vet Mycol* 1992; 30: 407-08.
- Shields AB, Ajello L. Medium for selective isolation of **Cryptococcus neoformans**. *Science* 1966; 151: 218-23.
- Pal M, Baxter M. Isolation of **Cryptococcus neoformans** using a simplified sunflower seed medium. *Proc NZ Microbiol Soc* 1985; 29: 155-58.
- Rippon JW. *Medical mycology. The pathogenic fungus and the pathogenic actinomycetes*. 3rd. ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 1988.
- Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of **Cryptococcus neoformans** var **neoformans** (serotype A and D) and **Cryptococcus neoformans** var **gattii** (serotype B and C). *J Clin Microbiol* 1982; 15: 535-37.
- Silva M, Luiza P. Isolamento de **Cryptococcus neoformans** de excrementos e ninhos de pombos (**Columba livia**) em Salvador, Bahia (Brasil). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1963; 5: 9-11.
- Emmons C. Saprophytic sources of **Cryptococcus neoformans** associated with the pigeon **Columba livia**. *Am J Hyg* 1955; 62: 227-32.
- Rinaldi MG, Durtz DJ, Howell A, Sande MA, Wosfy CB, Hadley WK. Serotypes of **Cryptococcus neoformans** in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1986; 153: 642.
- Shimizu RY, Howard DH, Clancy MN. The variety of **Cryptococcus neoformans** in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1986; 154: 1042.