

## Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en excrementos de paloma de Castilla (*Columba livia*) provenientes de lugares públicos de El Salvador

### (Isolation of *Cryptococcus neoformans* from droppings of the Feral Pigeon (*Columba livia*) found in public places in El Salvador)

Guillermo Funes<sup>1</sup>, Cristian Mata-Delgado<sup>2</sup>, Daniela Jaikel-Viquez<sup>3</sup>,  
Zoila Virginia Guerrero-Mendoza<sup>4</sup>

#### Resumen

**Objetivo:** El objetivo de este estudio fue aislar levaduras pertenecientes al complejo de especies *Cryptococcus neoformans* de los excrementos de paloma de Castilla (*Columba livia*) recolectados de plazas y parques públicos de El Salvador. **Métodos:** Las muestras se sembraron en medios de cultivos convencionales y a las colonias confirmadas se les efectuó una tipificación mediante la técnica de restricción enzimática del gen *URA5*. **Resultados:** De un total de 66 muestras analizadas, tres estaban positivas por levaduras pertenecientes al complejo de especies *Cryptococcus neoformans*. El estudio molecular agrupó los aislamientos en los tipos moleculares VNI y VNII; ambos corresponden a la especie *Cryptococcus neoformans sensu stricto*. **Conclusión:** En los sitios estudiados, la presencia de esta levadura es muy reducida, probablemente debido a factores ambientales. Se presenta el primer reporte de *Cryptococcus neoformans sensu stricto*, genotipos VNI y VNII en El Salvador, esta especie es de relevancia en salud pública por el ser el responsable de más del 90% de los casos de criptococosis a nivel mundial.

**Descriptor:** *Cryptococcus neoformans*, *Columba livia*, genotipo, zoonosis, salud pública.

#### Abstract

**Aim:** The objective of this study was to isolate yeast that belonged to the *Cryptococcus neoformans* species complex from the feces of the Feral Pigeon (*Columba livia*), from public places in El Salvador. **Methods:** Samples were seeded in conventional culture media and confirmed colonies were typed using the enzyme restriction technique of the *URA5* gene. **Results:** Of a total of 66 samples analyzed, three were positive for yeasts that belonged to the *Cryptococcus neoformans* species complex. The molecular study grouped the isolates in the molecular types VNI and VNII; both belonging to the species *Cryptococcus neoformans sensu stricto*. **Conclusions:** In the studied sites the presence of this yeast is very low, probably due to environmental factors. We present the first report of *Cryptococcus neoformans sensu stricto* genotypes VNI and VNII in El Salvador. This specie is relevant in public health for being responsible for more than 90% of cases of cryptococcosis worldwide.


**Keywords:** *Cryptococcus neoformans*, *Columba livia*, genotype, zoonoses, public health.

**Fecha recibido:** 10 de diciembre 2021


**Fecha aprobado:** 07 de abril 2022

#### Afiliación Institucional:


<sup>1</sup> Universidad de El Salvador, Escuela de Biología, San Salvador, El Salvador.

 0000-0002-0646-2367

<sup>2</sup> Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Sección de Micología Médica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica.

 0000-0001-7275-2146

<sup>3</sup> Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Departamento de Microbiología e Inmunología, Sección de Micología Médica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica.

 0000-0002-3553-5393

<sup>4</sup> Universidad de El Salvador, Escuela de Biología, San Salvador, El Salvador.

 0000-0003-3248-791X

**Fuentes de apoyo:** ninguno.

**Conflictos de interés:** los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

✉ guilleffunes@gmail.com



Esta obra está bajo una licencia internacional: Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0.

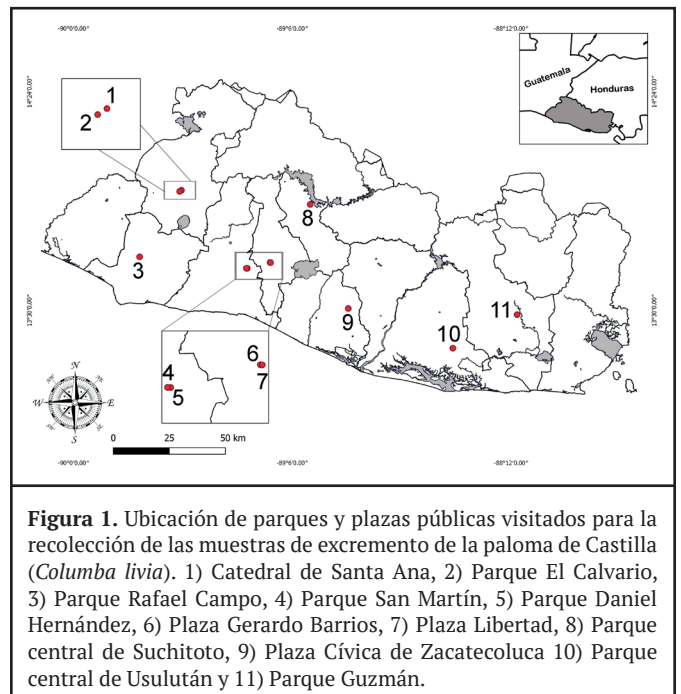
Las palomas, por lo general, han sido consideradas como símbolo de paz. La paloma de Castilla (*Columba livia*) es considerada un animal inofensivo y uno de los que tiene mayor contacto con los humanos, no obstante, son potenciales transmisores de enfermedades y causantes del deterioro de monumentos y edificios en ciudades de todo el mundo.<sup>1,2,3</sup> Esta especie de paloma porta 60 diferentes organismos patógenos, de los cuales, cinco son transmitidos a seres humanos con regularidad. Entre esos cinco, el complejo de especies *Cryptococcus neoformans* (conformado por *C. neoformans sensu stricto*, anteriormente conocido como *C. neoformans* var. *grubii* y por *C. neoformans*, anteriormente *C. neoformans* var. *neoformans*) ocupa el segundo lugar en frecuencia.<sup>2,4,5</sup>

Esta levadura patógena es causante de la criptocosis, una micosis oportunista cuyos síntomas más notorios para la forma meníngea son dolor de cabeza y disturbios visuales. Dado que generalmente la criptocosis se manifiesta en personas inmunodeficientes, se le considera una enfermedad asociada con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) por lo que deben indicarse pruebas para detectar al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) siempre que se aísla una especie perteneciente al complejo de especies *C. neoformans* a partir de muestras clínicas.<sup>6,7</sup> En algunos pacientes existen ciertas condiciones (como criptocemia y presión intracraneal alta) que elevan la probabilidad de que la criptocosis resulte mortal.<sup>7</sup> En El Salvador, se registraron más de 500 casos de criptocosis entre 2009 y 2019; de éstos, 43 fueron casos fatales (Ministerio de Salud de El Salvador).

A pesar de que se desconocen los sitios de contagio y el vínculo de esta especie de paloma con casos como estos, los lugares públicos frecuentados por ellas podrían ser potenciales focos de contagio. Por tanto, dado que los lugares públicos visitados en este estudio son frecuentados por un gran número de personas para diversas actividades, el riesgo de exposición podría representar un peligro para la salud de las personas, especialmente de personas inmunodeficientes. El objetivo del estudio fue aislar levaduras pertenecientes al complejo de especies *C. neoformans* de los excrementos de paloma de Castilla (*C. livia*), por medio de muestras recolectadas en una selección de parques y plazas públicas de El Salvador.

## Métodos

**Recolección de las muestras:** Esta investigación fue observacional, cualitativa; los sitios de estudio se eligieron a conveniencia. La recolección de las muestras fecales de paloma de Castilla (*C. livia*), se realizó en lugares con una gran afluencia de personas y palomas (atrio de catedrales, plazas y parques públicos) a través de los ocho departamentos más densamente poblados de El Salvador, según el último censo poblacional llevado a cabo por la Dirección General de Estadísticas y Censos en 2008, los cuales son: San Salvador, La Libertad, Santa Ana, Sonsonate, San Miguel, Usulután, La Paz y Cuscatlán (Figura 1).



Se recolectaron excrementos siempre que hubo comprobación efectiva de que pertenecían a palomas de Castilla (*C. livia*). Se tomaron en cuenta aspectos como la morfología de los excrementos de esta especie para evitar recolectar material fecal de otra especie. Cada sitio de estudio se visitó durante el transcurso de la mañana, desde la 7:00 a. m y hasta las 12:00 m. Se utilizaron pequeñas espátulas plásticas estériles, una por cada muestra recolectada. Se tomaron dos muestras de excrementos por sitio. Se realizaron tres viajes de recolecta a cada sitio cada dos semanas. Todas las muestras obtenidas mediante la recolección con la espátula se depositaron en bolsas plásticas estériles Ziploc® y se transportaron

en un contenedor plástico seco el mismo día o el día posterior de su recolección hacia los laboratorios del Centro de Investigaciones y Desarrollo en Salud ubicado en las instalaciones de la Universidad de El Salvador para ser procesadas.

#### **Aislamiento del complejo *C. neoformans*:**

Para aislar e identificar al complejo *C. neoformans*, se siguió la metodología detallada en un estudio previo en El Salvador.<sup>8</sup> Primero, se colocaron las excretas en un frasco con 30 mL de solución salina al 0.85%. Luego este se depositó en un agitador magnético, se revolvió el contenido 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 al 0.85%. Se tomó 0.1 mL de los 10 mL resultantes y se colocó sobre cajas Petri con Agar Semilla de Girasol expandido con una espátula de Driglaski; este es un medio de cultivo selectivo y diferencial, simple de preparar y sin mayores costos.<sup>9</sup> Seguidamente, se incubó a 37 °C de 3 a 7 días.

Se tomaron muestras de las colonias circulares café que crecieron en el Agar Semilla de Girasol y se sembraron en tubos de ensayo con Agar Glucosado Sabouraud en biselado mediante la técnica de estriado con un asa y se incubaron a 28°C. Las colonias sospechosas se enviaron a la Sección de Micología Médica de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica para la confirmación de la especie. A fin de preparar los aislamientos para su envío, se tomó una muestra de las colonias sospechosas en Agar Glucosado Sabouraud y se colocó en un tubo cónico de 1.5 mL con un 1.0 mL de solución salina estéril al 0.85% y debidamente rotulado.

**Caracterización fenotípica de los aislamientos de *Cryptococcus*:** En la Sección de Micología Médica de la Universidad de Costa Rica, a los aislamientos sospechosos se les practicó una serie de pruebas fenotípicas con el fin de verificar su pureza y la correcta clasificación dentro del complejo *C. neoformans*. Se les efectuó una tinción negativa con tinta china, fueron inoculados en Agar Urea de Christensen, en agar L-Dopa y en agar canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Además, se les realizó una determinación del perfil bioquímico con API® 20 C AUX (BioMérieux, Francia).

**Caracterización genotípica de los aislamientos de *Cryptococcus*:** Para la caracterización genotípica de los aislamientos de *Cryptococcus*, se siguió la metodología descrita por Jaikel-Viquez y colaboradores<sup>10</sup>: una extracción de ADN genómico por medio de la técnica de choque térmico. La tipificación se ejecutó con la técnica de RFLP del gen *URA5*, con las enzimas Sau96I y HhaI (Thermo Scientific, Estados Unidos), utilizando 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'). Como controles positivos se recurrió a las cepas de *Cryptococcus* WM 148 (VNI), WM 626 (VNII), WM 628 (VNII), 629 (VNIV), WM 179 (VGI), WM 178 (VGII), WM 161 (VGIII) and WM 779 (VGIV), del Westmead Institute for Medical Research, de Sydney, Australia.

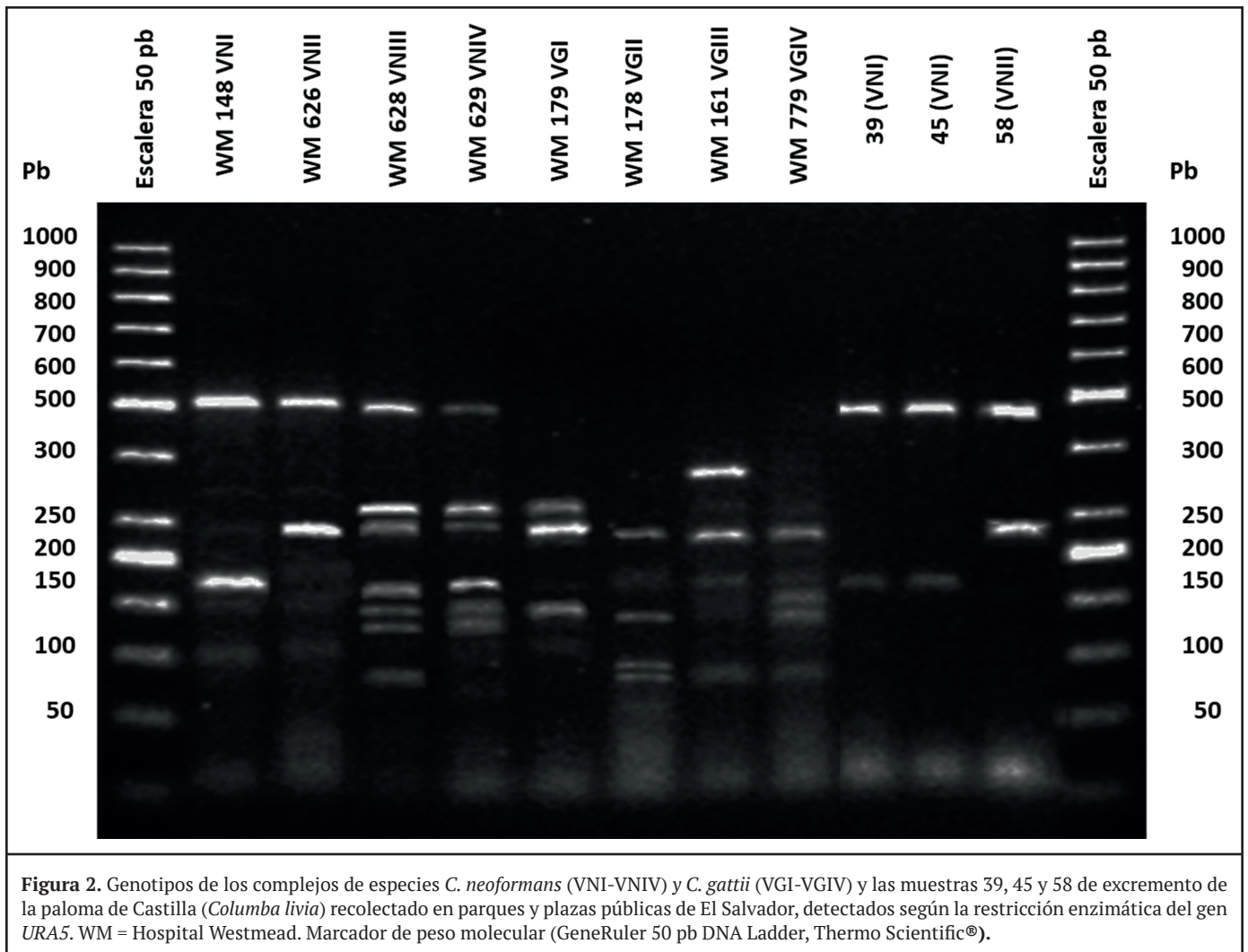
---

## Resultados

---

Se analizó un total de 66 muestras de excrementos, de las que se aislaron ocho colonias sospechosas. De estas ocho, solo a tres se les observó cápsula, hidrólisis de la urea y producción de melanina; por lo tanto, fueron clasificadas preliminarmente como *Cryptococcus* sp. Tras el perfil bioquímico, se determinó que los aislamientos pertenecían a los complejos de especies *C. neoformans* y *C. gattii*. A través del empleo del crecimiento en CGB se corroboró la clasificación dentro del complejo de especies *C. neoformans*. Mediante la restricción enzimática, se identificó la especie y el tipo molecular con los siguientes patrones de restricción: VNI (muestras 39 y 45) y VNII (muestra 58), como se muestra en la figura 2; siendo dos de los tres tipos moleculares conocidos del complejo *C. neoformans* y ambos pertenecen a la especie *C. neoformans sensu stricto*.

De los 11 sitios estudiados, solo en tres se encontró la presencia de *C. neoformans sensu stricto*, estos lugares fueron: Parque Rafael Campos (departamento de Sonsonate), Plaza Cívica (La Paz) y Parque Calvario (Santa Ana). Se encontró una muestra positiva en cada sitio; el tipo molecular VNI se encontró en la Plaza Cívica y El Calvario y la VNII en el parque Rafael Campos.



## Discusión

Con el presente estudio, se identificó la presencia de *C. neoformans* en un 4.5% de las muestras de excremento de las palomas de parques públicos. Este resultado es comparable con estudios de Perú y México, donde se evidenció que la presencia de *C. neoformans* fue de 13.7% y 5% respectivamente.<sup>12,13</sup>

En un estudio previo llevado a cabo en El Salvador, se aisló el hongo en 36.5% de las muestras analizadas.<sup>8</sup> En este, los autores analizaron muestras provenientes de lugares públicos y también provenientes de nidos de palomas; todas las muestras analizadas provenientes de nidos

resultaron positivas. Sin embargo, en el presente estudio no se analizaron muestras provenientes de nido.<sup>8,11,13</sup> Se ha observado que los estudios con alto porcentaje de aislamiento de *C. neoformans* han obtenido muestras de nidos o palomas enjauladas, donde los excrementos se acumulan y hay más probabilidades de que *C. neoformans* se desarrolle.<sup>13,14</sup>

Como se ha mencionado, este estudio examinó muestras del suelo o repisas de monumentos y estructuras de los parques y plazas, que se encuentran más cerca de las personas que visitan estos lugares, por esa razón no se tomaron muestras de nidos. El piso (o superficies expuestas) de los parques y plazas que reciben buena radiación solar y altas temperaturas, como la mayoría de



los sitios muestreados para esta investigación, son poco propicios para que en los excrementos de paloma se desarrolle *C. neoformans*.<sup>15,16,17,18</sup> Los factores ambientales y la limpieza llevada a cabo en algunos parques (lo que previene la acumulación de excrementos) ayudan a explicar el hecho que solo en tres de 66 muestras fuera posible confirmar la presencia de esta levadura.

En cuanto a los genotipos encontrados, los hallazgos de este estudio concuerdan con el hecho de que la especie *C. neoformans* (VNI y VNII) es la especie del complejo que más prevalece en el ambiente; además, fue la aislada con mayor frecuencia en un estudio que analizó muestras de varios países de América Latina: 93.3% en Guatemala y 69.6% en México.<sup>19</sup> 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.<sup>19,20,6</sup>

Los hallazgos en este estudio permiten sugerir que factores como la radiación solar y la limpieza no dejan mucho margen al desarrollo de *C. neoformans sensu stricto*. Aunque en este estudio no se cuenta con datos ambientales para analizar cómo estos factores influyeron en la presencia de esta levadura, ciertamente las personas inmunodeficientes podrían ver en riesgo su salud al visitar lugares con presencia de esta paloma y con poca radiación solar o limpieza. Sin duda, futuros estudios podrían evaluar la relación entre esta levadura y los factores ambientales en lugares públicos; por lo que es importante seguir profundizando en los estudios sobre los espacios públicos y esta especie de paloma, con el propósito de disponer de más elementos objetivos que contribuyan a mejorar las políticas de salud pública en centros urbanos, donde cientos de individuos de esta especie de paloma interactúan a diario con las personas que residen en ellos.

---

### Agradecimientos

---

Al personal de Centro de Investigaciones y Desarrollo en Salud (CENSALUD) por brindar el espacio y los materiales necesarios para trabajar en la investigación. Al personal del Departamento de Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador, por su apoyo y asesoría metodológica.

---

### Referencias

---

1. González-Acuña D, Silva F, Moreno L, Cerda F, Donoso S, Cabello J, *et al.* Detección de algunos agentes zoonóticos en la paloma doméstica (*Columba livia*) en la ciudad de Chillán, Chile. *Rev Chilena Infectol* 2007; 24: 199-203. DOI: 10.4067/s0716-10182007000300004.
2. Magnino S, Haag-Wackernagel D, Geigenfeind I, Helmecke S, Dovc A, *et al.* Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: review of data and focus on public health implications. *Vet Microbiol* 2008; 135: 1-43. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.09.045.
3. Pimentel D, Zuniga R, Morrison D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecol Econ* 2005; 52: 273-288. DOI: 10.1016/j.ecolecon.2004.10.002
4. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo, KR, *et al.* The case for adopting the “Species Complex” Nomenclature for the etiologic agents of Cryptococcosis. *mSphere* 2017; 2: e00357-16. DOI: 10.1128/mSphere.00357-16
5. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sianov, E, *et al.* Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol* 2015; 78: 16-48. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.02.009
6. Mitchell TG, Perfect JR. Cryptococcosis in the Era of AIDS—100 Years after the Discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995; 515-548. DOI: 10.1128/CMR.8.4.515
7. Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with Cryptococcosis according to immune status. *PloS One* 2013; 8: 1-7. DOI: 10.1371/journal.pone.0060431.
8. Ayala de Chavarría D, López de Henríquez FM, Valencia de Recinos RE. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras del ambiente contaminadas con excrementos de palomas en diferentes zonas en El Salvador. *Minerva Rev en Línea CIC-UES* 2011; 2: 21-27.
9. Katiyar R, Deorukhkar SC, Saini S. Comparison of different media for the pigment production of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin and Diagn Res* 2011; 5: 1187-1189.

10. Jaikel-Viquez D, Uribe-Lorío L, Gross NT. Tipificación molecular y susceptibilidad in vitro frente a fluconazol de aislamientos clínicos costarricenses del complejo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. Rev Panam Enf Inf 2018; 1: 12-20.
11. Curo M, Salinas M, Casquero J. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas, suelo y aire de los palomares del perímetro urbano de Ica. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2005; 22: 262-266.
12. Canónico-González Y, Adame-Rodríguez JM, Mercado-Hernández R, Aréchiga-Carvajal ET. *Cryptococcus* spp. isolation from excreta of pigeons (*Columba livia*) in and around Monterrey, Mexico. Springerplus 2013; 2: 632. DOI: 10.1186/2193-1801-2-632
13. Caecido LD, Álvarez MI, Llanos CE, Molina D. *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas del perímetro urbano de Cali. Colomb Med 1996; 27: 106-109.
14. Colom-Valiente MF, Alberdi M, Meseguer I, Torres-Rodríguez JM. Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras de medio ambiente de Alicante. Rev Iberoam Micol 1997; 14: 63-64.
15. Isahq C., Bulmer G, Felton F. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. Mycopathol Mycol Appl 1967; 35: 81-90.
16. Levitz SM. The Ecology of *Cryptococcus neoformans* and the Epidemiology of Cryptococcosis. Rev Infect Dis 1991; 13: 1163-1169.
17. Quinteros E, Castañeda E, Ruiz A. Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca-Colombia. Rev Iberoam Micol 2005; 22: 93-98.
18. Ruiz A, Fromtling RA, Bulmer GS. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a Natural Site. Infect Immun 1981; 31: 560-563.
19. Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, IberoAmerican Cryptococcal Study Group. Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates. Emerg Infect Dis 2003; 9: 189-195.
20. Ellis D, Marriott D, Hajjeh RA, Warnock D, Meyer W, Barton R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. Med Mycol 2000; 38: 173-182.