

AISLAMIENTO DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS DE EXCRETAS DE PALOMA EN LA CIUDAD DE GUATEMALA

(Trabajo presentado en el III Congreso Centroamericano y I Nacional de Microbiología. Guatemala 25-30 julio 1971).

Rubén Mayorga*

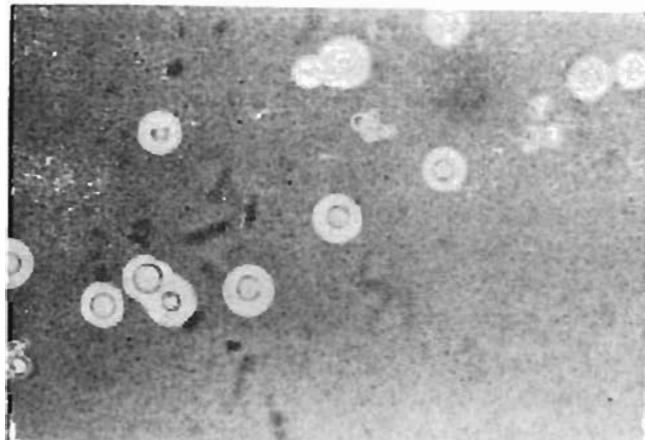
Milvia P. de Ortega**

Leonardo J. Mata***

INTRODUCCION

La criptococosis es una micosis sistémica causada por un hongo levaduriforme, *Cryptococcus neoformans*, constituido por células esféricas, de 4 a 20 micras de diámetro, que producen gemaciones en cualquier sitio de su superficie. Tiene la característica peculiar de presentar una cap-

FIGURA No. 1



Aspecto microscópico de *Cryptococcus neoformans* (Cultivo No. 15). Montaje en tinta china. 250 X

sula mucoide, la cual varía de espesor pudiendo llegar a ser varias veces mayor que el diámetro de la propia célula. (figura 1).

La existencia saprofítica de este hongo en la naturaleza, fue demostrada por Sanfelice en 1894 (1). Casl al mismo tiempo, Busse (2, 3) y Buschke (4) lo encontraron asociado a la patología humana. Fue considerado al principio de distribución geográfica reducida, pero después de que Emmon (5) lo aisló del suelo en 1951, otros investigadores han mostrado su carácter cosmopolita y su notable relación con excretas de paloma (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14). Como posible explicación de esta relación, se ha mencionado que de los constituyentes de la orina de estas aves, el Ácido úrico, la xantina y la guanina, son asimilados por todas las especies del género *Cryptococcus*, mientras que la creatinina es asimilada solamente por *C. neoformans*. Levaduras de otros géneros son incapaces de utilizar la creatinina como fuente de nitrógeno. Este substrato, además, mantiene un grado de acidez conveniente para la vida de *C. neoformans*, e inconveniente para una gran cantidad de microorganismos competidores (15, 16). Experimentalmente, ha sido comprobado que el hongo tiene una gran resistencia a varios agentes físicos. Se ha demostrado que resiste temperaturas de 80°C. por 24 horas, en arena seca. A temperatura ambiente, las células permanecen viables y virulentas, aún después de año y medio de almacenamiento (15, 17). La sobrevivencia se aumenta si se protege

* Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.

** Departamento de Investigación Aplicada. Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial.

*** División de Microbiología. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá.

de la luz solar directa y de temperaturas elevadas (17). Llama la atención, sin embargo, que es incapaz de reproducirse en animales cuya temperatura corporal está por encima de 40°C. (18).

La infección en el hombre, se adquiere generalmente por inhalación de las esporas, que del tejido pulmonar pueden pasar, por la vía sanguínea, al cerebro, produciendo meningitis criptococcica. En algunos casos puede diseminarse por esta misma vía hacia otros órganos, incluyendo la piel, formando pequeños focos de aspecto gelatinoso.

La forma más conocida y frecuente es la criptococosis del sistema nervioso central, la cual se manifiesta por cefaleas intermitentes acompañadas de vértigo, dolores frontales, temporales o retro-orbitales intensos, y vómitos. A menudo hay cambios en la personalidad y depresión nerviosa. En un 40% de los casos, se observan trastornos en la visión, nistagmus, fotofobia y papiledema (19). La evolución de la enfermedad puede ser de pocos días o puede durar varios años.

Cuando existen lesiones pulmonares, hay tos con esputo mucoide, a veces sanguinolento, en el cual se puede ver al hongo por examen microscópico directo utilizando tinta china como líquido de montaje, la cual, por contraste, hace prominente la presencia de la cápsula que cubre a la levadura.

Las formas cutáneas se manifiestan por pápulas, pústulas acneiformes o abscesos subcutáneos que tienden a ulcerarse. Por extensión de estas lesiones, pueden verse comprometidas también las mucosas. Cuando el sistema óseo es atacado, las lesiones desarrollan sin proliferación sobre el periostio y llegan hasta la piel, causando focos supurativos.

La criptococosis puede presentarse en individuos "normales", pero se sabe que hay factores predisponentes, especialmente cuando las barreras naturales de defensa se encuentran alteradas por trastornos metabólicos, discrasias sanguíneas, otras enfermedades infecciosas crónicas, incluyendo otras micosis (20, 21, 22, 23), o bien por

tratamientos con esteroides (24, 25). El hombre adquiere la infección independientemente de su edad, sexo, raza u ocupación; sin embargo, se observa con mayor frecuencia en adultos del sexo masculino (26). La posibilidad de que existan infecciones sub-clínicas ha sido señalada por varios investigadores que han detectado anticuerpos circulantes contra *C. neoformans* en personas sanas (27, 28, 29). Los esfuerzos por obtener un antígeno adecuado para efectuar pruebas cutáneas que detecten hipersensibilidad en individuos expuestos a la infección, han dado resultados insatisfactorios (30, 31).

El presente estudio tiene como propósito principal, demostrar la presencia de *C. neoformans* como saprófito en la ciudad de Guatemala, y hacer además, una revisión del tema, señalando los casos de infección humana diagnosticados en nuestro medio.

MATERIAL Y METODOS

El trabajo se realizó en dos etapas: La primera se refiere a la búsqueda del hongo en excretas de paloma en los sitios hechos especialmente para alojarlas en el parque zoológico "La Aurora". La segunda comprende la localización de los sitios de anidamiento de estas aves en el área urbana de la ciudad de Guatemala y la búsqueda de dicha levadura en las excretas acumuladas en ellos.

Primer etapa: Se colectaron 24 muestras de cada una de las cuatro jaulas existentes en el parque zoológico "La Aurora", haciendo un total de 96. Estas fueron procesadas dentro de los tres días después de ser tomadas, de la manera siguiente. Se colocaron 10 gramos en un mortero estéril y se pulverizaron hasta lograr su homogeneización. Cinco gramos de este polvo fueron trasladados a un tubo de 25 x 200 mm. con tapón de rosca y se le agregaron 50 ml. de solución estéril de cloruro de sodio al 0.9%, adicionada de 15,000 unidades de penicilina G cristalina y un miligramo de sulfato de estreptomicina por ml. Se agitaron durante dos minutos y se dejaron en reposo durante una hora. Del sobrenadante se inoculó 0.1 ml. en cada una de tres cajas de petri con medio creatinina-guizotia

(32), modificado por la substitución de 100 mg. de difenilo, por 30 mg. de ortofenil-sulfato de sodio.

Las cajas fueron incubadas a 37°C durante diez días y las colonias pigmentadas de morfología macroscópica compatible con *C. neoformans* fueron pasadas a tubos con medio de sabouraud glucosado. Los cultivos que presentaron características levaduriformes se sometieron a los siguientes estudios de identificación:

- a) **Producción de ureasa.** Los cultivos se inocularon en agar urea de Christensen (33) y se incubaron a 37°C durante 4 días. Los productores de ureasa fueron considerados como especies del género *Cryptococcus*.
- b) **Formación de cápsula in vitro.** Los cultivos positivos para la prueba de ureasa se inocularon en agar infusión de cerebro y corazón y se incubaron durante una semana a 37°C, y luego durante tres semanas más, a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se observaron al microscopio utilizando tinta china como líquido de montaje.
- c) **Pruebas de asimilación de azúcares.** Se hicieron auxanogramas de carbono utilizando glucosa, galactosa, maltosa, lactosa, sacarosa y rafinosa.
- d) **Pruebas de asimilación de nitrato.** Se hicieron auxanogramas de nitrógeno utilizando nitrato de potasio.
- e) **Pruebas de patogenicidad.** Los cultivos cuya prueba de ureasa fue positiva, y que presentaron un patrón de asimilación de azúcares y nitrato igual al de una cepa control de *C. neoformans*, fueron sometidos a la prueba de patogenicidad para el ratón, por inoculación intracerebral de 0.04 ml. por ratón, de una suspensión de células equivalente al tubo No. 8 del nefelómetro de McFarland.

Segunda etapa: Esta comprendió la localización de los sitios donde anidan palomas en el área urbana de la ciudad de Guatemala (excluyendo el parque zoológico "La Aurora"), para lo cual se recorrieron las diversas zonas postales a distintas horas del día, durante veinte días no consecutivos.

De esta manera fueron seleccionados trece puntos y se colectaron seis muestras de excretas en uno de ellos y diez en cada uno de los doce restantes, haciendo un total de 126.

La mayor parte de los sitios estudiados corresponde a iglesias, cuyas partes altas (campanario, torres) utilizan las palomas para anidar, ocho en la zona 1, una en la zona 3 y una en la zona 4. Se investigaron también dos casas de habitación, una en la zona 5 y otra en la zona 8 y un edificio público en la zona 1.

Las 126 muestras de excretas tomadas de estos sitios fueron procesadas de la misma forma como se hizo con las del parque zoológico.

RESULTADOS

Del total de 222 muestras de excreta de paloma se aislaron 56 cepas de *C. neoformans*; 16 corresponden a las colectadas en el parque zoológico La Aurora y 40 a las colectadas en varios edificios del área urbana. En la tabla No. 1 se muestran los resultados obtenidos.

La localización de los lugares donde se tomaron las muestras de excretas y los sitios de donde se logró aislar *C. neoformans*, pueden ser apreciados en el mapa No. 1.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran la amplia distribución de *C. neoformans* en nuestro medio. En Guatemala, la enfermedad ha sido reconocida solamente en dos ocasiones. El primer caso, en 1961, el cual fue confirmado por cultivo, (34) corresponde a un paciente cuyo diagnóstico clínico había sido tuberculosis meningea. El segundo fue encontrado por examen histopatológico en un paciente cuyo diagnóstico clínico había sido desnutrición severa (Hospital Roosevelt, necropsia No. A-62-2283).

Aunque se desconocen datos exactos sobre la prevalencia e incidencia de esta micosis, Littman y Scheierson (7) estiman que en la ciudad de Nueva York ocurren anualmente, entre 5,000 y 15,000 infecciones subclínicas de criptococosis pulmonar. Desde el punto de vista epidemiológico, esta en-

fermedad es comparable con la coccidioidomicosis y la histoplasmosis, con la particularidad de que su agente etiológico tiene una distribución geográfica más extensa. Ajello (35) ha señalado que las estadísticas de mortalidad para estas tres micosis, en los Estados Unidos de Norte América, son aproximadamente iguales (65 por año). En Guatemala, considerada como zona endémica de histoplasmosis (36, 37) y coccidioidomicosis (38, 39) puede asumirse que si *C. neoformans* existe abundantemente como saprófito, las cifras de morbilidad y mortalidad para las tres enfermedades, podrían ser similares. La terapéutica moderna, utiliza constantemente drogas que alteran los mecanismos inmunológicos (especialmente esteroides) y se puede prever que el número de infecciones por *C. neoformans* aumentará en el futuro. Debemos agregar además, que la desnutrición puede ser un factor que predisponga a la infección.

Todos estos hechos sugieren que la criptococcosis debe ser más frecuente en nuestro país y que posiblemente pasa inadvertida o es confundida con otras enfermedades. Es necesario reforzar los conocimientos de Micología Médica por medio de cursos adecuados a los distintos niveles del personal relacionado con Salud Pública, lo cual vendría a resolver en parte, el problema generalizado que ocasiona el diagnóstico de las enfermedades producidas por hongos.

RESUMEN

Utilizando el medio de cultivo descrito por Shields y Ajello en 1966 (32), los autores lograron aislar *C. neoformans* de 56 (25.2%) muestras de excretas de paloma, de un total de 222 que fueron colectadas en distintos lugares del área urbana de la ciudad de Guatemala.

Para seleccionar estos lugares se hizo una investigación previa de los sitios donde anidan estas aves.

En Guatemala se han encontrado, hasta la fecha, únicamente dos casos de cri-

tococcosis humana. Los resultados obtenidos en este estudio, muestran la amplia distribución del hongo en nuestro medio y sugieren que la criptococcosis debe existir con mayor frecuencia que la descrita hasta el momento.

SUMMARY

Using the culture medium described by Shields and Ajello in 1966 (32), the authors isolated *C. neoformans* from 56 (25.5%) out of 222 specimens of pigeon droppings collected from different places within the urban area of Guatemala City.

The places surveyed were mainly the higher parts of churches and other buildings used by pigeons to nest.

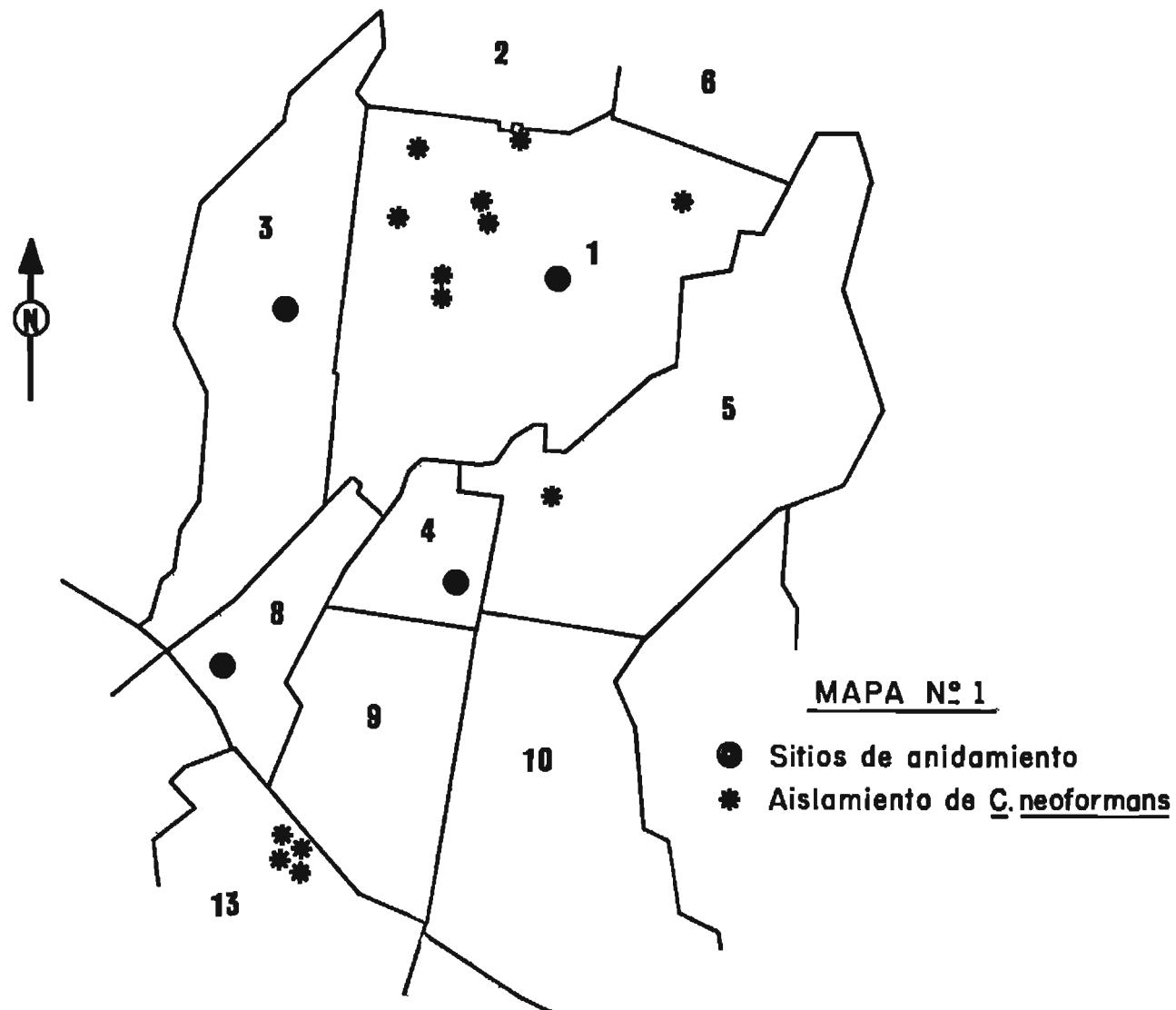
Until now, human infection has been recognized only twice in Guatemala. The results of this investigation clearly show the wide distribution of the fungus in this city, and suggest that cryptococcosis must exist with a greater prevalence than presently described.

TABLA No. 1

	No. de muestras	Cultivos colectados	Porcentaje positivos
Primera etapa	96	16	16.7
Segunda etapa	126	40	31.7
TOTAL	222	56	25.2

BIBLIOGRAFIA

1. Sanfelice, F. (1894). Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei suchi di alcuni frutti. Annali. Insti. Ig. R. Univ. Roma 4:563-495.
2. Busse, O. (1894). Ueber Parasitare Zelleinschlüse und ihre Suchtung. Zentbl. Bakt. Parasit. 16:175-180.



3. Busse, O. (1895). Ueber Saccharomy-cosis hominis. *Virchows Arch. Path. Anat. Physiol.* 140:23-46.
4. Buschke, A. (1895). Ueber eine durch Cocciden hervorgerufene Krankheit des Menschen. *Dt. Med. Wschr.* 21:14.
5. Emmons, C. W. (1951). Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. *J. Bacteriol.* 62:685-690.
6. Ajello, L. (1958). Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in soils. *Am. J. Hyg.* 67:72-77.
7. Littman, M. L. & Schnelerson, S. S. (1969). *Cryptococcus neoformans* in pigeon excreta in New York City. *Am. J. Hyg.* 69:49-59.
8. Rogers, A. L. & Benecke, E. S. (1964). Human pathogenic fungi recovered from Brazilian soils. *Mycopath. Mycol. Appl.* 22:15-20.
9. Schneidau, J. D. (1964). Pigeons and cryptococcosis. *Science* 153:525-526.
10. Godoy, G., Gamuza, C., Marinero, J. & Marin, C. (1965). Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* de muestras de tierra colectadas en El Salvador. *Arch. Col. Med. El Salvador* 19:164-169.
11. Denton, J. F. & Di Salvo, A. F. (1968). The prevalence of *Cryptococcus neoformans* in various natural habitats. *Sabourandia* 6:213-217.
12. Mira, C., Anzola, R., Martinez, A., Llimans R., Valencia, C. & Restrepo A. (1968). Aislamiento de *Cryptoco-coccus neoformans* a partir de materiales contaminados con excretas de paloma, en Medellin, Colombia. *Antioquia Méd.* 18:33-40.
13. Salfelder, K., Schwarz, J., Romero, A., Liscano, T. R., Zambrano, P. & Diaz,

- P. I. (1968). Habitat of *Nocardia asteroides*, *Phialophora pedrosoi* and *Cryptococcus neoformans* in Venezuela. *Mycopath. Mycol. Appl.* 34:144-153.
14. Walter, J. E. & Coffec, E. G. (1968). Primary isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon excreta on three media. *Sabouraudia* 6:165-167.
15. Staib, F. (1963). Report on Meeting of the International Society for Human and Animal Mycology during the 8th International Congress for Microbiology, Montreal. *Mycopath. Mycol. Appl.* 19:143-145.
16. Walter, J. E. & Yee, R. B. (1968). Factors that determine the growth of *Cryptococcus neoformans* in avian excreta. *Amer. J. Epid.* 88:445-450.
17. Ishaq, C. M., Bulmer, G. S. & Felton, F. G. (1968). Environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopath. Mycol. App.* 35:81-90.
18. Emmons, C. W., Binord, C. H. & Utz, J. P. (1963). Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.
19. Fetter, B. F., Klintworth, G. G. & Hendry, W. S. (1967). Mycoses of the Central Nervous System. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, Md.
20. Butler, W. T., Alling, D. W., Spickard, A. & Utz, J. P. (1964). Diagnostic and prognostic value of clinical and laboratory findings in cryptococcal meningitis. *New Eng. J. Med.* 270:59-67
21. Bodey, C. P. (1966). Infectious complications of acute leukemia. *Med. Times* 94:1076-1085.
22. Angulo Ortega, A., Rodriguez, C. & Garcia Galindo, C. (1961). Cryptococcosis in Venezuela. *Mycopath. Mycol. Appl.* 5:367-388.
23. Furculow, M. L. (1962). Opportunism in histoplasmosis. *Laboratory Investigation* 11:1134-1139.
24. Bennington, J. L., Haber, S. L. & Morgestern, N. L. (1964). Increased susceptibility to cryptococcosis following steroid therapy. *Dis. Chest* 42: 262-263.
25. Louria, D. B. & Browne, H. G. (1960). The effects of cortisone on experimental fungus infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 89:39.
26. Pappagianis, D. (1967). Epidemiological aspects of respiratory mycotic infections. *Bacteriol. Rev.* 31:25-34.
27. Walter, J. E. & Jones, R. D. (1968). Serodiagnosis of clinical cryptococcosis. *Am. Rev. Resp. Dis.* 97:275-281.
28. Newberry, M. W., Walter, E. J., Chandler, J. W. & Tosh, F. E. (1967). Epidemiologic study of *Cryptococcus neoformans*. *Ann. Intern. Med.* 67:724-732.
29. Kink, J. N., Barboriak, J. J. & Kaufman, L. (1968). Cryptococcal antibodies in pigeon breeders' disease. *J. Allergy* 41:297-301.
30. Salvin, S. B. & Smith, R. F. (1965). An antigen for detection of hypersensitivity to *Cryptococcus neoformans*. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 108:498-501.
31. Atkinson, A. J. & Bennet, J. E. (1968). Experience with a new skin test antigen prepared from *Cryptococcus neoformans*. *Am. Rev. Resp. Dis.* 97:637-643.
32. Shields, A. B. & Ajello, L. (1966). Medium for selective isolation of *Cryptococcus neoformans*. *Science* 151:208-209.
33. Christensen, B. W. (1946). Urea decomposition as a mean of differentiating *Proteus* and *Paracolon* cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bacteriol.* 52: 461-466.
34. Cabrera, M. A. (1961). Criptococcosis humana, primer caso confirmado en Guatemala. *Boletin Sanitario (Guatemala)* 1:1-7.
35. Ajello, L. (1967). Comparative ecology of respiratory mycotic disease agents. *Bacteriol. Rev.* 31:6-24.

36. Padilla Borjes, E. (1969). Histoplasmina, reporte sobre mil doscientas intradermorreacciones. Tesis. Facultad de Medicina. Universidad de San Carlos de Guatemala.
37. Taylor, R. L. & Dobrovolny, C. G. (1960). The distribution of histoplasmin sensitivity in Guatemala. Am. J. Trop. Med. Hyg. 9:518-522.
38. Mayorga, R. (1967). Coccidioidomycosis in Central America. En, Coccidioidomycosis. L. Ajello (ed.), The University of Arizona Press. pp. 287-291.
39. Mayorga, R. & Espinoza, H. (1970). Coccidioidomycosis in Mexico and Central America. Mycopath. Mycol. Appl. 40:13-23.