

## Detección de levaduras en cloaca de dos especies psitácidas nativas en un centro de rehabilitación en Chile

Detection of yeasts in cloacae of two species of native psittacine birds in a Chilean rehabilitation center

G González-Hein<sup>a</sup>, J González<sup>b</sup>, MC Díaz<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup>Programa Doctorado en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>b</sup>Servicio de Medicina, Hospital San Carlos, San Carlos, Chile.

<sup>c</sup>Programa de Microbiología y Micología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

### SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the presence of *Candida* and *Cryptococcus* in Chilean psittacine birds. Twenty eight cloacae swab samples were collected from 131 captive psittacine birds kept in a rehabilitation wildlife center in Chile. The sampled birds were 24 Slender-billed parakeets (*Enicognathus leptorhynchus*) and 4 Austral parakeets (*Enicognathus ferrugineus*). Yeasts were recovered from 20 (71.4%) of these 28 native psittacine birds. The most frequent yeasts isolated included *Candida famata* (8/28 samples), followed by *Candida tropicalis* (7/28), *Cryptococcus albidus* (3/28), *Cryptococcus laurentii* (2/28), *Rhodotorula* sp. (2/28), *Candida glabrata* (1/28) and *Cryptococcus neoformans* (1/28). The present study is the first report of yeasts in the *E. ferrugineus* and the endemic conure *E. leptorhynchus*.

*Palabras clave:* *Candida* sp., *Cryptococcus* sp, levaduras, psitácidas.

*Key words:* *Candida* sp., *Cryptococcus* sp, yeast, psittacine birds.

### INTRODUCCIÓN

En Chile habitan naturalmente cuatro especies de psitácidas: *Cyanoliseus patagonus* (trichahue), *Enicognathus ferrugineus* (cachaña), *Bolborhynchus aurifrons* (periquito cordillerano) y la especie endémica *Enicognathus leptorhynchus* (choroy).

La microbiota del tracto digestivo de las aves está compuesta por bacterias, hongos, protozoos y por un determinado número de patógenos potenciales que influyen en el metabolismo y salud del hospedero (Bangert y col 1988). Las aves domésticas y silvestres pueden actuar como portadores asintomáticos de *Cryptococcus* y de otras levaduras también potencialmente patógenas para humanos como *Candida* y *Rhodotorula* sp. (Cafarchia y col 2006). Criptococosis y candidiasis constituyen, en aves, las principales infecciones oportunistas por levaduras, pero también se han descrito casos de enfermedad primaria en ellas (Velasco 2000). En la literatura nacional y extranjera revisada no existen reportes sobre la microbiota levaduriforme de cloaca de aves del género *Enicognathus*, pero sí existe un estudio bacteriano y fúngico de la cloaca de *C. patagonus* (Herrera 2001).

*Cryptococcus neoformans* tiene una distribución geográfica mundial, se encuentra comúnmente en las deyecciones aviares, muy raramente ocasiona problemas en el hospedero aviar y afecta en mayor grado a pacientes inmunocomprometidos (Doneley 1994). Otros *Cryptococcus* reportados en deyecciones de aves incluyen a *C. albidus* y *C. laurentii*, entre otras especies (Bangert y col 1988, Mattsson y col 1999, Cafarchia y col 2006, Cafarchia y col 2008, Rosario y col 2008).

*C. neoformans* y *C. gattii* en algunos casos se han asociado a la presencia de masas proliferativas que generan disrupción de las narinas, ramfoteca y estructuras del seno infraorbital en psitácidas (Doneley 1994, Raidal y Butler 2001, Malik y col 2003). Infecciones diseminadas por *Cryptococcus* también pueden afectar a diversas especies de psitácidas (Clipsham y Brit 1983, Roskopf y col 1984, Fenwick y col 1985, Raso y col 2004).

Diversas especies del género *Candida*, incluidas *Candida albicans*, *C. famata*, *C. glabrata* entre otras, se han aislado de deyecciones aviares (Bangert y col 1988, Mancianti y col 2002). Por otro lado, *C. tropicalis* se ha logrado recuperar a partir de hisopados de cloaca de aves migratorias (Cafarchia y col 2006, Cafarchia y col 2008).

*Candida* es un agente oportunista en aves, pero puede llegar a actuar como un patógeno primario o secundario (Stacey 2006). Varias especies de *Candida* han sido recuperadas de lesiones en aves clínicamente afectadas (Panigraphy y col 1979, Keimer 1982, Velasco y col 2000,

Acceptado: 18.11.2009.

\* Código Postal 8389100, Clasificador 7, Universidad de Chile, Santiago, Chile; mcdiaz@med.uchile.cl

Kano y col 2001, Kunkle 2003, Osorio y col 2007). En aves, *C. albicans* se considera un invasor secundario que afecta principalmente la mucosa oral, esófago y buche (Oglesbee y col 1996). Las candidiasis también pueden afectar a proventrículo, estómago muscular e intestino delgado (Campbell 1986, Hubbard y col 1985). Lesiones atribuidas a *Candida* también han sido comunicadas en el tracto respiratorio, glándula uropigeal, pico y ojo de las aves (Tsai y col 1992, Oglesbee 1997). Candidiasis dérmicas y oculares se han comunicado en psitácidas (Tsai y col 1992, Carrasco y col 1993).

El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de *Candida* y *Cryptococcus* en la cloaca de psitácidas nativas del género *Enicognathus* aparentemente sanas, de un centro de rehabilitación de fauna silvestre.

## MATERIAL Y MÉTODO

### RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

En diciembre del 2007, de un total de 131 ejemplares de dos especies de psitácidas nativas mantenidas en cautiverio en siete jaulas no contiguas, en un centro de rehabilitación de fauna silvestre, se colectaron 28 (21,4%) hisopados cloacales, pertenecientes a 4/17 *E. ferrugineus* y 24/114 *E. leptorhynchus* aparentemente sanas. El examen clínico evaluó condición corporal general, estado de mucosas, narinas y cloaca, resultando todas aparentemente sanas. La toma de muestra de cloaca se realizó con tómulas estériles previamente humedecidas en solución fisiológica estéril, luego fueron conservadas en suero fisiológico y procesadas antes de 24 horas de tomada la muestra.

### PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

A partir del suero fisiológico, se sembró en placas de Agar Sabouraud glucosado a 37 °C por 96 horas y en agar Staib más bifenilo 0,1% y se incubaron a 25 °C por 14 días. Las colonias sospechosas se subcultivaron en Agar Sabouraud glucosado y agar Staib con bifenilo al 0,1% para obtener cultivos puros. La identificación de las colonias aisladas se basó en características macro y micromorfológicas, bioquímicas y fisiológicas. Las levaduras se identificaron como *Cryptococcus* sp., mediante la visualización microscópica de la cápsula con tinta china y pruebas bioquímicas (prueba de la ureasa, asimilación de hidratos de carbono y de nitrógeno) (Díaz y col 2007). La identificación de *Candida* sp. se realizó mediante la visualización microscópica con lactofenol, prueba de tubo germinal, microcultivo y Auxonograma (Barnett y col 2000, Díaz y col 2007). En algunos casos se utilizaron otras pruebas bioquímicas: CHROMagar *Candida*, y galerías comerciales API: Api ® *Candida*, Biomérieux, Francia).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 28 hisopados de cloaca, se aislaron 24 (85,7%) levaduras correspondientes a distintas especies del género *Candida*, *Cryptococcus* o *Rhodotorula*. Dentro del género *Candida* fue más frecuentemente aislada *C. famata* (8/28 muestras) seguida por *C. tropicalis* (7/28) y *C. glabrata* (1/28). Las especies de *Cryptococcus* correspondieron a *C. albidus* (3/28), *C. laurentii* (2/28) y *C. neoformans* (1/28) y *Rhodotorula* sp. se aisló en 2 ejemplares. De 7

**Cuadro 1.** Distribución de 24 levaduras aisladas de 28 muestras obtenidas de la cloaca de dos especies de psitácidas nativas. Santiago, Chile, 2007.

Distribution of yeast, isolated from 28 cloacae samples of two native psittacine species, Santiago, Chile, 2007.

Hongo levaduriforme	Choroy	Cachaña	Total levaduras N° %	Jaulas
<i>Candida famata</i>	7	1	8 (28,57%)	5/7
<i>Candida tropicalis</i>	5	2	7 (25%)	3/7
<i>Candida glabrata</i>	1	0	1 (3,6%)	1/7
Total <i>Candida</i>	13	3	16 (57,14%)	6/7
<i>Cryptococcus laurentii</i>	2	0	2 (7,1%)	2/7
<i>Cryptococcus albidus</i>	3	0	3 (10,7%)	3/7
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	0	1 (3,57%)	1/7
Total <i>Cryptococcus</i>	6	0	6 (21,43%)	5/7
<i>Rhodotorula</i> sp.	2	0	2 (7,14%)	2/7
Total levaduras/total aves	21/24	3/4	24/28 (85,71)	7/7

jaulas, *Candida* se detectó en aves provenientes de 6 jaulas, *Cryptococcus* de 5 y *Rhodotorula* de 2 jaulas.

De acuerdo al conocimiento de los autores el presente trabajo representa el primer estudio sobre detección de levaduras en la cloaca de *E. ferrugineus* y *E. leporhynchus*. Las levaduras aisladas de cachañas y loros choroy fueron las mismas que se detectaron en un estudio realizado en cloaca de trichahues mantenidos en cautiverio: *C. famata*, *C. albidus* y *Rhodotorula* sp. (Herrera 2001), pero además en el presente estudio se encontraron otras especies como *C. tropicalis* y *C. glabrata*, que también han sido aisladas a partir de la cloaca y deyecciones de aves en cautiverio y migratorias (Mancianti y col 2002, Cafarchia y col 2006, Cafarchia y col 2008).

El aislamiento de levaduras (85,7%) en el presente estudio es mayor al obtenido en una investigación realizada en 325 deyecciones procedentes de distintas especies de psitácidas en cautiverio (Italia), (49,2%), en la que se detectó una mayor diversidad de especies dentro del género *Candida* (16 especies) y no se aisló *Cryptococcus* (Mancianti y col 2002). La gran variedad de especies de *Candida* aisladas podría atribuirse a que en este último estudio se examinaron deyecciones de una gran variedad de psitácidas pertenecientes a diversas colecciones privadas, además las deyecciones tuvieron contacto con el ambiente. El hecho de obtener cultivos negativos para *Cryptococcus* en medio Staib puede explicarse por no existir las condiciones ambientales en los aviarios para la sobrevivencia del microorganismo.

En el presente estudio, 57,1% de las levaduras aisladas a partir de 28 hisopados cloacales correspondieron a especies del género *Candida* y en 6 de los 7 aviarios al menos un ave fue positiva. No se detectó *C. albicans*, y tampoco *C. parapsilosis*, especies frecuentemente implicadas en candidiasis aviarias (Oglesbee 1997, Velasco 2000, Kano y col 2001), pero sí *C. tropicalis*, la que también podría llegar a tener un rol patógeno en aves (Velasco 2000).

Se detectó *C. neoformans* en 3,6% (1/28) de las muestras, similar a lo informado por Staib y Schulz-Dieterich (1984) en muestras de deyecciones desecadas procedentes de diferentes aves (2,8%), lo que sugiere de acuerdo a la literatura que éstas pueden ser diseminadoras de esta levadura que constituye un potencial patógeno para el hombre (Staib y Schulz-Dieterich 1984). Infecciones por *Cryptococcus* en pacientes después de la exposición con aves han sido comunicadas (Littman y Borok 1968, Fessel 1993, Nosanchuk y col 2000, Bauters y col 2001, Shrestha y col 2004, Lagrou y col 2005).

En el presente estudio, dentro de los *Cryptococcus* fue más frecuentemente aislado *C. albidus*, levadura también detectada en la cloaca de *C. patagonus* (Herrera 2001). *C. laurentii*, microorganismo también aislado a partir de excrementos de otras especies de psitácidas (Bangert y col 1988, Mancianti y col 2002), fue recuperado a partir de dos *E. leporhynchus*. En humanos, ambas levaduras también han sido descritas

como potenciales patógenos (Kordossis y col 1998, Jover y col 2006).

El género *Rhodotorula* está ampliamente distribuido, y se encuentra en el ambiente, piel y en las mucosas normales del hombre y algunos animales (Torres-Rodríguez 1993). Las aves del presente estudio podrían llegar a actuar también como portadores de esta levadura oportunista, considerada parte de la microbiota transiente del tracto gastrointestinal aviar (Mancianti y col 2002). En el hospedero aviar, *Rhodotorula* también puede llegar a tener un rol patógeno, así *R. mucilaginosa* y *R. glutinis* han sido implicadas como el agente etiológico de dermatitis (Beemer y col 1970, Page y col 1976, Aruo 1980, Rosario y col 2008).

El presente estudio contribuye al conocimiento de la microbiota levaduriforme de *Enicognathus* sp., informando del aislamiento de una o más levaduras en el 71,4% de los casos. En 15 de 28 *Enicognathus* sp. se detectaron especies del género *Candida*; en 1 *E. leporhynchus*, *C. neoformans* y en 5 *E. leporhynchus*, *C. albidus* y *C. laurentii*. Es factible que el alto porcentaje de aves positivas encontradas obedezca al sesgo de la muestra, a la metodología de aislamiento de la levadura y/o a las características de la población de *Enicognathus* sp. en estudio. Al estar éstas en un proceso de rehabilitación, pueden presentar un mayor grado de inmunodepresión que puede justificar este porcentaje de agentes oportunistas. Interesante sería ampliar el tamaño de muestra para realizar un estudio de prevalencia de *Candida* y *Cryptococcus* en cada una de estas dos especies en cautiverio, como también el evaluar si existen diferencias significativas en la distribución de frecuencias de estas levaduras según especie aviar. Por otro lado, la evaluación de la microbiota levaduriforme de *Enicognathus* sp. silvestre libre para ser comparada con la de aves nativas psitácidas cautivas en zoológicos o centros de rehabilitación, podría aclarar el rol que juega el cautiverio.

Los resultados obtenidos de este estudio preliminar manifiestan también la necesidad de estudiar los factores de patogenicidad de los aislados (secreción fosfolipasa, síntesis de melanina, mayor grosor cápsula de polisacáridos, etc.) y el posible rol diseminador de levaduras al ambiente de las aves.

## RESUMEN

Con el propósito de evaluar la presencia de *Candida* y *Cryptococcus* en una población de 131 psitácidas nativas mantenidas en cautiverio en un centro de rehabilitación de fauna silvestre localizado en Santiago, se colectaron 28 hisopados cloacales: 24 de choroy (*Enicognathus leporhynchus*), especie endémica de Chile, y 4 de cachaña (*Enicognathus ferrugineus*). Veinticuatro levaduras se detectaron en 20 de los 28 *Enicognathus* sp. (71,4%). *Candida famata* fue la más frecuentemente aislada (8/28 muestras), seguida por *Candida tropicalis* (7/28), *Cryptococcus laurentii* (2/28), *C. albidus* (3/28), *Rhodotorula* sp. (2/28), *Candida glabrata* (1/28) y *Cryptococcus neoformans* (1/28). El presente estudio contribuye al conocimiento de la microbiota levaduriforme en aves psitácidas chilenas del género *Enicognathus* sp.

## REFERENCIAS

- Aruo SK. 1980. Necrotizing cutaneous Rhodotorulosis in chickens in Uganda. *Avian Dis* 24, 1038-1043.
- Bangert R, B Cho, P Widders, E Stauber, C Ward. 1988. A survey of aerobic bacteria and fungi in the feces of healthy psittacine birds. *Avian Dis* 32, 46-52.
- Barnett JA, RW Payne, D Yarrow. 2000. *Yeast: Characteristics and Identification*, 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bauters TGM, M Moerman, G Pini, H Vermeersch, H Nelis. 2001. Colonization of a voice prosthesis by *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 39, 379-381.
- Beemer A, S Schneerson-Porat, E Kuttin. 1970. *Rhodotorula mucilaginosa* dermatitis on feathered parts of chickens: an epizootic on poultry farm. *Avian Dis* 14, 234-239.
- Cafarchia C, A Camarda, D Romito, M Campolo, N Quaglia, D Tullio, D Otranto. 2006. Occurrence of yeasts in cloacae of migratory birds. *Micopathologia* 161, 229-234.
- Cafarchia C, D Romito, C Caccioli, A Camarda, D Otranto. 2008. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications of human disease. *Med Mycol* 46, 429-34.
- Campbell TW. 1986. Mycotic diseases. In: Harrison GJ, Harrison LR (eds). *Clinical Avian Medicine and Surgery*. WB Saunders, Philadelphia, USA, Pp 464-472.
- Carrasco L, M Bautista, J De Las Mulas, H Jensen. 1993. Application of enzyme-immunohistochemistry for the diagnosis of Aspergillosis, Candidiasis, and Zygomycosis in three lovebirds. *Avian Dis* 37, 923-927.
- Clipsham R, J Brit. 1983. Disseminated cryptococcosis in a green winged macaw (*Ara*). *J Am Vet Med Assoc* 183, 1303-1304.
- Díaz MC, V Silva, G Hermosilla. 2007. *Manual Práctico Curso Internacional de Micología Médica*. Chile.
- Doneley R. 1994. Cutaneous cryptococcus in an African grey parrot. *Proc Assoc Avian Vet Aust Comm*, Corumbin, QLD, Pp 247.
- Fenwick B, K Takeshita, A Wong. 1985. A moluccan cockatoo with disseminated cryptococcosis. *J Am Vet Med Assoc* 187, 1210-1212.
- Fessel W. 1993. Cryptococcal meningitis after unusual exposures to birds. *N Engl J Med* 328, 1354-1355.
- Herrera PG. 2001. Estudio microbiano y parasitario de coana y cloaca de loro trichahue (*Cyanoliseus patagonus byroni*) en cautiverio. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Chile.
- Hubbard G, R Schmidt, D Eisenbrandt, WM Witt, K Fletcher. 1985. Fungal infections of ventriculi in captive birds. *J Wildl Dis* 21, 25-28.
- Jover A, C Ferrer, A Morán, J Gutiérrez, MF Colom. 2006. Criptococosis por *Cryptococcus albidus* en un paciente inmunocompetente. *Rev Iberoam Micol* 23, S3.
- Kano R, Y Sakamoto, A Hanahachi, H Kamata, Y Fukuda, K Fujiwara, Hasegawa A. 2001. Molecular identification of *C. parapsilosis* from crop mucosa in a cockatiel. *J Vet Diagn Invest* 13, 437-439.
- Keimer IF. 1982. Mycoses. In: Petrak LM (ed). *Diseases of the cage and aviary*. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, USA, Pp 601-602.
- Kordossis T, A Avlami, A Velegraki, I Stefanou, G Georgakopoulos, C Papalambrou, NJ Legakis. 1998. First report of *Cryptococcus laurentii* meningitis and a fatal case of *Cryptococcus albidus* cryptococcaemia in AIDS patients. *Med Mycol* 36, 335-339.
- Kunkle R. 2003. Fungal infections. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, Mc Dougald LR, Swayne DE (eds). *Diseases of poultry*. 11<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing Professional Ames IA, Iowa, USA, Pp 883-902.
- Lagrou K, J Van Eldere, S Keuleers, F Hagen, R Merckx, J Verhaegen, WE Peetermans, T Boekhout. 2005. Zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a magpie to an immunocompetent patient. *J Intern Med* 257, 385-388.
- Littman M, R Borok. 1968. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heat resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 35, 329-345.
- Malik R, M Krockenberger, G Cross, R Doneley, D Madill, D Black, P McWhirter, A Rozenwax, K Rose, M Alley, D Forshaw, I Russell-Brown, A Johnstone, P Martin, C O'Brien, D Love. 2003. Avian Cryptococcosis. *Med Mycol* 41, 115-124.
- Mancianti F, S Nardoni, R Ceccherelli. 2002. Occurrence of yeasts in psittacines droppings from captive birds in Italy. *Mycopathologia* 153, 121-124.
- Mattsson R, PD Haemig, B Olsen. 1999. Feral pigeons as carriers of *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus* and *Debaryomyces hansenii*. *Med Mycol* 37, 367-369.
- Nosanchuk JD, S Shoham, B Fries, D Shapiro, S Levitz, A Casadevall. 2000. Evidence of zoonotic transmission of *Cryptococcus neoformans* from a pet cockatoo to an immunocompromised patient. *Ann Intern Med* 132, 205-208.
- Oglesbee BL, S Mc Donald, K Warthen. 1996. Trastornos del sistema digestivo de las aves. In: Birchard S, Sherding R (eds). *Manual Clínico de Pequeñas Especies*. McGraw-Hill Interamericana, México, Pp 1541-1552.
- Oglesbee BL. 1997. Mycotic Diseases. In: Altman R, Clubb S, Dorrestein G, Quesenberry K (eds). *Avian Medicine and Surgery*. Saunders, Philadelphia, USA, Pp 323-332.
- Osorio C, O Fletcher, M Dykstra, K Post, J Barnes. 2007. Comb Candidiasis affecting roosters in a broiler breeder flock. *Avian Dis* 51, 618-622.
- Page RK, O Fletcher, C Eidson, G Michaels. 1976. Dermatitis produced by *Rhodotorula glutinis* in broiler-age chickens. *Avian Dis* 20, 416-421.
- Panigraphy B, S Naqui, L Grumbles, C Hall. 1979. Candidiasis in cockatiel nestlings and mucormycosis in a pigeon. *Avian Dis* 23, 757-758.
- Raidal S, R Butler. 2001. Chronic rhinosinusitis and rhamphoteleal destruction in a Major Mitchell's Cockatoo (*Cacatua leadbeateri*) due to *Cryptococcus neoformans* var gattii. *J Avian Med Surg* 15, 121-125.
- Raso T, K Werther, E Miranda, MJS Mendes-Giannini. 2004. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Med Mycol* 42, 355-362.
- Rosario I, B Acosta, F Colom. 2008. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* sp. *Rev Iberoam Micol* 25, S13-S18.
- Roskopf W, R Woerpel. 1984. Cryptococcosis in a thick billed parrot. *Proc Assoc Avian Vet*, 281-288.
- Shrestha RK, J Stoller, G Honari, G Procop, S Gordon. 2004. Pneumonia due to *Cryptococcus neoformans* in a patient receiving Influximab: Possible zoonotic transmission from a pet cockatiel. *Respiratory care* 49, 606-608.
- Stacey G. 2006. Evaluating and treating the gastrointestinal system. In: Harrison G, Lightfoot T (eds). *Clinical Avian Medicine* Vol 1. Spix Publishing, Inc., Palm Beach, Florida, USA, Pp 411-440.
- Staib F, J. Schulz-Dieterich. 1984. *Cryptococcus neoformans* in fecal matter of birds kept in cages-control of *Cryptococcus neoformans* habitats. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig B* 174, 179-186.
- Torres-Rodríguez JM. 1993. Micosis sistémicas oportunistas excepcionales producidas por levaduras y hongos miceliares hialinos (hialohifomicosis). En: Torres-Rodríguez JM, del Palacio-Hernanz A, Guarro-Artigas J, Negróni Briz R, Pereiro-Miguens M (eds). *Micología Médica*. Masson, SA, Barcelona, España, Pp 205-208.
- Tsai S, J Park, K Hirai, C Itakura. 1992. Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. *Avian Dis* 21, 699-709.
- Velasco MC. 2000. Candidiasis and Cryptococcosis in birds. *Sem Avian Exotic Pet Med* 9, 75-81.