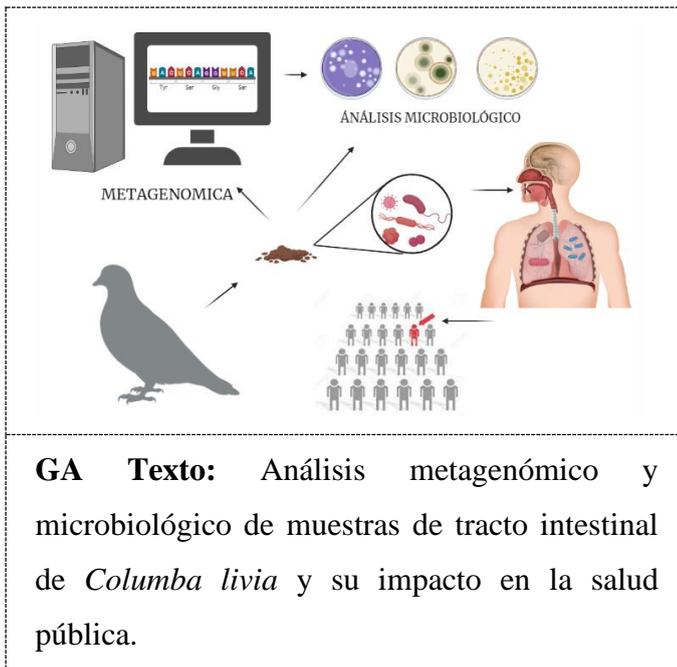


Perfil metagenómico en muestras de tracto intestinal de paloma domestica *Columba livia*

Metagenomic profile in samples of the intestinal tract of the domestic pigeon *Columba livia*

Graphical Abstract (GA)



GA Texto: Análisis metagenómico y microbiológico de muestras de tracto intestinal de *Columba livia* y su impacto en la salud pública.

Perfil metagenómico en muestras de tracto intestinal de paloma domestica *Columba livia*

Metagenomic profile in samples of the intestinal tract of the domestic pigeon *Columba livia*

*Nicole Julieth González Flórez**

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

Dirigido por: Dr. Nelson Enrique Arenas y Dra. Laura Inés Cuervo

Resumen

La paloma *Columba livia* doméstica, se considera una especie sinantrópica que habita y anida en interiores de tierras altas, acantilados costeros y ambientes urbanos, conocida por portar diversos agentes patógenos de carácter zoonótico. En Colombia, son pocos los reportes sobre la presencia de patógenos zoonóticos en palomas, limitando la planeación para controlar su respectiva proliferación. En este estudio se identificó la microbiota bacteriana de tracto intestinal en 3 palomas de una plaza de mercado de la ciudad de Bogotá a través de estudios fenotípicos y metagenómicos. Los resultados consideran las posibles implicaciones en salud pública de las especies bacterianas identificadas. Los análisis fenotípicos indicaron la presencia de enterobacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella spp.* Los phylum que se encontraron en mayor abundancia taxonómica fueron *Tenericutes* (52,14%), *Proteobacteria* (35,27%), *Firmicutes* (10,44%), *Cyanobacteria* (1,11%) y *Actinobacteria* (0,79%). Dentro de los cuales las familias más representativas correspondieron a *Mycoplasmataceae* (53,26%) y *Acetobacteraceae* (10,05%). A su vez los géneros más representativos fueron *Mycoplasmataceae* *Unclassified* (54,38%), *Allorhizobium* *Neorhizobium* y *Pararhizobium* *Rhizobium* (7,73%). Los hallazgos sugieren que las palomas podrían ser reservorios de diferentes patógenos que podrían transmitirse a humanos.

Palabras clave: Paloma doméstica, metagenómica, patógeno, transmisión, enfermedades, salud pública.

Abstract

Perfil metagenómico en muestras de tracto intestinal de paloma domestica *Columba livia*

Metagenomic profile in samples of the intestinal tract of the domestic pigeon *Columba livia*

The domestic pigeon *Columba livia* is a synanthropic specie that inhabits and nests in highland interiors, coastal cliffs and in urban environments, and well-known host harboring several zoonotic pathogens. In Colombia, reports missed the presence of zoonotic pathogens in pigeons, limiting planning when controlling their spread. In this study, the bacterial microbiota of the intestinal tract was identified in 3 pigeons from a market place from Bogota through phenotypic and metagenomic studies. Results analyzed possible public health implications regarding the identified bacterial species. The presence of enterobacteria such as *Escherichia coli* and *Klebsiella spp* was confirmed by phenotypic analyzes. The phyla with the highest taxonomic abundance were *Tenericutes* (52.14%), *Proteobacteria* (35.27%), *Firmicutes* (10.44%), *Cyanobacteria* (1.11%) and *Actinobacteria* (0.79 %). Within the most representative families were *Mycoplasmataceae* (53.26%), *Acetobacteraceae* (10.05%). Although, the most representative genera were *Mycoplasmataceae* Unclassified (54.38%), *Allorhizobium* *Neorhizobium* and *Pararhizobium Rhizobium* (7.73%). Our findings suggest that pigeons might be a reservoir of human pathogens which can be spread to humans.

Keywords: Domestic pigeon, metagenomics, pathogen, transmission, diseases, public health.

Introducción

Las palomas pertenecen al género *Columba*, de la familia *Columbidae*, del orden *Columbiformes*. En particular cuenta con más de 50 especies en el mundo y una gran diversidad en cuanto al color del plumaje, tamaño y hábitat (Zúñiga, E., León, D., Falcón 2017). El posible ancestro de la paloma *Columba livia* doméstica (*C. livia domestica*), es originario de Eurasia y África, cuya distribución una vez domesticado se extendió a casi todos los continentes, especialmente América del Norte, Cono Sur de América y zonas templadas meridionales de Australia (salvo la Antártida) (Mancera et al. 2013). La paloma doméstica tiene una gran variedad de coloraciones y formas. Por ejemplo, los adultos miden generalmente entre 29 y 37 cm de largo y tienen una envergadura alar de 62 a 72 cm, su pico es oscuro con blanco, patas rojizas o rosadas, ojos cafés (oscuros los más jóvenes), entre otras características de estas aves (Zúñiga, E., León, D., Falcón 2017).

La paloma doméstica vive y anida en interiores de tierras altas, acantilados costeros y en ambientes como las construcciones humanas (Villalba, Sánchez 2015), se juntan en parvadas que usualmente se mueven y vuelan; es decir, presenta hábitos gregarios y sedentarios. Forman grandes bandadas en busca de alimento generalmente como granos, semillas y frutas, los cuales se concentran en los basureros, techos, canales, desagüe, sobrados, áticos, y demás lugares en los cuales construyen sus nidos, utilizando ramas y hierbas colocadas sobre una base (González, Acuña, D., 2007).

Estudios recientes sugieren que las palomas suelen ser trasmisoras de numerosos patógenos tales como *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* y otros agentes infecciosos (Barbosa-Brugés et al., 2020), por lo cual se atribuye que la paloma doméstica podría ser responsable de transmitir enfermedades de carácter zoonótico que involucra a agentes infecciosos como virus, bacterias, parásitos y hongos que se transmiten entre animales y humanos (Rahman et al. 2020; Noor and Khetarpal 2022).

Una de las razones principales por las que las palomas están asociadas con la transmisión de enfermedades, es porque están presentes en grandes cantidades en las zonas más centrales de las

ciudades, donde normalmente hay muchos restos de comida y residuos en proceso de descomposición que las mantiene en contacto con patógenos y facilita su transmisión y proliferación (Zúñiga, E., León, D., Falcón 2017). Pueden transmitir patógenos mediante diversos mecanismos como el contacto directo con las aves, con sus excrementos y plumas, incluso por la inhalación de aerosoles producidos a partir de los excrementos (Mancera et al. 2013.).

Entre las enfermedades más comunes esta la alveolitis alérgica, una enfermedad pulmonar que puede ser generada por la exposición frecuente a diferentes tipos de muestras, entre ellas excrementos secos de palomas (Villalba, Sánchez 2015). Por otro lado, entre las infecciones más comunes se encuentran la criptococosis, salmonelosis e histoplasmosis (Vargas, J., 2016). Estas infecciones pueden representar graves impactos para la salud, especialmente en individuos inmunocomprometidos, debido a sus enfermedades y a los costos económicos y sociales derivados del control y el tratamiento (Mancera et al. 2013). La salmonelosis, puede ser causada por diferentes especies de *Salmonella* que se encuentran asociadas con alimentos contaminados con el excremento de palomas. Esta enfermedad se manifiesta con síntomas como fiebre, deshidratación, vómitos, dolor de cabeza y debilidad en el cuerpo, donde se pueden presentar cuadros infecciosos muy graves (Zúñiga, E., León, D., Falcón 2017). Además, es considerada una de las zoonosis con mayor importancia dentro de las enfermedades bacterianas capaces de ser transmitidas por la paloma doméstica y es catalogada como la zoonosis más común frecuente en el mundo (Gonzáles et al., 2007).

Estudios epidemiológicos en poblaciones de *C. livia domestica* han detectado cerca de 110 microorganismos que son patógenos humanos, entre ellos 41 bacterias, 55 hongos y 6 protozoos, de los cuales se destacan: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Chlamydomphila psittaci*, *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* y *Toxoplasma gondii*. Igualmente, la presencia de parásitos y otras enterobacterias de importancia en salud pública en poblaciones de *C. livia* en zonas urbanas (Barbosa, Plazas 2020).

En otros países se ha generado la necesidad de controlar las poblaciones de palomas

domésticas por considerarse reservorios de agentes patógenos de tipo zoonótico. Actualmente en Colombia son pocos los reportes sobre la incidencia de enfermedades zoonóticas producidas por palomas, debido a ello, nuestro objetivo fue identificar la microbiota bacteriana a través de estudios fenotípicos y metagenómicos en muestras de tracto intestinal de paloma doméstica *C. livia* presente en una plaza de mercado de la ciudad de Bogotá, analizando las implicaciones en salud pública de las especies bacterianas identificadas.

1. Materiales y Métodos

1.1. Población y muestra

Se capturaron 3 palomas de una plaza de mercado de Bogotá donde se han reportado problemas sanitarios asociados a la proliferación de estos animales y en respuesta a la necesidad de aplicar estrategias de vigilancia de dichas aves. Las palomas se sacrificaron y se inspeccionaron para evidenciar lesiones o cualquier signo de enfermedad por un proceso de disección asistido por un veterinario. Durante el procedimiento se tomaron 3 muestras de materia fecal del intestino de cada una de las palomas y fueron recolectadas en recipientes estériles y se mantuvieron a 4°C hasta ser utilizadas para los estudios de diversidad microbiana metataxónomica para bacterias y estudios fenotípicos.

1.2. Identificación fenotípica

Para la identificación fenotípica, las muestras fueron sembradas en caldo nutritivo el cual es un medio de cultivo utilizado para propósitos generales, y ayuda con el desarrollo de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales, y fueron incubadas a 30°C por 24 horas. A partir de este cultivo se hicieron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-7} y se sembraron en agar nutritivo, conservando las condiciones de incubación antes mencionadas. Las colonias fueron seleccionadas y se clasificaron de acuerdo a la tinción de Gram en Gram positivas o Gram negativas.

1.3. Identificación por pruebas bioquímicas

Para la identificación fenotípica, 14 cepas Gram negativas (paloma 1: 5 cepas; paloma 2: 5 y paloma 3: 4), fueron sembradas en una batería de medios selectivos, para reconocer sus características

de crecimiento, requerimientos metabólicos y las particularidades de identificación de las enterobacterias. Los medios utilizados fueron: agar eosina azul de metileno (EMB), agar Mc Conkey, Salmonella-Shigella (SS), cetrimide, triple azúcar hierro (TSI), Lisina hierro agar (LIA), citrato de Simmons, sulfuro indol motilidad (SIM), rojo de metilo (MR y Voges-Proskauer (VP), los medios de cultivo se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las reacciones metabólicas generadas por las cepas y su crecimiento nos permitieron hacer una asignación fenotípica (positiva o negativa según la prueba) preliminar.

1.4 Secuenciación del gen 16S ARNr

Las muestras de materia fecal se mantuvieron a 4°C y se enviaron al centro nacional de secuenciación genómica, de la Universidad de Antioquia donde fueron utilizadas para la extracción de ADN (Sólo las muestras de las palomas 1 y 2). Se utilizó el kit de NORGEN, stool ADN isolation kit siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se realizó una cuantificación del ADN extraído por medio de un Nanodrop El ADN extraído se mantuvo a -20°C hasta su secuenciación.

Las muestras de ADN total extraído, fueron utilizadas para experimentos de diversidad microbiana (Metataxonómica) para bacterias, usando como marcador molecular el gen ribosomal 16S en las regiones variables V3-V4. Los genes ribosomales se usan convencionalmente como marcadores moleculares por su capacidad de resolver taxonómicamente la identidad de un espécimen (Arenas et al., 2009; Arenas & Salazar, 2019). Así, para secuenciación profunda del gen ribosomal 16S se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: Bakt_341F:

CCTACGGGNGGCWGCAG y Bakt_805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC.

La secuenciación profunda se realizó en la plataforma MiSeq de Illumina, generando lecturas (reads) pareadas de 300 pb cada uno. Los análisis de calidad de secuencias y clasificación se desarrollaron utilizando la plataforma MOTHUR en la versión 1.48.0 (Schloss PD, Westcott SL 2011).

2. Resultados

2.1. Aislamiento e identificación de las cepas

Se realizó la disección de tres palomas para el cultivo de cepas bacterianas y se enumeraron aleatoriamente como especímenes (palomas 1, 2 y 3).

Las bacterias fueron seleccionadas a partir del crecimiento en agar nutritivo (figura 1); de la paloma 1 se obtuvieron 14 colonias, de la paloma 2 se aislaron 12 colonias y paloma 3 se seleccionaron 13 colonias, para un total de 39 cepas aisladas. Las colonias fueron categorizadas como Gram positivas (25 cepas) y Gram negativas (14 cepas), mediante la coloración de Gram. Para la identificación bioquímica se seleccionaron aleatoriamente las cepas Gram negativas de cada paloma (paloma 1: cepas 1, 3, 9, 10 y 12), paloma 2 (1, 7, 8, 10 y 12), paloma 3 (3, 5, 11 y 13).

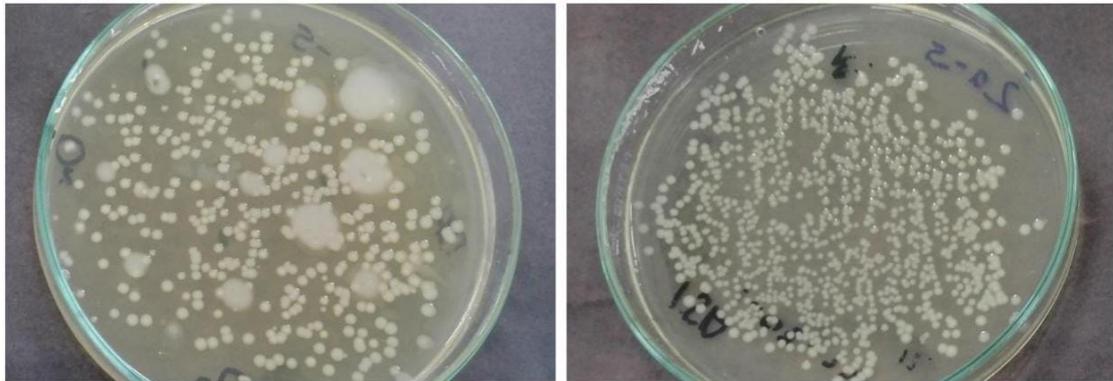


Figura 1. Crecimiento de colonias en agar nutritivo, provenientes de materia fecal de palomas (*C. livia*).

2.2. Caracterización bioquímica

La caracterización bioquímica a través de los diferentes medios de cultivo, permitió una identificación preliminar de las cepas, de acuerdo a sus requerimientos metabólicos. 13 cepas presentaron crecimiento en agar Mac Conkey, EMB y SS, con colonias rosadas, color que es indicativo de la fermentación de lactosa, y por tanto permitió una primera clasificación en 2 géneros: *Klebsiella* (paloma 1: 4 cepas, paloma 2: 3 cepas, paloma 3: 1 cepa), *Escherichia* (paloma 2: 2, paloma 3: 1), correspondiente a un total de 11 cepas como identificación fenotípica preliminar. De las 3 cepas restantes, 2 no lograron ser identificadas dado que algunos resultados fueron indeterminados y no se logró una categorización adecuada. La última cepa, sólo creció en TSI, LIA y rojo de metilo, lo

cual no permitió su identificación.

Seguido esto hicimos una validación utilizando el Kit de Identificación BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID System para las 14 cepas en grupo de investigación en ciencias básicas y educación (GICBE) y el laboratorio de parasitología de la Universidad del Quindío (ver anexo 2).

2.3. Análisis Metagenómico del gen 16S ARNr

Diversidad, abundancia y clasificación taxonómica de bacterias

El análisis de cobertura para las muestras procesadas para diversidad microbiana mostró valores entre 0.99-1 (Tabla 1), indicando que la identificación de taxones es suficiente para describir la población bacteriana asociada a las muestras.

Fue posible obtener secuencias con un índice de calidad (Q30) de 83.8%, es preciso recordar que el marcador de calidad o generalmente nombrado Q30 es representativo de la probabilidad de una base mal identificada por el secuenciador. Siendo nuestro resultado de Q30 un indicativo del 99.9% de precisión y una probabilidad de una base mal identificada de 1 en 1000 (Tabla 1).

Así mismo, uno de los índices empleados para calcular la biodiversidad específica es el de Shannon, el cual mide la probabilidad que hay en seleccionar todas las especies en la proporción dada con que existen en la población, es decir que para la paloma 1 obtuvimos una probabilidad de (3,061,427) y en la paloma 2 (0.485235). El índice de Chao1 en nuestras muestras tuvo un resultado de 204 y 84.5, para la paloma 1 y 2 respectivamente, esto quiere decir que los datos reflejan a la abundancia de individuos que pertenecen a una determinada clase en una muestra.

Por último, Inv Simpson, es el índice de mayor valor de significación, ya que permite indicar cuáles de las especies están que son concurrentes y contribuyen en el carácter y estructura de un ecosistema (Cottam, Curtis 1956), en este caso las muestras obtuvieron un valor de 11, 781,879 para la paloma 1 y 1, 211,983 para la paloma 2, lo cual nos permitió ver la clasificación

de cada una de las muestras.

Tabla 1. Resultados generales secuenciamiento profundo y de los análisis de riqueza y diversidad

Sample Code	Raw reads	Q30 (%)	nseqs	Coverage	Observed (Sobs)	Chao1	Shannon	Inv Simpson
Muestra 1	196320	83.8	73893	1	204	204	3.061427	11.781879
Muestra 2	212638	83.8	73894	0.999824	78	84.5	0.485235	1.211983

La diversidad total a nivel de phylum estuvo representada mayoritariamente por *Tenericutes* (52,14%), *Proteobacteria* (35,27%), *Firmicutes* (10,44%), *Cyanobacteria* (1,11%) y *Actinobacteria* (0,79%), Los demás phylum con valores por debajo de 0,11% y algunas no clasificadas o no conocidas (Tabla 2). La diversidad de phylum, fue diferente sí se comparan ambas palomas (figura 2), la paloma 2, exhibe abundancia para *Tenericutes* (52,14%), mientras que la paloma 1 exhibe abundancia para *Proteobacteria* (33,43%) (Figura 2).

Tabla 2. Taxonomía y abundancia a nivel de phylum de las bacterias aisladas de heces de palomas.

Taxon	Total	Porcentaje Total	Paloma 1	Paloma 2
<i>Tenericutes</i>	87110	52,141%	0 (0,00%)	87110 (52,14%)
<i>Proteobacteria</i>	58923	35,269%	55854 (33,43%)	3069 (1,84%)
<i>Firmicutes</i>	17448	10,444%	17106 (10,24%)	342 (0,21%)
<i>Cyanobacteria</i>	1852	1,109%	1770 (1,06%)	82 (0,05%)
<i>Actinobacteria</i>	1322	0,791%	1298 (0,78%)	24 (0,01%)
<i>Bacteria_unclassified</i>	177	0,106%	7 (0,00%)	17 (0,01%)
<i>Bacteroidetes</i>	112	0,067%	107 (0,064%)	5 (0,00%)
<i>unknown_unclassified</i>	48	0,029%	0 (0,00%)	48 (0,03%)
<i>Deinococcus-Thermus</i>	24	0,014%	24 (0,01%)	0 (0,0%)
<i>Planctomycetes</i>	12	0,007%	8 (0,01%)	4 (0,02%)
<i>Acidobacteria</i>	11	0,007%	11 (0,08%)	0 (0,00%)
<i>Patescibacteria</i>	10	0,006%	8 (0,06%)	2 (0,00%)
<i>Chloroflex</i>	9	0,005%	9 (0,06%)	0 (0,00%)
<i>Chlamydiae</i>	6	0,004%	6 (0,04%)	0 (0,00%)
<i>Verrucomicrobia</i>	3	0,002%	3 (0,02%)	0 (0,00%)

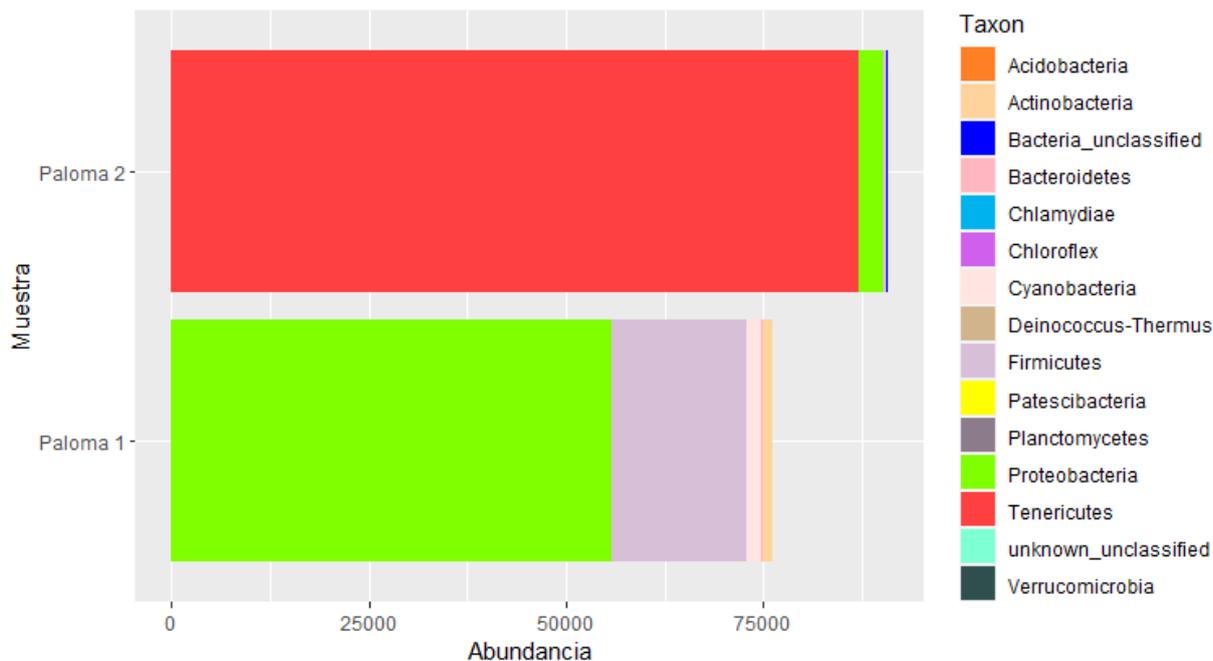


Figura 2. Taxonomía y abundancia a nivel de phylum de las bacterias aisladas de heces de palomas.

La diversidad a nivel de familia estuvo representada mayoritariamente por *Mycoplasmataceae* (53,26%), *Acetobacteraceae* (10,06%), *Rhizobiaceae* (8,91%), *Enterobacteriaceae* (8,59%), *Burkholderiaceae* (6,26%), *Lactobacillaceae* (6,08%), *Leuconostocaceae* (3,39%), *Sphingomonadaceae* (1,16%) (Tabla 3), las demás familias con valores por debajo de 1%. Esta diversidad no fue uniforme en las palomas evaluadas, como se observa en la figura 3. La familia *Mycoplasmataceae* fue predominante en la paloma 2, seguida por *Enterobacteriaceae*, mientras que en la paloma 1, diversas familias estuvieron representadas en proporciones más homogéneas como *Acetobacteraceae*, *Rhizobiaceae* y *Enterobacteriaceae* con similares porcentajes de abundancia.

Tabla 3. Taxonomía y abundancia a nivel de Familia de las bacterias aisladas de heces de palomas.

Taxon	Total	Porcentaje Total	Paloma 1	Paloma 2
<i>Mycoplasmataceae</i>	87099	53,26%	0 (0,0%)	87099 (53,26%)

<i>Acetobacteraceae</i>	16442	10,05%	16191 (9,90%)	251 (0,16%)
<i>Rhizobiaceae</i>	14570	8,91%	13978 (8,55%)	592 (0,362%)
<i>Enterobacteriaceae</i>	14049	8,59%	12366 (7,56%)	1683 (1,03%)
<i>Burkholderiaceae</i>	10233	6,26%	9849 (6,02%)	384 (0,24%)
<i>Lactobacillaceae</i>	9951	6,08%	9726 (5,95%)	225 (0,14%)
<i>Leuconostocaceae</i>	5548	3,39%	5452 (3,33%)	96 (0,06%)
<i>Sphingomonadaceae</i>	1902	1,16%	1843 (1,13%)	59 (0,04%)
<i>Clostridiaceae_1</i>	1232	0,75%	1232 (0,75%)	0 (0,00%)
<i>Caulobacteraceae</i>	550	0,34%	512 (0,31%)	38 (0,02%)
<i>Pseudomonadaceae</i>	462	0,28%	424 (0,26%)	38 (0,02%)
<i>Geodermatophilaceae</i>	426	0,26%	426 (0,26%)	0 (0,00%)
<i>Microbacteriaceae</i>	275	0,17%	272 (0,17%)	3 (0,02%)
<i>Rhodanobacteraceae</i>	244	0,15%	241 (0,15%)	3 (0,02%)
<i>Erysipelotrichaceae</i>	182	0,11%	181 (0,11%)	1 (0,01%)
<i>Moraxellaceae</i>	145	0,09%	143 (0,09%)	2 (0,02%)
<i>Corynebacteriaceae</i>	131	0,08%	129 (0,08%)	2 (0,02%)
<i>Nocardiaceae</i>	107	0,07%	106 (0,065%)	1 (0,01%)

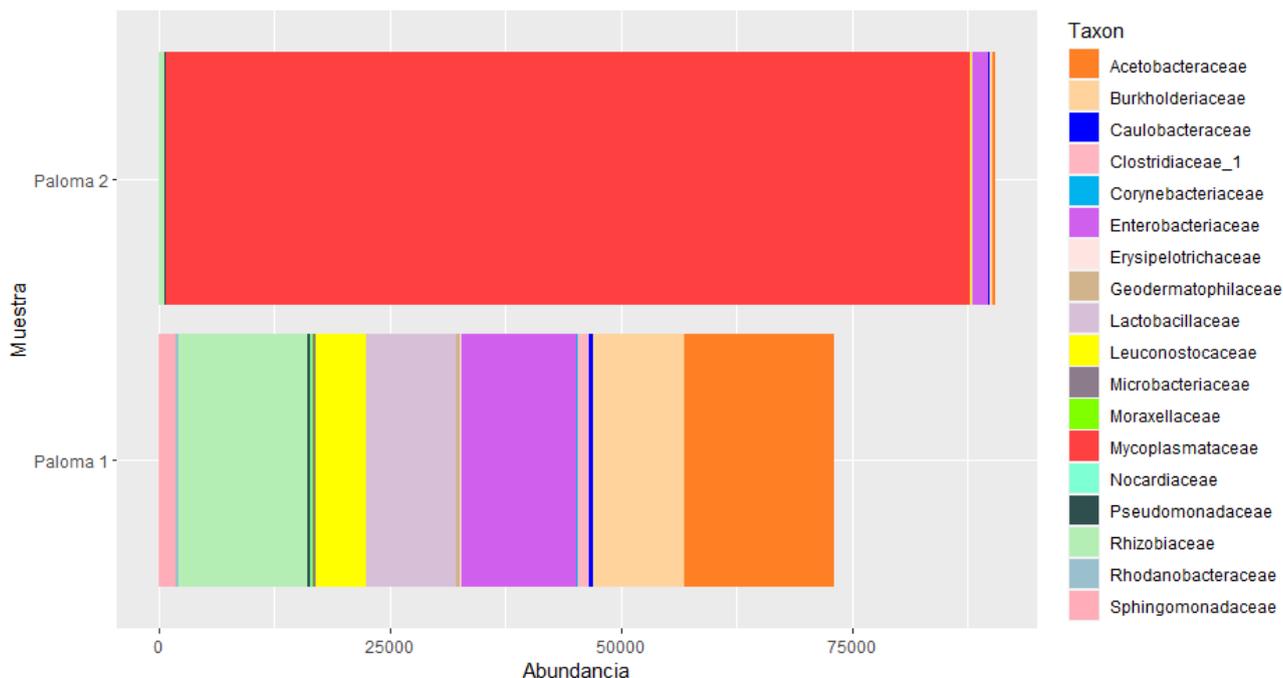


Figura 3. Taxonomía y abundancia a nivel de Familia de las bacterias aisladas de heces de palomas.

Respecto a la diversidad a nivel de género, se puede observar que en la paloma 2, el mayor porcentaje estuvo representado en miembros de la familia *Mycoplasmataceae*, que no fueron clasificados claramente (54,38%), seguidos por los géneros de enterobacterias *Escherichia-Shigella* (0,47%) (Figura 4). En la paloma 1, la diversidad fue más heterogénea, representada por *Allorhizobium Neorhizobium* y *Pararhizobium Rhizobium* (7,73%), *Acetobacter* (7,14%), *Lactobacillus* (6,21%), miembros no clasificados de la familia *Enterobacteriaceae* (5,63%), *Leuconostoc* (3,38%). Los demás géneros con valores por debajo de 3,38% y algunas no clasificadas o no conocidas (tabla 4).

Tabla 4. Taxonomía y abundancia a nivel de Género de las bacterias aisladas de heces de palomas.

Taxon	total	Porcentaje Total	Paloma 1	Paloma 2
<i>Mycoplasmataceae_unclassified</i>	87091	54,38%	0 (0,00%)	87091 (54,38%)
<i>Allorhizobium-Neorhizobium Pararhizobium-Rhizobium</i>	12385	7,73%	11892 (7,43%)	493 (0,31%)

Figura 4. Taxonomía y abundancia a nivel de Género de las bacterias aisladas de heces de palomas.

3. DISCUSIÓN

La paloma *C. Livia* doméstica, es un ave abundante en ambientes urbanos, ya que tienen una capacidad de adaptación a diversos ambientes, se pueden encontrar agrupadas en los edificios, parques o plazas de mercado (Miller, Fowler 2011). Debido a que están disponibles en grandes cantidades en las zonas centrales de las ciudades, donde se encuentran muchos restos de comida y residuos en proceso de descomposición, se mantienen en contacto con patógenos facilitando la transmisión y proliferación de los mismos (Zúñiga, E., León, D., Falcón 2017). En consecuencia, se suele asociar y atribuir a la paloma doméstica la transmisión de enfermedades de tipo zoonótico, tales como criptococosis, salmonelosis, histoplasmosis, entre otras. (Vargas, 2016).

En el presente análisis metataxonómico, los resultados muestran una diversidad total a nivel de phylum que estuvo representada mayoritariamente por *Tenericutes* (52,14%), *Proteobacteria* (35,27%) y *Firmicutes* (10,44%) cómo es posible evidenciar en la Figura 2, que fue similar a lo reportado por (Grond et al., 2019) donde los phylum de los microbiomas fecales de las palomas fueron dominados primero por *Actinobacteria*, seguida por *Firmicutes* y *Proteobacteria*. Esta proporción también coincide con otros estudios taxonómicos del tracto intestinal de ratones y patos, en los que la diversidad taxonómica estuvo dominada por *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Grond et al. 2018; Guo et al. 2014; Looft et al. 2012). *Firmicutes* es un phylum predominantemente de bacterias Gram-positivas, incluyendo anaerobios obligados o facultativos de la clase de *Bacillus*, *Clostridium* y *Mollicutes* que se ha reportado asociado a tractos gastrointestinales. Varios patógenos del phylum firmicutes han sido aislados de pájaros salvajes, incluyendo especies como *Mycoplasma gallisepticum*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens* (Benskin et al., 2009). Por su parte, el phylum *Proteobacteria* incluye bacterias Gram-negativas, en este phylum podemos encontrar una gran variedad de géneros con patógenos oportunistas, como *Campylobacter*, *Escherichia*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *vibrio* y *Helicobacter*, (Diakou et al., 2016; Keller et al., 2011; Ryu et al., 2014; Wallménus et al., 2014). Sin

embargo, de todos estos géneros que incluyen patógenos oportunistas en el análisis metagenómico sólo se identificó *Escherichia* y *Shigella* en 759 reads, además de enterobacterias que no fueron discriminadas a nivel de géneros específicos, pero pueden representar otros géneros de esta familia (Tabla 4).

En el análisis de las muestras de la paloma 1 y 2, se obtuvieron variaciones en los resultados de la diversidad taxonómica. Por un lado, la paloma 1 presenta el Phylum *Chlamydiae* el cual comprende la especie *Chlamydia psittaci*, reportada como una bacteria intracelular que causa la ornitosis y pertenece a este phylum, esta especie causa una enfermedad aviar epidémica en algunos mamíferos, y la psitacosis respiratoria en humanos y reconocida como una zoonosis (Heddema et al. 2006). Esta bacteria posee una etapa denominada cuerpo elemental, en el que puede infectar a las células y una etapa de cuerpo reticulado. En el momento, en el que está presente como cuerpo elemental se encuentra de manera extracelular, altamente contagioso y metabólicamente inactivo, esto produce que sea resistente a diversos factores ambientales, por ejemplo, logra perdurar en el suelo durante tres meses, al igual que en los excrementos de aves en los que pueden durar hasta un mes. Una vez los cuerpos elementales llegan a ser inhalados por un huésped y, según la variación de la cepa y las condiciones ambientales en las que se encuentre, el ciclo se desarrolla entre de 48 a 72 horas (Evans, 2011). Las palomas, pueden hospedar *Chlamydia psittaci* y convertirse en vectores. La evacuación de esta bacteria ocurre en las heces fecales y en las secreciones respiratorias, a menudo es intermitente y sin presentar problemas clínicos, lo que hace difícil identificar el riesgo de transmisión a otros animales, incluyendo los seres humanos (Heddema et al., 2006).

Comparando la diversidad taxonómica individual entre las muestras de la paloma 1 y 2, observamos variaciones en los resultados de la abundancia a nivel de phylum, familia y género. Por un lado, la paloma 1 presenta una mayor diversidad taxonómica (Figuras 2-4), que está representada por una distribución homogénea en familia y género, entre las familias más representativas pudimos encontrar *Acetobacteraceae* (9,90%), *Rhizobiaceae* (8,55%), *Enterobacteriaceae* (7,56%), *Burkholderiaceae* (6,02%), *Lactobacillaceae* (5,95%) y *Leuconostocaceae* (3,33%). Por otro lado, la

paloma 2 presenta una distribución con una sola familia predominante en términos de abundancia, que fue *Mycoplasmataceae* (53,26%); siendo esta tendencia idéntica entre familia y género. La paloma 2 además, presenta una alta abundancia del phylum *Tenericutes*, dentro del cual se encuentra el género *Mycoplasmataceae*; de las especies más representativas dentro del género *Mycoplasmataceae*, se encuentra *Mycoplasma gallisepticum*, la cual es el agente causal de la enfermedad respiratoria crónica (ERC) en aves y de la sinusitis infecciosa (Hennigan et al. 2012). Esta enfermedad tiene síntomas como la conjuntivitis, y en algunas ocasiones se presenta inflamación de los senos infraorbitales, rinitis y secreción ocular y nasal (Wijesurendra et al. 2015), así mismo pueden ser asintomáticas. En este caso, cuando se realizó la captura de los especímenes la paloma 2 no presentaba ningún síntoma que nos indicará que presentará dicho proceso infeccioso. Atribuimos esta diferencia en la diversidad taxonómica individual al estado específico de la microbiota intestinal en la paloma 2, que posiblemente estaba afectada por un proceso infeccioso debido a *M. gallisepticum*. La proliferación de organismos específicos puede cambiar la composición de la microbiota intestinal afectando la aptitud del huésped en relación a su salud. La teoría del hologenoma sostiene que los organismos evolucionan junto con sus microbiomas, y que la comunidad microbiana puede aumentar parámetros de aptitud, como la supervivencia, la plasticidad fenotípica y el rendimiento reproductivo (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008).

Existen reportes de salud pública en los que se muestran especies encontradas en el intestino de las palomas, las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Acero, et al. 2022), familia que también encontramos tanto en nuestros resultados metataxonómicos (Tabla 5) así como en la caracterización bioquímica. A través de la metodología utilizada, fue posible el cultivo y aislamiento de enterobacterias relevantes para la salud pública, en específico se identificaron 2 géneros: *Klebsiella* (paloma 1 con 4 cepas, paloma 2 con 3 cepas, paloma 3 con 1 cepa), *Escherichia* (paloma 2 con 2, paloma 3 con 1), correspondiente a un total de 11 cepas con identificación preliminar. Estos resultados son semejantes a los reportados en la literatura, donde se reporta la presencia de *Escherichia coli* en palomas (Carlos et al. 2017), en estudios relacionados en Colombia como en

Brasil, donde se aisló *Escherichia coli* a partir de muestras fecales que se encontraban en un 95%, y 98.91% de las muestras respectivamente (Pérez, García et al., 2015; Silva et al., 2009). Aunque, esta bacteria se considera parte de la microbiota normal, y no suelen ocasionar un problema clínico ni epidemiológico (Harlin, Wade 2009), se ha reportado el aislamiento de *E. coli* en heces de paloma de castilla (Perú), donde nueve de las palomas (60 %) fueron *E. coli* productoras de toxinas de tipo Shiga (STEC), las cuales pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos y seis de ellas (40 %) de *E. coli* enteropatógena (Carlos et al. 2017).

Aunque existen trabajos donde se reportan los riesgos potenciales en la salud pública de la paloma *C. livia* doméstica en Colombia, este trabajo corresponde a una aproximación inicial con un análisis metataxonómico a la diversidad microbiana en el tracto intestinal, aportando al desarrollo al entendimiento respecto al microbiota intestinal de *C. Livia* en nuestro país. No obstante, en este trabajo observamos una particularidad con una muestra que presenta una baja diversidad con respecto a la otra debido a una proceso infeccioso, se debe enfatizar el valor de la metagenómica para aproximarse al diagnóstico de agentes infecciosos de tipo zoonótico (Cuervo,Soto, et al., 2018). Cabe recalcar que existe una interdependencia entre los animales, el hombre y el medio ambiente, esta relación estrecha permite que exista un factor de riesgo en cuanto a enfermedades infecciosas, debido a ello se ha acuñado el concepto de “Una Salud” (Bidaisee, Macpherson, 2014). Este concepto fue adoptado por organizaciones internacionales y cuerpos escolares desde 1984 y hace referencia a un esfuerzo colaborativo de diversas disciplinas para lograr una salud óptima en los animales, los humanos y el medio ambiente. Que en últimas consecuencias permita la prevención y el control de patógenos infecciosos que son relevantes para el ecosistema; entre ellas las zoonosis, ya que cerca del 75% de los patógenos emergentes son zoonóticos (Chávez de Pop et al., 2020). Es importante entonces seguir con estudios en este tema que nos puedan permitir conocer el verdadero estado de las palomas, dado que el número total de muestras no nos permite concluir si esta distribución en la diversidad debido a este proceso infeccioso en particular es algo normal en las plazas de mercado colombianas o si es un resultado aislado.

4. Conclusiones

La paloma *C. livia* doméstica, es un huésped potencial de patógenos relevantes en la salud pública, debido a que son frecuentes en plazas donde los residuos alimenticios son abundantes. El análisis de taxonómico de heces de paloma doméstica reveló la presencia de diferentes géneros de bacterias como *Escherichia*, *Shiguella*, *Klebsiella*, *Mycoplasmas*, que pueden ser fácilmente transmisibles a los humanos, además, cabe resaltar que dentro del grupo de *Enterobacteriaceae_unclassified* pueden estar representados géneros como *Salmonella*, considerado uno de los géneros de bacterias con alta incidencia de transmisión por agua y alimentos contaminados con heces, al igual que *Escherichia coli*. Por lo tanto, se sugiere a la paloma doméstica *C. livia* como un riesgo potencial para la salud pública de las comunidades circundantes a la plaza de mercado, siendo un organismo que juega un papel importante como reservorio y vector indirecto de patógenos. Es necesario entonces ampliar el conocimiento en esta área y así poder implementar políticas públicas consecuentes que protejan a la población.

5. Agradecimientos

Agradezco a mi familia, mis padres que me dieron la oportunidad de empezar esta hermosa carrera, a mis hermanas y mis cuñados por estar siempre para apoyarme, a mi novio por ayudarme cada día y a mis abuelos

A mis amigos que me motivaron en todo este proceso, e hicieron que fuera el mejor

A mis directores el Dr. Nelson Arenas y la Dra. Laura Cuervo, por apoyarme y acompañarme en este proyecto, por siempre tener paciencia.

A la Asociación Colombiana de Infectología (ACIN) por la financiación de este proyecto.

6. Referencias

Acero Plazas, V. (2022). Intervención en el plan de saneamiento básico de una plaza de mercado de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia.

Arenas, N. E., & Salazar, L. M. (2019). Steps and Tools for PCR-Based Technique Design. In E. J. - Lopes, & L. Q. Zepka (Eds.), *Biotechnology and Bioengineering*. IntechOpen.

<https://doi.org/10.5772/intechopen.83671>

- Arenas, N. E., Polanco, J. C., Coronado, S. M., Durango, C. J., & Gómez, A. (2009). Design of a molecular method for subspecies specific identification of *Klebsiella pneumoniae* by using the 16S ribosomal subunit gene. *Colombia Médica*, 40(2), 194-201. <http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v40n2/v40n2a7.pdf>
- Barbosa-Brugés, P. A., Acero Plazas V. M., Arenas, N. E. (2020). Presencia de *Escherichia coli* con resistencia extendida a los antibióticos en la paloma doméstica (*Columba Livia*) en una localidad de Bogotá, Colombia. *Revista Ciencias Agropecuarias* 6 (2): 21–30. <https://doi.org/10.36436/24223484.312>
- Benskin, C. M. H., Wilson, K., Jones, K., & Hartley, I. R. 2009. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 84(3), 349–373. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00076.x>
- Bozeman, L. H., Kleven, S. H., & Davis, R. B. (1984). Mycoplasma Challenge Studies in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and Chickens. *Avian Diseases*, 28(2), 426. <https://doi.org/10.2307/1590349>
- Carlos, N., Tafur, E., Solano, E., & Alcazar, P. (2017). Enterobacterias de la paloma de castilla *Columba livia* en la ciudad de Lima, Perú. *Salud y Tecnol Vet*, 4(1), 9.
- Chávez de Pop, V. J., Estol, L., Cueva López, M. T., Acero Plazas, V. M. (2020). Zoonosis: Enfoque dentro del concepto de una salud. *Ciencias Agropecuarias*, 6(1), 87–96. <https://doi.org/10.36436/24223484.307>
- Cho, I., Yamanishi, S., Cox, L., Methé, B. A., Zavadil, J., Li, K., Gao, Z., Mahana, D., Raju, K., Teitler, I., Li, H., Alekseyenko, A. V., & Blaser, M. J. (2012). Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*, 488(7413), 621–626. <https://doi.org/10.1038/nature11400>
- Cottam, G., & Curtis, J. T. (1956). The Use of Distance Measures in Phytosociological Sampling. *Ecology*, 37(3), 451–460. <https://doi.org/10.2307/1930167>
- Cuervo-Soto, L. I., López-Pazos, S. A., & Batista-García, R. (2018). Metagenomics and diagnosis of

zoonotic diseases. In (Ed.), *Farm Animals Diseases, Recent Omic Trends and New Strategies of Treatment*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72634>

Diakou, A., Norte, A. C., Lopes de Carvalho, I., Nuncio, S., Nováková, M., Kautman, M., Alivizatos, H., Kazantzidis, S., Sychra, O., & Literák, I. (2016). Ticks and tick-borne pathogens in wild birds in Greece. *Parasitology Research*, *115*(5), 2011–2016. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4943-3>

Evans, E. E. (2011). Zoonotic diseases of common pet birds: psittacine, passerine, and columbiform species. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*, *14*(3), 457–476, vi. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2011.05.001>

For 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 77:3219.

González-Acuña, D., Silva, F., Moreno, L., Cerda, F., Donoso, S., Cabello, J., López, J. 2007.

“Detección de Algunos Agentes Zoonóticos En La Paloma Doméstica (Columba Livia) En La Ciudad de Chillán, Chile.” *Revista Chilena de Infectología*.

Grond, K., Perreau, J. M., Loo, W. T., Spring, A. J., Cavanaugh, C. M., & Hird, S. M. (2019).

Longitudinal microbiome profiling reveals impermanence of probiotic bacteria in domestic pigeons. *Plos One*, *14*(6), e0217804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217804>

Grond, K., Sandercock, B. K., Jumpponen, A., & Zeglin, L. H. (2018). The avian gut microbiota: community, physiology and function in wild birds. *Journal of Avian Biology*, *49*(11), e01788. <https://doi.org/10.1111/jav.01788>

Guo, X., Liu, S., Wang, Z., Zhang, X., Li, M., & Wu, B. (2014). Metagenomic profiles and antibiotic resistance genes in gut microbiota of mice exposed to arsenic and iron. *Chemosphere*, *112*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.068>

Harlin, R., & Wade, L. (2009). Bacterial and parasitic diseases of Columbiformes. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*, *12*(3), 453–473, Table of Contents. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2009.07.001>

Heddema, E. R., Ter Sluis, S., Buys, J. A., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., van Wijnen, J. H., &

Visser, C. E. (2006). Prevalence of *Chlamydothra psittaci* in fecal droppings from feral pigeons in Amsterdam, The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 4423–4425. <https://doi.org/10.1128/AEM.02662-05>

Hennigan, S. L., Driskell, J. D., Ferguson-Noel, N., Dluhy, R. A., Zhao, Y., Tripp, R. A., & Krause, D. C. (2012). Detection and differentiation of avian mycoplasmas by surface-enhanced Raman spectroscopy based on a silver nanorod array. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1930–1935. <https://doi.org/10.1128/AEM.07419-11>

Keller, J. I., Shriver, W. G., Waldenström, J., Griekspoor, P., & Olsen, B. (2011). Prevalence of *Campylobacter* in wild birds of the mid-Atlantic region, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 47(3), 750–754. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.3.750>

Laboratory, National Research Council (US) Committee on Hazardous Biological Substances in the, and National Research Council (US) Committee on Hazardous Biological Substances in the Laboratory. 1989. *Summary of Zoonotic Pathogens Causing Disease in Man*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK218632/>.

Looft, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., Sul, W. J., Stedtfeld, T. M., Chai, B., Cole, J. R., Hashsham, S. A., Tiedje, J. M., & Stanton, T. B. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(5), 1691–1696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120238109>

Mancera, Viviana Marcela Méndez. n.d. “‘La Paloma (Columba Livia) En La Transmisión de Enfermedades de Importa’ by Viviana Marcela Méndez Mancera, Luis Carlos Villamil Jiménez et Al.” Accessed March 19, 2022. <https://ciencia.lasalle.edu.co/ca/vol1/iss6/13/>.

Miller, E. R., & Fowler, M. E. (2011). *Fowler’s Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy, Volume 7 - E-Book* (1st ed., p. 688). Saunders

Noor, Asif, and Shailesh Khetarpal. 2022. “Anaerobic Infections.” *StatPearls*, May. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482349/>.

- Pérez-García, J., Monsalve-Arcila, D., & Márquez-Villegas, C. (2015). Presencia de parásitos y enterobacterias en palomas ferales (*Columba livia*) en áreas urbanas en Envigado, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 33(3), 370-376.
- Ryu, H., Grond, K., Verheijen, B., Elk, M., Buehler, D. M., & Santo Domingo, J. W. (2014). Intestinal microbiota and species diversity of *Campylobacter* and *Helicobacter* spp. in migrating shorebirds in Delaware Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), 1838–1847. <https://doi.org/10.1128/AEM.03793-13>
- Schloss PD, Westcott SL (2011). Assessing and improving methods used in OTU-based approaches
- Silva, V., Nicoli, J., Nascimento, T., & Diniz, C. (2009) Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains Recovered from Urban Pigeons (*Columba livia*) in Brazil and their Antimicrobial Susceptibility IPatterns. *Current Microbiology*, 59(3), 302-308.
- Villalba Sánchez, Carmen. 2015. “Density of Domestic Pigeons (*Columba Livia Domestica* Gmelin, 1789) in the New Public Amarket of Sincelejo, Sucre, Colombia.”
- Wallménius, K., Barboutis, C., Fransson, T., Jaenson, T. G. T., Lindgren, P.-E., Nyström, F., Olsen, B., Salaneck, E., & Nilsson, K. (2014). Spotted fever *Rickettsia* species in *Hyalomma* and *Ixodes* ticks infesting migratory birds in the European Mediterranean area. *Parasites & Vectors*, 7, 318. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-318>
- Wijesurendra, D. S., Kanci, A., Tivendale, K. A., Bacci, B., Noormohammadi, A. H., Browning, G. F., & Markham, P. F. (2015). Development of a *Mycoplasma gallisepticum* infection model in turkeys. *Avian Pathology*, 44(1), 35–42. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.992390>
- Zhang, H., DiBaise, J. K., Zuccolo, A., Kudrna, D., Braidotti, M., Yu, Y., Parameswaran, P., Crowell, M. D., Wing, R., Rittmann, B. E., & Krajmalnik-Brown, R. (2009). Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), 2365–2370. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812600106>
- Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 723–735.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x>

Zúñiga, E., León, D., Falcón, N. 2017. “Plagas Urbanas: Las Palomas y Su Impacto Sobre El Ambiente y Salud Pública.” *Resvista de Ciencias Veterinarias* 33(1):5-12: 5–12.

Anexo 1

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Kit de Identificación BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID System

Muestra	Identificación	Factor de confianza
Muestra P1-2	<i>Escherichia coli</i>	93.28%
Muestra P1-3	<i>Serratia odorifera</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	73.3% 66.7%
Muestra P1-9	<i>Escherichia coli</i>	99.11%
Muestra P1-10	<i>Escherichia coli</i> - serotipo 0111 - serotipo 0157	99.11% 83.3% 86.7%
Muestra P1-12	<i>Proteus sp (no Proteus vulgaris)</i> <i>Morganella morganii sub sibonii</i>	76.7% 70%
Muestra P2-1	<i>Escherichia coli</i> <i>Serratia sp</i>	73.3% 70%
Muestra P2-8	<i>Enterobacter sp</i> <i>Serratia</i>	80% 76.7%
Muestra P2-7	<i>Enterobacter sp</i> <i>Raoultella sp</i>	75% 70%
Muestra P2-10	<i>Enterobacter sp</i> <i>Klebsiella sp</i>	83.3% 76%
Muestra P2-12	<i>Escherichia coli</i> <i>Aeromonas sp</i>	80% 77%
Muestra P3-3	<i>Kluyvera sp</i>	74%
Muestra P3-5	<i>Escherichia coli</i>	94%
Muestra P3-11	<i>Aeromonas sp</i>	66.6%
Muestra P3-13	No se pudo identificar	