

PRESENCIA DE *Cryptococcus neoformans* EN EXCRETAS DE PALOMAS URBANAS EN SAN MIGUEL DE TUCUMÁN - ARGENTINA

(*Presence of *Cryptococcus neoformans* in urban pigeons excreta from San Miguel de Tucumán – Argentina*)

Alvarez C¹., Salim R²., Runco R^{1,2}

1- Laboratorio de Micología del Hospital del Niño Jesús.
Pasaje Hungría 750. (4000) Tucumán. R. Argentina.

2- Cátedra de Micología. Instituto de Microbiología
Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad
Nacional de Tucumán. Ayacucho 491- (4000) Tucumán. R. Argentina
bqco_christianalvarez@hotmail.com

Palabras claves: *Cryptococcus neoformans*, excretas de palomas, espacios públicos, antifúngicos.

Key words: *Cryptococcus neoformans*, pigeon's excreta, public spaces, antifungal.

RESUMEN

Con la finalidad de detectar la presencia del complejo *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas (*Columba livia*) que habitan los espacios públicos del perímetro urbano de San Miguel de Tucumán, Argentina, se recogieron 100 muestras de 5 localizaciones diferentes. Como medio de aislamiento se empleó Agar-Semillas de Níger y las levaduras fueron identificadas mediante la presencia de cápsula, prueba de la ureasa, producción de fenol-oxidasa, asimilación de carbohidratos y crecimiento a 37°C. La especie fue determinada usando el medio Canavanina-Glicina-Azul de bromotimol.

C. neoformans var. *neoformans* fue aislado en todas las 55 muestras de las áreas estudiadas, reflejando una amplia distribución en la zona céntrica de la ciudad preferentemente en excretas secas acumuladas. La sensibilidad *in vitro* frente a Fluconazol, Itraconazol, Anfotericina B y Voriconazol fue determinada por el método de difusión en placa usando tabletas Neo-Sensitabs. Todos los aislamientos fueron sensibles a los antifúngicos testeados.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas emergentes son aquellas que reaparecen en una población o rango geográfico. Una vía para el entendimiento y prevención

ABSTRACT

With the purpose of detecting the presence of *Cryptococcus neoformans* complex in excreta of pigeons inhabiting public spaces belonging to the urban perimeter of San Miguel de Tucumán, Argentina, one hundred samples were collected from five different locations. Niger seed agar plates were used as means of isolation and yeasts were identified through the presence of capsule, urease test, phenoloxidase production, carbohydrate assimilation and growth at 37°C. Species was determined with the CGB method.

C. neoformans var. *neoformans* was isolated in all 55 samples of the studied areas showing a wide distribution downtown, mainly in dried excreta settlements. *In vitro* sensibility in front of Fluconazol, Itraconazol, Anfotericina B and Voriconazol was fixed by means of the diffusion method by using Neo-Sensitabs tablet. All isolations proved to be sensible to the tested antifungal.

de estas enfermedades, es definir los factores predisponentes que pueden incluir: cambios ecológicos, alteraciones demográficas, viajes y comercio, tecnología, adaptación de los microorganismos y medidas de salud pública. (Taubenberger & Morens, 2006). La diseminación geográfica de un microorganismo infeccioso puede ocasionar un brote, como el de criptococosis producido por *C. gattii* en la Isla de Vancouver, Canadá (Hoang *et al.*, 2004).

La criptococosis es una micosis sistémica de curso subagudo o crónico y de amplia distribución mundial. El

Recibido el 27 de Marzo 2010

Aceptado el 2 de Julio 2010

agente etiológico es una levadura capsulada, del género *Cryptococcus*, capaz de causar enfermedades serias y aún fatales en individuos inmunocomprometidos, especialmente aquellos con SIDA (Mattsson *et al.*, 1999).

El hombre puede infectarse por la inhalación de propágulos aéreos de *Cryptococcus* a partir de fuentes ambientales (Ellis & Pfeiffer, 1990; Casadevall & Perfect, 1998; Heitman & Lin, 2006).

C. neoformans y *C. gattii*, son las especies patógenas más importantes del denominado complejo *Cryptococcus neoformans*. Estas levaduras presentan, entre otras, importantes diferencias en su ecología, epidemiología de la micosis que producen, y corresponden a grupos monofiléticos y divergentes entre sí. (Kwon-Chung *et al.*, 2002, 2006; Heitman & Lin, 2006). Diversas investigaciones permitieron conocer los nichos ecológicos del complejo *C. neoformans*, siendo aislado de heces de aves, de animales domésticos y salvajes, suelos y vegetales (Pal, 1984; Kielstein *et al.*, 2000a, 2000b; Lazera *et al.*, 1996; Granados *et al.*, 2005; Tampieri, 2006; Heitman & Lin, 2006; Rosario *et al.*, 2005, 2008).

La paloma urbana (*Columba livia*) es, sin duda, la más importante como reservorio de la levadura, pero el estudio de una gran diversidad de especies de pájaros, deja claro que no es la única portadora de criptococos patógenos. En 1955, Emmons fue el primero en establecer la relación existente entre la levadura y las heces de estas aves. Estudios posteriores realizados por el propio Emmons (1960, 1995) y por otros investigadores de casi todo el mundo, han demostrado que las deposiciones de paloma son un importante reservorio de *C. neoformans*.

La densidad poblacional de esta levadura en *C. livia*, es significativamente superior a la de otras fuentes, lo que sugiere que las excretas ofrecen condiciones sustentables, donde, posiblemente otros microorganismos no representen una competencia para este hongo (Abou-Gabal & Atia, 1978; Staib & Blisse, 1982). La falta de evidencias de una transmisión directa individuo-individuo, sustenta la hipótesis de que la infección podría adquirirse a partir de estas fuentes medioambientales por inhalación (Casadevall & Perfect, 1998; Pollock, 2003).

Por otro lado, existen evidencias importantes que establecen una relación entre la distribución mundial de *C. neoformans* y los suelos contaminados con excretas de aves (Hsu *et al.*, 1994; Emmons, 1995; López-Martínez & Castañón-Olivares, 1995; Passoni, 1999; Chee & Lee, 2005; Curo *et al.*, 2005; González Acuña *et al.*, 2007). Esta peculiar distribución geográfica hace importante el estudio de su nicho ecológico, como posible fuente de contagio para individuos susceptibles (Staib, 1987).

La sospecha de que estas aves sean la fuente de la enfermedad está comenzando a ser demostrada por la aplicación de métodos moleculares de tipificación que

permiten comparar, con un alto grado de discriminación, las cepas encontradas en pacientes y en los animales desde su entorno más próximo (Heitman & Lin, 2006; Rosario *et al.*, 2008).

En un estudio epidemiológico sobre criptococosis en San Pedro, Provincia de Buenos Aires, Argentina, Bava y Negroni (1986) aislaron *C. neoformans* en heces de palomas recogidas de palomares. En 1989, Rubinstein *et al.*, aislaron *C. neoformans* del suelo de dos áreas endémicas de la provincia de Córdoba. En Santa Fe, Vanni *et al.*, (1998), detectaron *C. neoformans* en excretas de *Columba livia* principalmente de la zona céntrica y también en la zona costera. Pero, hasta donde sabemos, en la Argentina no hay estudios sobre la ocurrencia e identificación de esta levadura en excrementos de palomas recogidos en áreas públicas de Tucumán- Argentina, ni estudios sobre su sensibilidad antifúngica *in vitro*.

En 2008, iniciamos la investigación de la presencia de *C. neoformans* en material recolectado de la madera en descomposición presente en cavidades de troncos de diferentes géneros y especies de árboles vivos, autóctonos de nuestra provincia, encontrados normalmente en los espacios públicos. Se detectaron altas concentraciones de propágulos del complejo *C. neoformans* en *Jacaranda mimosifolia* (nombre común Tarco) y *Enterolobium contortisiliquum* (Pacará) (Álvarez *et al.*, 2009).

Por lo expuesto, se investigó la presencia de *C. neoformans* en excretas de palomas desde espacios públicos del perímetro urbano de San Miguel de Tucumán, Argentina, para conocer su distribución ecológica local, y determinar la sensibilidad antifúngica *in vitro* de las cepas aisladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó entre los meses de Febrero y Mayo de 2009, en el laboratorio de Micología del Hospital del Niño Jesús, Tucumán- R. Argentina.

Se recolectaron un total de 100 muestras del radio urbano de San Miguel de Tucumán, a partir de las heces desecadas de palomas presentes en los suelos de los siguientes espacios públicos: Plaza Bernardino Rivadavia, Plaza Hipólito Irigoyen, Plaza Independencia, Plaza General Justo José de Urquiza y Parque Avellaneda. En cada lugar se recogieron 20 muestras (Fig. 1).

Para la toma de muestras de las deyecciones secas de las aves (al abrigo del sol a fin de reducir la exposición a la radiación UV), se emplearon hisopos de algodón estériles, humedecidos en solución salina estéril adicionada de Cloranfenicol 0,2 g.L.

Cada muestra fue inoculada en placas individuales de Agar Semillas de Niger (NSA). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente al abrigo de la luz, con observación

diaria y hasta 4 días.

Las colonias de color marrón oscuro, características de la especie, que permitió su diferenciación de los microorganismos acompañantes, fueron traspasadas a nuevas placas de NSA para la obtención de cultivos puros. Se realizaron además subcultivos en Sabouraud glucosa agar (SGA) para la realización de las pruebas de identificación morfológica y bioquímica.

La caracterización morfológica de los cultivos, se realizó mediante análisis macro-micromorfológicos de las colonias aisladas en NSA y SGA a 1° ambiente.

La identificación bioquímica se realizó mediante estudios de fermentación de carbohidratos, asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno realizadas por el método comercial API® 20 C Aux (bioMérieux- France), detección de ureasa y fenoloxidas, sensibilidad a cicloheximida a 25°C y 37°C y termotolerancia a 37°C. La especie se determinó utilizando el medio agarizado de canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB) a 28°C durante cinco días.

C. neoformans fue identificado sobre la base de los siguientes caracteres positivos o negativos: ureasa, inositol KNO₃, lactosa, maltosa, sacarosa, galactitol, pseudomicelio y modificación del color del CGB.

A partir de cada una de las muestras positivas, se evaluó su sensibilidad antifúngica por el método de difusión en placas de Agar Mueller-Hinton suplementado con 2% de Glucosa y 0.5 ug/ml de azul de metileno (MHM). El inóculo se obtuvo a partir del cultivo puro en SGA de 48 hs, ajustándolo a 1-5 x 10⁶ UFC/mL (equivalente al 0.5 de la escala de McFarland), en solución 0,15 M de cloruro de sodio estéril. Posteriormente, se embebió un hisopo estéril con el inóculo y se esparció sobre la superficie de la placa de Petri en tres direcciones. Las placas inoculadas se colocaron en estufa a 30°C durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo, con la ayuda de una pinza estéril, se colocaron las tabletas Neo-Sensitabs (Rosco Diagnóstica) de: Anfotericina B [10 µg], Fluconazol [25 µg], Itraconazol [8 µg], y Voriconazol [1 µg] por placa e incubadas a 35°C. Los controles de calidad fueron testeados de la misma manera con *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258.

Los halos de inhibición fueron medidos en milímetros a las 48 y 72 hs. Se utilizaron los criterios de interpretación de los halos establecidos para Fluconazol (FCZ) y Voriconazol (VOR) por el Clinical and Laboratory Standards Institute en 2006 y al igual que Espinel-Ingroff *et al.*, (2007), consideramos halos de inhibición frente a Itraconazol >23 mm (sensibles), entre 14 a 22 mm (sensibles dosis dependientes), y < 13 mm (resistentes). En el caso de la Anfotericina B (ANB), aún no se han establecido los puntos de corte de CIM o halos de discos para cepas susceptibles o resistentes.

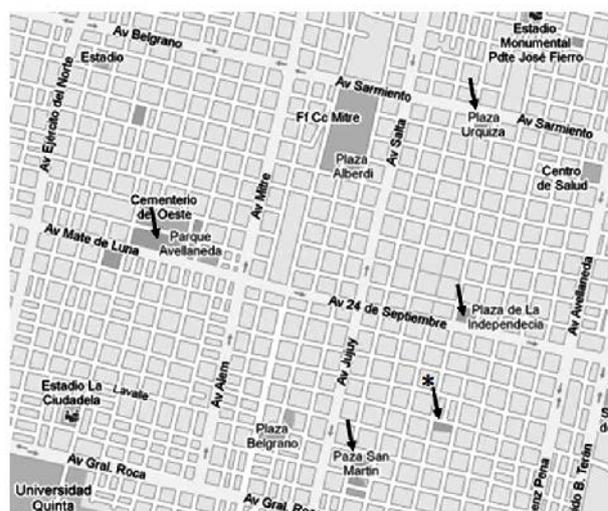


Figura 1. Mapa del radio céntrico de la ciudad de San Miguel de Tucumán indicando los lugares de estudio. (*Plaza Rivadavia)

RESULTADOS

Del total de 100 muestras de excrementos de paloma, 55 fueron positivas a *Cryptococcus*. La observación macroscópica en NSA reveló colonias húmedas, brillantes, de color marrón oscuro debido a la acción de la enzima fenol-oxidasa sobre el sustrato. En SGA se observó el desarrollo de colonias lisas, brillantes, húmedas, de consistencia mucosa, de color blanco-crema. A los 4-5 días el color blanco primitivo se fue oscureciendo al tono canela o pardo. El examen microscópico en fresco, con tinta china diluida 1:4, reveló levaduras globosas a ovoides, de 3 a 7 µm de diámetro, capsuladas, generalmente con un único brote, sin producción de pseudohifas. El resultado de las pruebas morfofisiológicas permitió clasificar a todas las cepas aisladas como *C. neoformans* var. *neoformans* en base a los siguientes caracteres: ureasa (+), Inositol (+), KNO₃ (-), Lactosa (-), Maltosa (+), Sacarosa (+), Galactitol (+), pseudomicelio (-), no modifica el color del CGB.

El número de colonias por muestra fue notablemente variable según el microambiente del que fueron aisladas. Cabe destacar que en 11 muestras se obtuvieron cultivos puros a partir del aislamiento ambiental.

C. neoformans var. *neoformans* se desarrolló en todos los espacios públicos, encontrándose el mayor porcentaje en Plaza Independencia (65%), y el menor en Plaza Irigoyen (45%) (Fig. 2).

Todas las cepas testeadas fueron sensibles a FCZ y VOR. Ninguna de las 55 cepas, presentó halos inferiores a 28 mm frente a ITR, por lo que consideramos que fueron sensibles al mismo. El promedio de la lectura de los halos de inhibición de ANB fue de 21 a 24 mm.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio, empleamos la detección de los integrantes del género *Cryptococcus*, mediante la técnica por hisopado, por requerir menor tiempo y trabajo de procesamiento, costos menores y una baja manipulación de material potencialmente infeccioso, diferenciándose de la metodología de otros autores, que emplearon técnicas que permiten un recuento de colonias por gramos del material.

Se determinó la elevada prevalencia, de entre un 45 al 65%, de *Cryptococcus neoformans* en las heces de palomas de los principales espacios públicos de la ciudad de San Miguel de Tucumán, donde transitan, cotidianamente, un número muy importante de personas de todas las edades, lo que sugiere un potencial riesgo en salud pública en individuos con compromiso inmune, por la exposición aérea de este microorganismo.

En coincidencia con Chee y Lee (2005) consideramos importante que se efectúen estudios adicionales que cubran otras zonas de la provincia, con mayor número de muestras (especialmente estacionales), a fin de investigar la distribución geográfica y las características de la población del complejo *C. neoformans* presente en las deyecciones de estas aves. Por otro lado, resultaría conveniente que las cepas tipificadas sean comparadas con aislamientos clínicos de nuestra ciudad y sean sometidas a estudios moleculares para poder determinar si estas son las causantes de la infección.

Nuestros resultados confirman los hallazgos de otros autores en el sentido que las excretas de palomas son una importante fuente ambiental y de diseminación de *C. neoformans* (Caicedo *et al.*, 1996; Curo *et al.*, 2005; Quintero *et al.*, 2005; González-Acuña *et al.*, 2007; Rosario

et al., 2008), aunque sólo algunos estudios han encontrado *C. neoformans* en el cuerpo de estas aves (Rosario *et al.*, 2005). La explicación podría deberse a varios factores tales como: la elevada temperatura interna corporal de las palomas (alrededor los 42°C), que imposibilita el desarrollo de *C. neoformans* y a la microbiota bacteriana del contenido intestinal de palomas aparentemente sanas, que inhibe el desarrollo de este patógeno *in vitro* (Abou-Gabal, 1978). Por otro lado, *C. neoformans*, ha sido recuperado a partir de la superficie corporal de aves incluyendo: plumas, picos, alas y patas, posiblemente por su relación con un hábitat contaminado y enriquecido por las excretas de estas aves (Pal, 1989; Mangiarotti *et al.*, 1993). Además, los excrementos secos representan un sustrato favorable que contienen pocas bacterias y por lo tanto menor competencia, lo que podría explicar su alta frecuencia. (Abou-Gabal, 1978; Ruiz *et al.*, 1981). Otra hipótesis sugiere que el hongo podría ser un geófilo y prosperar en este ambiente particular (Idnurm *et al.*, 2005).

Si se considera que estas aves tienen el hábito de raspar y fragmentar pedazos de madera, ramas y gajos, podríamos suponer que estas costumbres favorecerían la contaminación y diseminación de *C. neoformans* en los árboles que encontramos con presencias positivas en el año 2008 (Pza. Rivadavia e Irigoyen, Álvarez *et al.*, 2009) lo que sugiere la necesidad de efectuar estudios moleculares a fin de confirmar si corresponden a los mismos genotipos.

Existen pocos estudios que evalúan la susceptibilidad antifúngica de cepas ambientales. Entendemos que el presente, es el primer estudio que investiga la actividad *in vitro* de aislamientos ambientales de *C. neoformans*, recuperados en Tucumán, frente a FCZ, ITR, ANB y VOR. Asumiendo que la sensibilidad de *C. neoformans* a los antifúngicos se encuentra relacionada al área geográfica (Pernan *et al.*, 2006), nuestros datos sobre la susceptibilidad de las cepas ambientales pueden reflejar los patrones para los aislamientos clínicos de nuestra región geográfica.

En concordancia con el estudio realizado en Turquía por Yildiran *et al.* (2000), con 27 cepas recuperadas de heces de palomas, no encontramos cepas resistentes a FCZ y VOR, mientras Pernan *et al.*, (2006), en una revisión de 2687 aislamientos clínicos de *C. neoformans*, encontraron que sólo el 0,9% fue resistente a VOR. Si bien utilizamos el método de difusión en placa de agar MHM, en lugar de aplicar la técnica gold standard (método de macro o microdilución), sustentamos nuestro resultado en los estudios de Espinel-Ingroff *et al.*, (2007), quienes obtuvieron una buena correlación con las tabletas de Neo-Sensitab a los mismos antifúngicos. Asimismo, en el estudio de Pfaller *et al.* (2004), esta técnica permitió la identificación de cepas de *C. neoformans* sensibles dosis dependiente al FCZ.

Los puntos de corte para la concentración inhibitoria

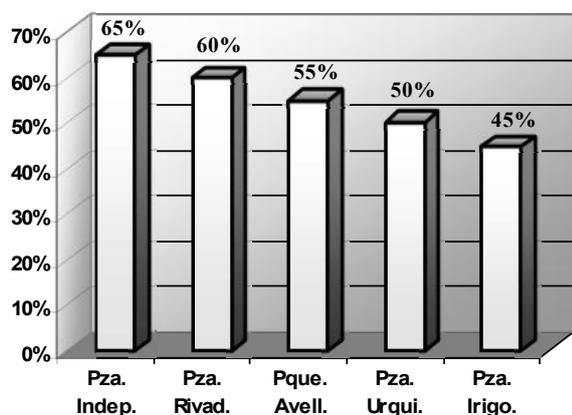


Figura 2. Porcentaje de aislamiento de *C. neoformans* en heces de palomas en 5 espacios públicos de San Miguel de Tucumán, Argentina. 2009.

mínima (CIM) para ITR, han sido establecidos, pero aún no hay guías disponibles para la interpretación de las pruebas con discos. Por ello, aplicamos los mismos criterios que Espinel-Ingroff *et al.*, (2007), hallando en todas las cepas diámetros mayores a los 5 mm del punto de corte considerados como sensibles. Datos similares fueron obtenidos en España por Carrillo-Muñoz *et al.*, (1997), donde todos los aislamientos clínicos de *C. neoformans* fueron sensibles a ITR y también a FCZ e Imidazoles.

A pesar de los problemas metodológicos asociados a ANB, y que Espinel-Ingroff *et al.*, (2007) no pudieron identificar cepas resistentes a ANB y que además tuvieron baja correlación al usar Neo-Sensitab en comparación con el análisis de microdilución (CLSI: documento M27-A2) y de difusión en disco (CLSI: documento M44-A); consideramos necesario efectuar esta prueba, ya que el tratamiento de predilección frente a la meningitis por *C. neoformans* es ANB. Los resultados logrados frente a ANB, sugieren que se trataría de cepas sensibles según los puntos de corte sugeridos por el fabricante (>15 mm), pero pensamos que deberían ser comparados en un futuro cuando se disponga de zonas de diámetro de referencia para ANB.

Por otra parte, el presente estudio es de interés si se considera el marcado incremento de la incidencia de esta micosis asociada con el crecimiento poblacional de pacientes inmunodeprimidos y pacientes infectados con VIH, debido que en la provincia de Tucumán se registraron más de 700 diagnósticos en el período 1987-2009 (UCA, 2010). De aquí la importancia de métodos de control que eviten la acumulación de las excretas de palomas en la ciudad, mediante la limpieza periódica de las mismas, especialmente en zonas aledañas a los centros hospitalarios.

Igualmente, juzgamos que es necesario profundizar estos estudios y establecer mecanismos de vigilancia epidemiológica, ya que los resultados revelan un alto grado de positividad frente a un hongo patógeno oportunista.

REFERENCIAS

- Abou-Gabal, M. & Atia, M. (1978). Study of the role of pigeons in the dissemination of *Cryptococcus neoformans* in nature. *Sabouraudia* 16:63-68
- Álvarez, C.; Salim, R. & Runco, R. (2009). Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* desde madera en descomposición de *Jacaranda mimosifolia* y *Enterolobium contortisiliquum*. *Boletín Micológico* 24:15-20
- Bava, A.J. & Negroni, R. (1986). Estudio epidemiológico sobre Cryptococcosis en San Pedro Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Argentina de Micología* 9(3):12-6
- Bernardo, F.; Martins, M. & Lígia, M. (2001). Fontes urbanas de *Cryptococcus* spp. Lisboa. *Rev Port Ciênc Vet*; 96 (539): 157-60
- Caicedo, L.; Alvarez, M.; Llanos, C.; Molina, D. (1996). *Cryptococcus neoformans* en excreta de palomas del perímetro urbano de Cali. *Colombia Med.* 27:106-9
- Carrillo-Muñoz, A.J.; Tur, C.; Estivill, D.; Montsant, L.; Carceller, A.; Hernandez, J.M.; Torres-Rodriguez, J.M. (1997). Resistencia in vitro al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida* spp. y *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Iberoam Micol.* 14:50-54.
- Casadevall, A. & Perfect, J.R. (1998). *Cryptococcus neoformans*. Washington D.C., ASM Press
- Cermeño, J.; Hernández, I.; Cabello, A.; Caraballo, Y.; Orellán, A.; Padrón, J. (2002). Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* en excreta de palomas, en Ciudad de Bolívar, Venezuela. En: Libro de Resúmenes del IV Congreso Latino Americano de Micología. Veracruz: Sociedad Latinoamericana de Micología p. 435
- Chee, H.Y. & Lee, K.B. (2005). Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) from Pigeon Droppings in Seoul, Korea. *Journal of Microbiology.* 43:469-472
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Zone diameter interpretive standards and corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints. Supplement M44-S1. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Colom Valiente, M.F.; Alberdi, M.; Meseguer, I.; Torres, J. (1997). Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en muestras de medio ambiente de Alicante. *Rev Iberoam Micol* 14:63-64
- Curo, M.I.; Salinas, M.F. & Casquero, J. C. (2005). *Cryptococcus neoformans* en excretas de palomas, suelo y aire de los palomares del perímetro urbano de Ica. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* 22: 262-266
- Ellis, D.H. & Pfeiffer, T.J. (1990). Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J. Clin. Microbiol.* 28:1642-1644
- Emmons, C.W. (1955). Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am. J. Hyg.* 62:227-232
- Emmons, C.W. (1960). Prevalence of *Cryptococcus neoformans* in pigeon habitats. *Publ Health Rep* 75:362-364
- Emmons, C.W. (1995). Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). *Am. J. Hyg.* 62:227-232
- Espinel-Ingroff A.; Canton, E.; Gibbs, D. & Wang, A. (2007). Correlation of Neo-Sensitabs Tablet Diffusion Assay Results on Three Different Agar Media with CLSI Broth Microdilution M27-A2 and Disk Diffusion M44-A Results for Testing Susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to Amphotericin B, Caspofungin, Fluconazole, Itraconazole, and Voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology.* 45:858-864

- González-Acuña, D.; Silva, G.F.; Moreno, S.L.; Cerda, L.F.; Donoso, E.S.; Cabello, C.J.; y López, M.J. (2007). Detección de algunos agentes zoonóticos en la paloma doméstica (*Columba livia*) en la ciudad de Chillán, Chile. *Rev. Chil. Infect.* 24 :194-198
- Granados, D.P. & Castañeda, E. (2005). Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogota, Colombia, and study of ecological conditions in the area. *Microb. Ecol.* 49:282-90
- Heitman, J. & Lin, X. (2006) The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Rev Microbiol.* 60:69-105
- Hoang, L.M.; Maguire, J.A.; Doyle, P.; Fyfe, M.; Roscoe, D.L. (2004). *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997–2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *J. Med. Microbiol.* 53:935-940
- Hsu, M.M.; Chang, J.C.; Yokoyama, K.; Nishimura, K.; Miyaji, M. (1994). Serotypes and mating types of clinical strains of *Cryptococcus neoformans* isolated in Taiwan. *Mycopathologia* 125:77-81
- Idnurm, A.; Bahn, Y.S. ; Nielsen, K.; Lin, X.; Fraser, J.A.; Heitman, J. (2005). Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:753-764
- Kielstein, P. & Bocklish, H. (2000a). Evidence of *Cryptococcus neoformans* in domestic and sports pigeons in Thuringia, Germany. *Mycoses* 43, 23-28
- Kielstein, P.; Hotzel, H.; Schmalreck, A.; Khaschabi, D.; Glawischig, W. (2000b). Occurrence of *Cryptococcus spp.* in excreta of pigeons and pet birds. *Mycoses* 43:7-15
- Kwon-Chung, K.J.; Boekhout, T.; Fell, J.W. & Diaz, M. (2002). Proposal to converse the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurianus* and *C. ballisporus* (*Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae*). *Taxon* 51:804-806
- Kwon-Chung, K.J. & Varma, A. (2006). Do major species concept support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 6:574 - 587
- Lazera, M.S.; Pires, F.; Camillo-Coura, L.; Nishikawa, M.; Bezerra, C.F.; Trilles, L. (1996). Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in decaying wood forming hollows in living trees. *J. Med. Vet. Mycol.* 34:127-131
- Li, A.; Nishimura, K.; Taguchi, H.; Takana, R.; Wu, S.; Miyaji, M. (1993). The isolation of *Cryptococcus neoformans* from pigeon droppings and serotyping of naturally and clinically sources of isolates in China. *Mycopathologia* 124:1-5
- López-Martínez, R. & Castañón-Olivares, L.R. (1995). Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from bird droppings, fruits and vegetables in Mexico City. *Mycopathologia* 129:25-28
- Mangiarotti, A.M.; Caretta, G.; De Luca, Carla. & Piontelli, E. (1993). Hongos aislados del plumaje y excrementos de gallinas en una industria avícola de Monferrato (Pavia-Italia). *Bol. Micol.* 8: 91-98
- Mattsson, R.; Haemig, P.D. & Olsen, B. (1999). Feral pigeons as carriers of *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus uniguttulatus* and *Debaryomyces hansenii*. *Medical Mycology* 37:367-370
- Pal, M. & Mehrotra, B.S. (1984). Studies on the isolation of *Cryptococcus neoformans* from fruits and vegetables. *Mykosen* 28:200-205
- Pal, M. (1989). *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and munia birds. *Mycoses* 32:250-52
- Passoni, L.F.C. (1999) Wood, animals and human beings as reservoirs for human *Cryptococcus neoformans* infection. *Rev. Iberoam Micol.* 16:77-81.
- Pernan, J.; Canton, E.; Calabuig, E.; Bosch, M.; Valentín, A.; Viudes, A.; Gobernado, M. (2006). Actividad in vitro del voriconazol frente a levaduras y algas con los nuevos puntos de corte del patrón de resistencia. *Rev. Esp. Quimioterap.* 19:21-33
- Pfaller, M.A.; Messer, S.A.; Boyken, L.; Rice, C.; Tendolkar, S.; Hollis, R. J.; Diekema, D. J. (2004). Evaluation of NCCLSM44-P disk diffusion method for determining susceptibilities of 276 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* to fluconazole. *J. Clin. Microbiol.* 42:380-383
- Pollock, C. (2003). Fungal diseases of columbiformes and anseriformes. *Veterinary Clin. North. Am Exot Anim Pract;* 6:351-361
- Quicaño, L.; Romero, S.; Zurita, S. & Casquero, J. (1999). Aislamiento de *Cryptococcus neoformans* en heces, suelo y aire de viviendas con palomas domésticas «*Columbia livia*» – Ayacucho. En: Libro de Resúmenes del III Congreso Latinoamericano de Micología. Venezuela: Sociedad Latinoamericana de Micología; p. 101.
- Quintero, E.; Castañeda, E. & Ruiz, A. (2005). Distribución ambiental de *Cryptococcus neoformans* en el departamento de Cundinamarca–Colombia. *Rev. Iberoam. Micol.* 22:93-98
- Rivas, F.; De Martin, M.C. & Rojas, V. (1999). Primer aislamiento de *Cryptococcus neoformans* a partir de suelos en Panamá. *Rev. Med. Panama.* 24:4-6
- Rosario, I.; Hermoso de Mendoza, M.; Deniz, S.; Soro, G.; Alamo, I.; Acosta, B. (2005). Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. *Mycoses* 48:421-24
- Rosario, I.; Acosta, B. & Colom, F. (2008). La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus spp.* *Rev. Iberoam. Micol.* 25:S13-S18
- Rubinstein, H.; Marticorena, B. & Masih, D. (1989). Isolation of human fungi from soil and identification of two endemic areas of *Cryptococcus neoformans* and *Coccidioides immitis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 31:1-6
- Ruiz, A.; Fromtling, R.A. & Bulmer, G.S. (1981). Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. *Infect. Immun.* 31:560-63
- Samman, S.; Diaz, L.; Salamanca, F. & Prado, V. (1994). *Cryptococcus neoformans* (San Felice Vuillemin) en aves confinadas y recintos hospitalarios de la región Metropolitana (Chile). *Boletín Mycol.* 9 :65-72
- Silva, M. & Luiza, P. (1963). Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de excrementos e ninhos de pombos (*Columba livia*) em Salvador, Bahia (Brasil). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 5:9-11

Staib, F. & Blisse, A. (1982). Bird manure últrate agar for the formation of the perfect state of *Cryptococcus neoformans*, *Filobasidiella neoformans*. A comparative study of the agars prepared from pigeon and canary manure. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A 251:554-62

Staib, F. (1987). Cryptococcosis in AIDS-Mycological diagnostic and epidemiological observations. AIFO. 2:363-382

Tampieri, M.P. (2006). Mycetes and urban areas. Parassitologia 48:121-124

Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. (2006). 1918 inûenza: the mother of all pandemics. Emerg. Infect. Dis. 12:15-22

U.C.A. Unidad Coordinadora y Ejecutora Provincial VIH/SIDA y ETS. SIPROSA. Tucumán. (2010). http://www.msptucuman.gov.ar/archivos/pdf/SALA_7_junio_2010_web.pdf

Vanni, C.; Sarsotti, P.V.; Ruatta, J.; García, G.; Gutierrez, C.; Cabagna, M. (1998). Ecología del *Cryptococcus neoformans* en Santa Fe. Revista FABICIB 2 :25-30

Yehia, A. ; Mahmoud, G. (1999). First environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* from the Gharbia Governorate, Egypt. Mycopathologia 148:83-86

Yimtubezenash, W.A.; Jemaneh, L. & Abate, K. (2001). Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* from environmental sources in Ethiopia. Ethiop.J.Health Dev. 15:45-50

Yildiran S.T.; Sarachi M.A.; Fothergill A.W. & Rinaldi M.G. (2000). In vitro suceptibility of environmental *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolates form Turkey to six antifungal agents, including SCH56592 and Voriconazole. Journal Clin. Microb. Infect. Dis. 19:317-319