

# Ocorrência de *Cryptococcus* spp e de parasitas de interesse em saúde pública, nos excretas de pombos na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

## Occurrence of *Cryptococcus* spp and parasites of interest in public health in pigeons excrement in the city of Ribeirão Preto, SP, Brazil

RIALA6/1166

Jaqueline Otero SILVA\*<sup>1</sup>, Divani Maria CAPUANO<sup>2</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Lutz, Laboratório I Ribeirão Preto, Rua Minas, 877, CEP 14085-410, Ribeirão Preto, SP/Brasil, Telefone: (0xx) 16-36255046, Fax: (0xx) 16-36357994, e-mail: jaquelineos@ig.com.br ou jqsilva@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz de Taubaté, SP/Brasil

Recebido: 31/03/2008 – Aceito para publicação: 12/06/2008

### RESUMO

Os pombos têm sido considerados reservatórios de agentes infecciosos de importância em saúde pública. A deposição de excretas em áreas públicas pode contaminar o meio ambiente e produtos alimentícios. O objetivo deste estudo foi pesquisar a ocorrência de *Cryptococcus* spp e parasitas em amostras de excretas de pombos. Entre janeiro a setembro de 2006 foram coletadas 68 amostras de “pools” de excretas depositadas em quatro áreas públicas de Ribeirão Preto, SP. Para pesquisa de *Cryptococcus* spp, suspensões de cada amostra em solução salina contendo cloranfenicol foram semeadas em Agar Sabouraud Dextrose (ASD) acrescido de cloranfenicol com posterior incubação a 30°C e observação diária por sete dias. As colônias sugestivas de *Cryptococcus* spp foram repicadas em ASD para identificação fenotípica. Para pesquisa de parasitas, as técnicas de sedimentação espontânea e centrífugo-flutuação em sulfato de zinco e de coccídeos, as técnicas de concentração pelo formol-éter e coloração de Ziehl-Neelsen modificado. Foram encontrados *Cryptococcus* spp em 75% das amostras, parasitas em 32% e a presença concomitante de ambos agentes patogênicos em 25% das amostras. Ressalta-se a necessidade da adoção de medidas efetivas de proteção de áreas públicas, por meio de redução da população de pombos para evitar a contaminação ambiental.

**Palavras-chave.** pombos, *Cryptococcus* spp, parasitas intestinais.

### ABSTRACT

Pigeons have been considered the reservoirs for infectious agents of public health concern. The deposition of their excreta in public areas can cause environmental contamination, including the food products for human consumption. The purpose of the present study was to investigate the occurrence of *Cryptococcus* spp and parasites in pigeon excrements. From January to September 2006, sixty eight pools of excreta samples were collected from four public areas of Ribeirão Preto, SP. For detecting *Cryptococcus* spp, each sample was suspended in saline solution with chloramphenicol, and then cultured on Sabouraud Dextrose Agar plates (SDA) supplemented with chloramphenicol. The cultures were incubated at 30°C and daily observed for seven days. *Cryptococcus* spp-suggestive colonies were streaked on SDA medium for phenotypic identification. For searching the parasites the spontaneous sedimentation and centrifugal-fluctuation in zinc sulfate techniques were carried out. Coccidian oocysts were investigated by formalin-ether concentration and modified Ziehl-Neelsen staining techniques. *Cryptococcus* spp was found in 75%, and parasites in 32% of the samples, and the concomitant presence of both pathogens has occurred in 25% of total samples. It is emphasized the establishment of strategies for preserving the public areas by reducing the pigeons populations, in order to avoid environment contamination.

**Key words.** pigeons, *Cryptococcus* sp, parasites.

## INTRODUÇÃO

As aves domésticas como os pombos urbanos têm sido considerados reservatórios de agentes infecciosos de importância em saúde pública<sup>1,2,3</sup>. Do ponto de vista epidemiológico, os pombos têm um papel importante na contaminação do meio ambiente e na dispersão de patógenos através da deposição de seus excretas. O comportamento de freqüentes e intensas aproximações à população, devido à busca de alimento e abrigo, contribui para a transmissão humana de agentes patogênicos, como fungos e parasitos<sup>1,2,3,4</sup>. Paralelamente, o hábito de pessoas alimentá-las em praças e outros locais públicos, favorece a proliferação desordenada das mesmas, aumentando a chance da contaminação ambiental e da transmissão de doenças. Nas cidades os pombos alimentam-se preferencialmente de restos de alimentos jogados na rua, mas podem também se alimentar de restos de lixo, o que possibilita aos mesmos atuarem como vetores para a transmissão de patógenos<sup>2</sup>. O homem pode se infectar pela via respiratória, aspirando poeira de locais contaminados por fezes secas ou pela ingestão de poeira e/ou alimentos contaminados com os excretas destas aves. Este estudo tem como objetivos pesquisar a ocorrência do *Cryptococcus* spp e de parasitos de interesse em saúde pública, em amostras de excretas de pombos coletados em áreas públicas do município de Ribeirão Preto, SP, enfatizando o risco de infecção humana.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Área geográfica de estudo

Ribeirão Preto situa-se a 313 Km a noroeste da capital estadual. Seu território de 642 km<sup>2</sup> abriga uma população estimada para 2007, segundo o SEADE, de 557 mil habitantes, que faz do município o nono mais populoso do estado. É sede de uma das principais praças financeiras do país e um dos maiores centros comerciais do estado de São Paulo<sup>5</sup>.

### Locais de coleta

Os locais escolhidos para a coleta dos excretas foram áreas públicas com grande presença de pombos e intensa movimentação de pessoas e/ou de comércio de alimentos:

- Praça das Bandeiras, situada na região central do município, onde localiza-se a Catedral Metropolitana. Ao redor da praça existem estabelecimentos comerciais, pontos de ônibus e de táxi. No quarteirão em frente à catedral ocorre todos os finais de semana a Feira de Artes e Artesanato onde são também comercializados alimentos, sendo visível uma grande presença de excretas de pombos sobre a lona que cobre as barracas.

- Praça Coração de Maria, localizada na Vila Tibério, região leste do município. Ao redor da praça há igreja, escola estadual, sorveteria, pontos de ônibus e de táxi e alguns prédios comerciais. Há também a presença de vendedores ambulantes de alimentos. Esta região propicia abrigo e nidificação para estas aves.

- Terminal Rodoviário, situado no centro da cidade com presença de estabelecimentos comerciais, incluindo de alimentos além de pontos de ônibus e de táxi. Em frente e ao redor do terminal existem várias árvores que servem de abrigo para os pombos. O mercado municipal da cidade também é próximo do terminal.

### Período e Coleta das Amostras

Foram coletadas no período de janeiro a setembro de 2006 68 de amostras de "pools" de fezes de pombos, assim distribuídos: 43 na Praça das Bandeiras sendo 34 na Feira de Artes e Artesanato e 9 nas imediações da Catedral Metropolitana, 15 na praça Coração de Maria e 10 no Terminal Rodoviário.

As amostras foram coletadas em potes plásticos esterilizados através da raspagem com espátulas. As fezes estavam depositadas em locais como bancos, grades, telefones públicos, lonas das barracas de alimentos, coberturas de ponto de ônibus, chão de cimento, entre outros.

### Processamento das Amostras

No Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto o material foi processado em Cabine de Segurança Biológica Classe II Tipo A em menos de 24 horas após a coleta. As fezes foram maceradas em graal com pistilo previamente esterilizados até adquirir um aspecto homogêneo, para facilitar a diluição da mesma.

### Pesquisa de *Cryptococcus* spp

Aproximadamente 1 grama do material foi colocado em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 125ml e adicionado de 50 mL de solução fisiológica a 0,9% esterilizada contendo 0,4g/L de cloranfenicol. Após agitação em vortex por três minutos e repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, volumes de 10µL, 100µL, 200µL e 500µL, foram semeados em placas de Agar Sabouraud Dextrose acrescido de 0,05g/L de cloranfenicol. Incubou-se a 30°C por até 7 dias, sendo que as leituras foram realizadas a partir do segundo dia<sup>6</sup>. Colônias de aspecto brilhante, cor branca a bege foram repicadas em Agar Sabouraud Dextrose e incubadas à 30°C por um período de 48 horas. A partir delas, foram realizadas preparações com tinta da China e lactofenol azul de algodão e prova da urease. As leveduras urease positivas foram identificadas por provas de fenoloxidase e auxanograma<sup>7</sup>.

### Pesquisa de Parasitos

Aproximadamente 2 gramas de fezes maceradas foram processadas pelos métodos da sedimentação espontânea e da centrifugo-flutuação em sulfato de zinco a 33% com densidade 1.180. Após sedimentação por 12 horas, parte do sedimento foi colocado em lâmina de vidro, adicionado lugol e examinado em microscopia de luz. O material sobrenadante obtido pela centrifugo-flutuação foi imediatamente examinado entre lâmina e lamínula, adicionando-se uma gota de lugol em microscópio óptico. Para a pesquisa de coccídeos foi utilizada a técnica de concentração pelo formol-éter modificado, seguido de coloração

dos esfregaços pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada<sup>8</sup>. Os esfregaço corados foram observados em microscopia de imersão.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL) em 10 de janeiro de 2006. Projeto CCD/LR n. 27/05

## RESULTADOS

Foram encontrados *Cryptococcus* sp em 75% das amostras (n =51), parasitos em 32% (n =22) e a presença simultânea dos mesmos em 25% (n=17) (Tabela 1). Entre os isolados de *Cryptococcus* foram identificados *C. laurentii* (n=43), *C. unigutulatus* (n=3), *C. laurentii* associado com *C. albidus* (n=4) e *C. unigutulatus* associado com *C. laurentii* (n=1).

Os parasitos encontrados foram: larvas e ovos de ancilostomídeos (n=7), oocistos de coccídios (n=5), cistos de *Entamoeba* spp (n=5), ovos de *Ascaris* spp (n=4), cistos de *Giardia* spp (n=2) e larvas de nematóides (n=3). A ocorrência simultânea de dois parasitos diferentes ocorreu em 3 amostras de “pools”: *Ascaris* spp e coccídeos, ancilostomídeos e coccídeos e *Entamoeba* spp e ancilostomídeos.

A positividade das amostras em relação aos locais de coleta foi de 100% na Catedral Metropolitana, 91% na Feira de Artes e Artesanato, 73% na praça Coração de Maria e 40% no Terminal Rodoviário. Salienta-se que em todas as amostras obtidas das lonas das 4 barracas de alimentos (garapa, coco verde e salgados) da Feira de Artes e Artesanato foram observados *Cryptococcus* spp e/ou parasitos.

## DISCUSSÃO

As fontes ambientais de *C. neoformans* são bastante diversificadas e estão relacionadas a alguns substratos orgânicos, entre eles excretas de aves e vegetais. *Cryptococcus neoformans* tem a capacidade de colonizar a mucosa do papo dos pombos sem causar doença, sendo parasita natural dessas aves. Esta espécie é o principal agente etiológico da criptococose, doença considerada, por alguns autores, como uma infecção fatal que pode ser transmissível ao homem nos locais com elevado número de pombos ou por contato com os respectivos nichos<sup>9</sup> através da inalação de grande quantidade dos propágulos.

Staib<sup>10</sup> demonstrou que a ocorrência de *C. neoformans* e outras espécies do gênero, em excretas de pássaros não é acidental pois, as purinas, especialmente ácido úrico, xantina, guanina (componentes da urina) são em maior ou menor grau assimilados por todas as espécies.

Algumas pesquisas têm sido realizadas no Brasil para estudar o habitat de *C. neoformans*<sup>9,11,12,13</sup>. Segundo Filiú et al.<sup>1</sup>, a busca de novos habitats é um dos caminhos para elucidar o entendimento da ecologia desta levedura na natureza.

Swinne et al.<sup>14</sup> isolaram *C. neoformans* da poeira doméstica das amostras oriundas das residências dos pacientes com criptococose associada a AIDS. Estudos demonstram uma correlação significativa entre a existência de pombos próximos ao ambiente domiciliar e a probabilidade de contaminação dessas residências por *Cryptococcus neoformans*, conseqüentemente, paciente com AIDS apresentavam risco aumentado de adquirir a doença quando residentes em domicílio positivo para o fungo.

**Tabela 1.** Presença simultânea de *Cryptococcus* e parasitos em 68 amostras de “pools” de fezes de pombos de acordo com o local de coleta. Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Local de coleta	<i>Cryptococcus</i> e parasitos	N	%
Feira de Artes e artesanato	<i>C. laurentii</i> + nematóides	03	4,4
	<i>C. laurentii</i> + <i>Ascaris</i> sp	02	2,9
	<i>C. laurentii</i> + ancilostomídeos	02	2,9
	<i>C. laurentii</i> + coccídeos	02	2,9
	<i>C. laurentii</i> + <i>Giardia</i> sp	02	2,9
	<i>C. laurentii</i> + <i>Entamoeba</i> sp	01	1,5
	<i>C. laurentii</i> + <i>C. albidus</i> + <i>Ascaris</i> sp + coccídeos	01	1,5
	<i>C. laurentii</i> + <i>C. uniguttulatus</i> + <i>Entamoeba</i> sp + ancilostomídeos	01	1,5
Catedral	<i>C. laurentii</i> + <i>Entamoeba</i> sp	01	1,5
Praça Coração de Maria	<i>C. laurentii</i> + ancilostomídeos	01	1,5
	<i>C. laurentii</i> + <i>Entamoeba</i> sp	01	1,5
<b>Total</b>		<b>17</b>	<b>25,0</b>

Em nosso trabalho observamos que o isolamento de *Cryptococcus* spp a partir de fezes de aves é extremamente difícil, pois o desenvolvimento das colônias de *Cryptococcus* é mais lento e tardio em relação as leveduras do gênero *Candida* e dos fungos filamentosos, sendo perceptível a partir do segundo dia de incubação.

Embora não tenhamos isolado *Cryptococcus neoformans*, encontramos três espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus* sendo que estas já foram descritas como agentes responsáveis por meningite, afecções pulmonares, abscessos e dermatomicoses<sup>15,16</sup>. De acordo com Khawcharoenporn et al.<sup>17</sup>, *C. albidus* e *C. laurentii* juntos são responsáveis por 80% dos casos de criptococose causada por *Cryptococcus* não-*neoformans* e não - *gattii*.

Estudos demonstram uma variação no isolamento de *C. neoformans* a partir de excretas de pombos de 24,7% a 4,6%<sup>9,11,18,19,20</sup>. Reolon et al.<sup>3</sup> relatou encontrar 100% de *Cryptococcus neoformans* em amostras de fezes de pombos coletadas em Porto Alegre, para a identificação da espécie foi considerado apenas a prova da urease e presença de cápsula (tinta da China). Em nossos estudos utilizamos também, para definição da espécie, provas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio bem como a prova da feniloxidase.

Em nossa região Pedroso<sup>6</sup>, ao analisar 62 amostras de fezes de pombos, isolou *C. neoformans* (21%), *C. albidus* (21%), *C. laurentii* (11,3%) e *C. unigutulatus* (3,2%). Embora a metodologia usada tenha sido semelhante á de Pedroso, em nosso estudo não foram encontrados *C. neoformans*. Talvez o período de coleta das amostras possa ser a explicação para esta diferença. Pedroso<sup>6</sup> coletou as amostras no período de agosto a dezembro e no presente trabalho as amostras foram coletadas de janeiro a setembro sendo a maioria delas colhidas no verão. *Cryptococcus neoformans* não cresce a temperaturas acima de 40°C bem como é sensível á luz solar direta<sup>21</sup>.

No Brasil são escassos os estudos sobre a presença de parasitos em excretas de pombos<sup>2</sup>. Neste estudo encontramos a presença de parasitos em 32% das amostras coletadas. Schüller<sup>2</sup> em estudo realizado em diferentes locais dos municípios de São Paulo, Santo André e Santos, analisou 12 amostras de excretas de fezes de pombos observando uma positividade de 100%. Os parasitos identificados foram: *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Giardia* spp, *Entamoeba histolytica*, *Iodamoeba* spp, *Isospora* spp, *Chilomastix* spp, *Ascaris* spp, *Trichuris* spp, *Hymenolepis* spp, *Strongyloides* spp, *Enterobius* spp e *Ancylostoma* spp, com frequências variáveis de acordo com os locais de coleta.

A identificação dos parasitos encontrados neste estudo foi baseada nas características morfológicas dos mesmos, o que dificulta a diferenciação entre parasitos de animais, de humanos e de vida livre. Para a identificação adequada dos mesmos é necessário o uso de técnicas mais aprimoradas como cultura, microscopia eletrônica, inoculação em animais, biologia molecular, entre outras, as quais são mais demoradas e dispendiosas, tornando inviável a realização das mesmas dentro

da nossa realidade laboratorial. Apesar desta limitação metodológica, encontramos neste estudo vários parasitos que podem ser patogênicos para o homem como *Ascaris* spp, *Entamoeba* spp, ancilostomídeos, *Giardia* spp e coccídeos.

Os ancilostomídeos, parasitos observados com maior frequência (10,3%), foram encontrados na forma de ovos e larvas, estas últimas apenas na Praça das Bandeiras, indicando que neste local houve condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento deste parasito.

Vários fatores podem contribuir com as diferentes positivities de parasitos obtidas nos locais de coleta. As frequências mais elevadas encontradas na Praça das Bandeiras onde localizam-se a Catedral Metropolitana e a Feira de Artes e Artesanato, talvez possam ser explicadas pela existência de uma grande vegetação arbórea neste local em relação à Praça Coração e Maria e o Terminal Rodoviário. As árvores protegem o ambiente contra os raios solares que levam à dessecação dos parasitos e preserva a umidade que favorece o desenvolvimento e a sobrevivência de ovos, larvas e cistos.

Entre os protozoários observados destacam-se *Giardia* spp e os coccídeos como *Cryptosporidium* spp, protozoários do homem e de várias espécies animais domésticas e selvagens. Ambos possuem características que contribuem para dispersão e contaminação ambiental, pois os (oo) cistos dos mesmos são eliminados já infectantes nas fezes do hospedeiro e são altamente resistentes às condições adversas ambientais, podendo sobreviver por semanas a meses no meio externo. Podem ser transmitidos tanto pelo contato direto fecal/oral como pela ingestão de comida e água contaminados e também por inalação. Por possuírem resistência aos processos de cloração da água e baixa dose infectante, emergiram nas últimas décadas como os principais patógenos associados à veiculação hídrica, sendo responsáveis por numerosos surtos epidêmicos em diversos países<sup>22</sup>. Isto acarretou mudanças na legislação sobre a qualidade da água em diversos países, incluindo o Brasil<sup>23</sup>. A taxonomia e o potencial zoonótico deste parasitos foram recentemente melhor esclarecidos através do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular<sup>24</sup>. Embora infecções pelo *Cryptosporidium* tenham sido encontradas em mais de 30 espécies diferentes de aves, há somente três espécies aviárias conhecidas: *C. bailey* e *C. meleagridis* e *C. galli*. Infecções por *C. meleagridis*, já foram registradas tanto em indivíduos imunocomprometidos como em imunocompetentes, sendo a terceira espécie mais comum descrita em humanos<sup>25,26</sup>. Achados de *C. bailey* e outros genótipos não conhecidos em ambientes aquáticos indicam que pássaros e aves silvestres podem contribuir na contaminação da água<sup>27</sup>. Recentemente novos genótipos foram identificados em aves, indicando que este parasito tem capacidade de infectar numerosas espécies de aves. Entretanto ainda são requeridos estudos que possam esclarecer o potencial zoonótico destes novos genótipos e as implicações para a saúde pública<sup>28</sup>.

*Giardia* é um gênero de taxonomia ainda controversa. Atualmente são reconhecidas seis espécies, sendo que o homem

e os mamíferos são os principais hospedeiros da *G. duodenalis* e as aves da *G. psittaci* e *G. ardeae*. Algumas espécies são hospedeiro-específicas enquanto que outras como a *G. duodenalis* possuem grupos genotípicos (“Assemblages”) que infectam tanto o homem como animais domésticos e silvestres. Somente dois destes “Assemblages” (A e B) estão associados à infecção humana, mas pouco se sabe sobre o potencial zoonótico de animais hospedeiros deste genótipos<sup>24</sup>.

## CONCLUSÃO

A elevada positividade das amostras para *Cryptococcus* spp e/ou parasitas em relação aos diferentes locais de coleta e principalmente, nas lonas das barracas de alimentos da Feira de Artes e Artesanato chamam a atenção para o risco da ocorrência da transmissão humana. Esperamos contribuir com estes resultados para que as autoridades competentes adotem medidas para controle efetivo da população de pombos, evitando a contaminação ambiental. Ressalta-se a necessidade de ações educativas e de sensibilização da população em geral, no sentido de não alimentar os pombos, evitando a proliferação dos mesmos em áreas públicas.

## REFERÊNCIAS

1. Filiu WFO, Wanke B, Agüena SM, Vilela VO, Macedo RCL, Lazera MS. Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35(6): 591-5.
2. Schüller M. Pesquisa de protozoários e helmintos de interesse médico presentes nos excretas do pombo doméstico *Columba livia domestica*. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2004.103p.
3. Reolon A, Perez LRR, Mezzari A. Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *J Bras Patol Med Lab*. 2004; 40 (5): 293-8.
4. Littman ML, Borok AC. Relation of the pigeon to cryptococcosis: natural carrier state, heart resistance and survival of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol Mycol Appl*.1968; 35(3): 329-45.
5. Fundação SEADE (Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados). Informações dos municípios paulistas. Disponível em: <<http://www.seade.gov.br>> [Acessado em 25 de março de 2008].
6. Pedrosa RS. *Cryptococcus* spp de fontes ambientais em Ribeirão Preto: ocorrência, fatores de virulência e sensibilidade aos antifúngicos. [Dissertação de Mestrado], Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP; 2004.
7. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8 ed., São Paulo: Sarvier, 1991. 695p.
8. Lenette EH, Ballows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. *Manual of Clinical Microbiology*, 4<sup>th</sup> ed., Washington: American Society for Microbiology, 1985.
9. Lazera MS, Wanke B, Nishikawa MM. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J Méd Vet Mycol*. 1993; 31:449-54.
10. Staib F. Saprophytic life of *Cryptococcus neoformans*. *Ann Soc Bel de Méd Trop* 1964; 44:611-18.
11. Baroni FA, Paula CR, Silva EG, Viani FC, Rivera ING, Oliveira MTB, Gambale W. *Cryptococcus neoformans* strains isolated from church towers in Rio de Janeiro city, RJ, Brazil. *Rev Inst Med Trop. S Paulo* 2006; 48(2): 71-5.
12. Soares MCB, Paula CR, Dias ALT, Caseiro MM, Costa SOP. Environmental strains of *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* in the city of Santos, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop. S Paulo* 2005; 47(1): 31-36.
13. Lazera MS, Cavalcante MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol Oxford*. 2000; 38(5):379-83.
14. Swinne D. *Cryptococcus neoformans* of saprophytic origin. *Sabouraudia Edinburgh* 1975; 13:303-8.
15. Johnson LB, Bradley SF, Kauffman CA. Fungemia due to *Cryptococcus laurentii* and a review of non-*neoformans* cryptococcosis. *Mycoses*. 1998; 41:277-80.
16. McCurdy MD, Morrow JD. Ventriculitis due to *Cryptococcus unigutulatus*. *Southern Medical Journal* 2001; 94:65-66.
17. Khawcharoenporn T, Apisarnthanarak A, Muny LM. Non-*neoformans* cryptococcal infectious: a systematic review. *Infection*. 2007; 35:51-7.
18. Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brasil. *Med Mycol*. 2000; 38:385-90.
19. Ruiz A; Vélez D; Fromthing RA. Innovation of saprophytic *Cryptococcus neoformans* from Puerto Rico: distribution and variety. *Mycopathology (Den Haag)*. 1989; 106: 167-70.
20. Yildiran ST; Saracli MA; Gönlün A; Gün H. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* from pigeon droppings collected throughout Turkey. *Med Mycol*. 1998; 36:391-4.
21. Ishaq CM, Bulmer GS, Felton EG. An evaluation of various environmental factors affecting the propagation of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathology (Den Haag)*.1968; 35:81-90.
22. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health*. 2007;5(1):1-38.
23. Brasil. Portaria nº518 de 2004 do Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção I, n. 59, p. 266-70*.
24. Hunter PR, Thompson RC. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Int J Parasitol*. 2005; 35 (11-12):1181-90.
25. Gatei W, Greensill J, Ashford RW, Cuevas LE, Parry CM, Cunliffe NA et al. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *J Clin Microbiol*.2003; 41(4): 1458-62.
26. Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, et al. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis* 2001; 183 (3): 492-7.
27. Graczyk TK, Majewska AC, Schwab KJ. The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. *Trends Parasitol*. 2008; 24 (2):55-9.
28. Ng J, Pavlasek I, Ryan U. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72(1): 7548-7553.