

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**PRODUCTION OF *Cryptosporidium parvum*  
RECOMBINANT PROTEINS AIMING THE  
DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC METHODS**

**Milena Sato de Souza**  
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP  
2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

**PRODUCTION OF *Cryptosporidium parvum*  
RECOMBINANT PROTEINS AIMING THE  
DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC METHODS**

**Milena Sato de Souza  
Orientador: Prof. Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP  
2017

Catálogo na Publicação(CIP)  
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Souza, Milena Sato de

S729o

Production of Cryptosporidium parvum recombinant proteins aiming the development of diagnostic methods / Milena Sato de Souza.

Araçatuba: [s.n], 2017.

77f. il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2017

Orientador: Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles

1. Criptosporidiose. 2. Saúde pública. 3. Zoonoses. I. T.

CDD 571.961

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Production of *Cryptosporidium parvum* recombinant proteins aiming the development of diagnostic methods

**AUTORA: MILENA SATO DE SOUZA**

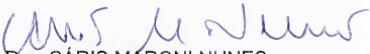
**ORIENTADOR: MARCELO VASCONCELOS MEIRELES**

**COORIENTADOR: ALEX AKIRA NAKAMURA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. MARCELO VASCONCELOS MEIRELES  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

  
Profa. Dra. KATIA DENISE SARAIVA BRÉSCIANI  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

  
Profa. Dra. CÂRIS MARONI NUNES  
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

  
Dra. SILVANA DE CÁSSIA PAULAN  
Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

  
Dr. JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA ZANON  
Doutor em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Araçatuba, 15 de agosto de 2017.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MILENA SATO DE SOUZA** – Santos – SP, 26 de setembro de 1988. Graduada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), em dezembro de 2010. Bolsista de Iniciação Científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) de maio de 2009 a agosto de 2010. Mestrado em Ciência Animal na FMVA/UNESP e bolsista FAPESP de agosto de 2011 a novembro de 2013. Estágio de pesquisa no Laboratório *UK Cryptosporidium Reference Unit, Public Health Wales Microbiology* – Singleton Hospital, na cidade de Swansea, Reino Unido, entre outubro e dezembro de 2012 com bolsa FAPESP. Doutorado em Ciência Animal na FMVA/UNESP e bolsista FAPESP de março de 2014 a agosto de 2017. Estágio de pesquisa no Laboratório *Environmental Microbiology and Food Safety, Agricultural Research Service* – United States Department of Agriculture (USDA), na cidade de Beltsville, Estados Unidos, de janeiro de 2016 a janeiro de 2017 com bolsa FAPESP.

**« No one can make you feel inferior  
without your consent. »**

Eleanor Roosevelt

**« In the end, it's not the years in your life that count,  
it's the life in your years. »**

Abraham Lincoln

*Dedico*

*mais essa conquista à minha querida mãe,  
simplesmente e absolutamente  
por TUDO.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por iluminar meu caminho e me dar muita força sempre, especialmente nos momentos difíceis.

À minha mãe, por sempre me apoiar e incentivar em tudo, minha eterna gratidão.

Ao Professor Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles por me orientar durante todos esses anos, desde o mestrado.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), pela disponibilização dos meios necessários que viabilizaram o desenvolvimento do projeto de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro do projeto de pesquisa (2013/06622-3), bem como pela concessão da bolsa de doutorado (2013/24082-6) e bolsa de estágio de pesquisa no exterior (2015/07147-2), que foram essenciais para a conclusão desse trabalho.

*Ao Animal Parasitic Diseases Laboratory (APDL), Agricultural Research Service (ARS) do United States Department of Agriculture (USDA) localizado no Beltsville Agricultural Research Center (BARC), Maryland, EUA, em especial ao Dr. Mark Jenkins, por aceitar o pedido de estágio em seu laboratório e ser tão paciente e dedicado, mesmo com as dificuldades durante todo o ano. Ao seu team Celia O’Brien e Carolyn Parker, por serem super atenciosas e ajudarem no dia-a-dia do laboratório. À Monica Santin, por auxiliar desde a preparação de documentos para retirada do visto, até indicação de contatos em um país*

desconhecido por mim, além de se preocupar com o desenvolvimento do projeto. *Thank you so much!*

Aos membros da banca do Exame Geral de Qualificação, professoras Katia Denise Saraiva Bresciani e Flavia Lombardi Lopes pelas considerações e sugestões no trabalho.

Aos membros da banca de Defesa da Tese, professoras Katia Denise Saraiva Bresciani e Cárís Maroni Nunes da FMVA e aos colegas ex-pós-graduandos da casa Silvana de Cássia Paulan e José Eduardo de Oliveira Zanon por aceitarem prontamente o convite e ajudarem na etapa final.

Ao Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da FMVA, em especial à Isabel Pereira de Matos pelo apoio com a normalização da tese.

À Seção Técnica de Pós-graduação da FMVA, principalmente aos funcionários Isabella, Daniela e Joelmir por ajudar com todas as informações, normas, formulários, prazos e demais documentos necessários para o desenvolvimento do doutorado.

Aos meus amigos Fernanda, José Eduardo, Camila e Guilherme que, mesmo distantes em alguns momentos, estão sempre presentes em minha vida e tornaram esse período muito mais feliz e, sem dúvida, contribuíram com esse trabalho.

Aos colegas de laboratório Larissa, Gabriela, Kathlenn, Bruna, Elis e Vinicius pela troca de experiência e conversas descontraídas.

À técnica de laboratório Flávia por sua simpatia e disposição em sempre nos ajudar.

Aos meus *best roomies*: Rose, Rodrigo, Thiago, Mauricio, Mariana, Roberto e Ana, pelo adorável e harmonioso convívio durante minha estadia nos Estados Unidos.

A todos os pós-graduandos, estagiários e técnicos dos laboratórios pelo auxílio na pesquisa.

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	15
1 HISTÓRICO .....	16
2 TAXONOMIA .....	17
3 MORFOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO .....	19
4 RELEVÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA .....	21
5 DIAGNÓSTICO .....	27
6 TRATAMENTO .....	30
7 PREVENÇÃO E CONTROLE .....	32
8 PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	33
9 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	36
10 OBJETIVOS .....	37
REFERÊNCIAS.....	38
<b>CAPÍTULO 2 – DETECTION OF <i>Cryptosporidium parvum</i> OOCYSTS BY INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY USING ANTIBODIES PRODUCED AGAINST RECOMBINANT CP41 PROTEIN</b> ..	56
ABSTRACT .....	57
1 INTRODUCTION.....	58
2 MATERIAL AND METHODS.....	59
2.1 Production of recombinant protein .....	59
2.2 Protein purification .....	60
2.3 Immunization of rabbits for production of antisera .....	60
2.4 SDS-PAGE and immunoblotting of rCP41 or <i>C parvum</i> proteins .....	61
2.5 Indirect immunofluorescence staining of parasites .....	62
3 RESULTS AND DISCUSSION .....	62
REFERENCES .....	71

## LISTA DE FIGURAS

Página

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – Ciclo biológico do *Cryptosporidium* spp ..... 21

### CAPÍTULO 2

FIGURE 1 – SDS-PAGE showing expression of rCP41 in *E. coli* BL21(1-8), Rosetta recombinant (10-11) and Rosetta non-recombinant (12-13); M: protein molecular weight markers (kDa) ..... 64

FIGURE 2 – SDS-PAGE of protein purification - rCP41 elutions (1-5); flow throw (6-7); unpurified (8); M: protein molecular weight markers (kDa)..... 65

FIGURE 3 – Immunostaining of SDS-PAGE - rCP41 protein (A) or *C. parvum* total proteins (B) with rabbit antiserum to rCP41 ..... 66

FIGURE 4 – Immunofluorescence staining of Methanol fixed *C. parvum* with rabbit anti-rCP41 sera ..... 67

FIGURE 5 – Immunofluorescence staining of Triton-X fixed *C. parvum* with rabbit anti-rCP41 sera ..... 67

## LISTA DE QUADROS

Página

### CAPÍTULO 1

Quadro 1 – Espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas e seus principais hospedeiros, de acordo com o autor e ano de publicação ..... 18

Quadro 2 – Fatores que afetam a prevalência e a vigilância adequada da criptosporidiose ..... 24

## **PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *Cryptosporidium parvum* VISANDO O DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

**RESUMO** – *Cryptosporidium* spp. são parasitos protozoários que infectam principalmente as células epiteliais do trato digestivo em vários animais, incluindo humanos. Este protozoário causa doença entérica, que se caracteriza como diarreia auto-limitante em indivíduos saudáveis, ou mesmo doença fatal em pacientes imunodeficientes. *Cryptosporidium parvum* é a principal causa de infecção em mamíferos e é o principal responsável pela criptosporidiose zoonótica. Novos métodos de detecção, prevenção, tratamento e estratégias de controle para criptosporidiose em seres humanos são cada vez mais necessários. Anticorpos e proteínas recombinantes têm potencial para o desenvolvimento de medicamentos, vacinas ou podem ser usados para desenvolver técnicas de diagnóstico mais acessíveis com alta sensibilidade e especificidade. Neste estudo, o objetivo principal foi a expressão da proteína recombinante CP41 de *C. parvum* em *Escherichia coli* e produção de um anticorpo específico para CP41 recombinante (rCP41), visando a detecção de oocistos de *Cryptosporidium* por imunofluorescência.

**Palavras-chave:** criptosporidiose, saúde pública, zoonoses

## **PRODUCTION OF *Cryptosporidium parvum* RECOMBINANT PROTEIN AIMING THE DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC METHODS**

**SUMMARY** – *Cryptosporidium* spp. are protozoan parasites that infect mainly the epithelial cells of the digestive tract in several animals including humans. This protozoan causes enteric disease, which may be a self-limiting diarrhea in healthy individuals, or even fatal illness in immunodeficient patients. *Cryptosporidium parvum* is the leading cause of infection in mammals and of zoonotic cryptosporidiosis. The development of new methods for detection, prevention, treatment and control strategies for cryptosporidiosis in humans are increasingly required. Antibodies and recombinant proteins have the potential for the development of drugs, vaccines or could be used to develop more affordable diagnostic techniques with high sensitivity and specificity. In this study, the main goal was the expression of a recombinant CP41 protein from *C. parvum* in *Escherichia coli* and preparation of antiserum specific for recombinant CP41 (rCP41). The research effort is related to detection of *Cryptosporidium* oocysts by immunofluorescence.

**Keywords:** cryptosporidiosis, public health, zoonosis

***CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS***

---

## CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

*Cryptosporidium* spp. são protozoários coccídios que infectam mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes. Diversos animais, domésticos ou selvagens, são susceptíveis à infecção causada por inúmeras espécies e genótipos desse parasito, muitos dos quais também são encontrados em humanos (XIAO; FAYER, 2008).

A criptosporidiose em humanos pode ser assintomática ou causar diarreia, geralmente autolimitante em pessoas saudáveis, mas podendo ser fatal em indivíduos imunologicamente comprometidos, crianças abaixo de cinco anos de idade e idosos (BARALDI et al., 1999; HUNTER; NICHOLS, 2002; SAUDA et al., 1993; TALI et al., 2011). Em crianças, a doença pode levar à má absorção e diminuição do crescimento devido aos episódios de diarreia prolongada (AGNEW et al., 1998).

Em animais, os indivíduos jovens são os mais acometidos, particularmente os ruminantes em que a manifestação clínica mais observada é a diarreia líquida e profusa, odor fétido e coloração amarelada, podendo resultar em desidratação e anorexia. Entretanto, a doença pode se manter em estado subclínico e, em condições de imunossupressão ou estresse, ocorrer a reativação da eliminação de oocistos (FAYER; XIAO, 2008).

Diferentes animais vertebrados são parasitados por espécies zoonóticas de *Cryptosporidium* e, por isso, são considerados reservatórios do protozoário, assim como fontes de contaminação ambiental, representando um risco para a saúde pública em todo o mundo (XIAO et al., 2000).

Existem inúmeros métodos de detecção de *Cryptosporidium*, entretanto, algumas técnicas podem apresentar limitações como custo elevado, duração prolongada, baixa sensibilidade e especificidade (CHECKLEY et al., 2015).

## 1 HISTÓRICO

A primeira descrição de infecção por *Cryptosporidium* ocorreu em 1907, por Ernest Edward Tyzzer, após observar o protozoário nas glândulas gástricas de camundongos de laboratório e a presença de oocistos nas fezes (TYZZER, 1907). A espécie foi denominada como *Cryptosporidium muris* e o ciclo de vida e as formas de desenvolvimento foram detalhados, sugerindo a ocorrência de autoinfecção (TYZZER, 1910). Este mesmo autor também identificou oocistos menores que os de *C. muris* no intestino delgado de camundongos e denominou a nova espécie como *Cryptosporidium parvum* (TYZZER, 1912).

Uma nova espécie de *Cryptosporidium* foi associada à infecção em perus causando diarreia severa e mortalidade entre as aves e nomeada *Cryptosporidium meleagridis* (SLAVIN, 1955). Somente anos mais tarde, quando a criptosporidiose foi associada a bezerros diarreicos, *Cryptosporidium* spp. passou a ter importância na veterinária (PANCIERA et al., 1971). Desde então, vários relatos foram feitos em animais domésticos e silvestres (CASEMORE et al., 1985; CURRENT; GARCIA, 1991; RYAN et al., 2014).

Em humanos, os primeiros casos de criptosporidiose foram descritos em 1976 em uma criança de três anos de idade e em um paciente imunodeprimido, ambos moradores de zona rural e que possuíam contato com o gado (MEISEL et al., 1976; NIME et al., 1976). A criptosporidiose passou a ser pesquisada de maneira mais frequente a partir dos anos 80, quando surgiram relatos de surtos de veiculação hídrica e, também, com a pandemia de AIDS nessa mesma época (SMITH; ROSE, 1998). Devido aos surtos de origem hídrica causados por *Cryptosporidium*, a Agência de Proteção Ambiental Americana incluiu este agente na lista de organismos a seres pesquisados em água potável (SAVIOLI et al., 2006).

Nas últimas décadas, *Cryptosporidium* tem sido considerado um importante agente etiológico causador de doenças intestinais e respiratórias em mamíferos, incluindo humanos, e aves, domésticos e selvagens (ASHBOLT, 2004; RYAN et al., 2014; SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al., 2004).

## 2 TAXONOMIA

O gênero *Cryptosporidium* pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriina e Família Cryptosporidiidae.

Esse gênero é constituído por protozoários coccídios que completam seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário, podendo infectar mamíferos, aves, peixes, répteis e anfíbios (LEVINE, 1984; XIAO; FAYER, 2008).

Já foram descritas mais de 30 espécies de *Cryptosporidium* (Quadro 1) e mais de 60 genótipos têm sido mencionados em diferentes hospedeiros animais. Devido à falta de informações sobre suas características biológicas e por apresentarem diferenças em sua composição genética, alguns desses genótipos ainda não foram classificados como novas espécies, apesar de apresentarem características morfológicas semelhantes às de espécies já descritas (XIAO et al., 2002). Os métodos moleculares auxiliam na identificação das espécies e genótipos, mas a determinação de novas espécies baseada apenas em pequenas alterações genômicas como substituições, inserções ou deleções de alguns poucos nucleotídeos devem ser consideradas com cautela (RYAN et al., 2014).

Quadro 1 – Espécies de *Cryptosporidium* atualmente descritas e seus principais hospedeiros, de acordo com o autor e ano de publicação

<b>Espécie</b>	<b>Principais hospedeiros</b>	<b>Bibliografia</b>
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Bovinos	Lindsay et al. (2000)
<i>Cryptosporidium avium</i>	Aves	Holubová et al. (2016)
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Aves	Current et al. (1986)
<i>Cryptosporidium bovis</i>	Bovinos	Fayer et al. (2005)
<i>Cryptosporidium canis</i>	Caninos	Fayer et al. (2001)
<i>Cryptosporidium cuniculus</i>	Coelhos	Robinson et al. (2010)
<i>Cryptosporidium erinacei</i>	Ouriço	Kváč et al. (2014)
<i>Cryptosporidium fayeri</i>	Cangurus	Ryan et al. (2008)
<i>Cryptosporidium felis</i>	Felinos	Iseki (1979)
<i>Cryptosporidium fragile</i>	Anfíbios	Jirků et al. (2008)
<i>Cryptosporidium galli</i>	Aves	Pavlásek (1999); Ryan et al. (2003)
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Humanos	Morgan-Ryan et al. (2002)
<i>Cryptosporidium huwi</i>	Peixes	Ryan et al. (2015)
<i>Cryptosporidium macropodum</i>	Cangurus	Power e Ryan (2008)
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Aves	Slavin (1955)
<i>Cryptosporidium molnari</i>	Peixes	Alvarez-Pellitero e Sitja-Bobadilla (2002)
<i>Cryptosporidium muris</i>	Roedores	Tyzzer (1910)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Roedores, ruminantes, humanos	Tyzzer (1912)
<i>Cryptosporidium proliferans</i>	Roedores	Kváč et al. (2016)
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	Bovinos	Fayer et al. (2008)
<i>Cryptosporidium rubeyi</i>	Esquilos	Li et al. (2015)
<i>Cryptosporidium saurophilum</i>	Lagartos	Koudela e Modrý (1998)
<i>Cryptosporidium scrofarum</i>	Suínos	Kváč et al. (2013)
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Lagartos, serpentes	Brownstein et al. (1977); Levine (1980)
<i>Cryptosporidium scophthalmi</i>	Peixes	Alvarez-Pellitero et al. (2004)
<i>Cryptosporidium suis</i>	Suínos	Ryan et al. (2004)
<i>Cryptosporidium tyzzeri</i>	Camundongos	Ren et al. (2012)
<i>Cryptosporidium ubiquitum</i>	Ruminantes, humanos	Fayer et al. (2010)
<i>Cryptosporidium varanii</i>	Lagartos	Pavlásek et al. (1995)
<i>Cryptosporidium viatorum</i>	Humanos	Elwin et al. (2012)
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Porquinho-da-índia	Vetterling et al. (1971)
<i>Cryptosporidium xiaoi</i>	Ovinos	Fayer e Santin (2009)

### 3 MORFOLOGIA E CICLO BIOLÓGICO

A maioria dos oocistos de *Cryptosporidium* possuem parede espessa, extremamente resistente, composta por duas camadas e medem de 3,0 a 8,5 µm de diâmetro. Cada oocisto possui quatro esporozoítos (sem esporocistos), são haploides e apresentam um corpo residual. Os oocistos de parede delgada, que representam cerca de 20% do total, permanecem no hospedeiro e são responsáveis pela autoinfecção (XIAO; FAYER, 2008).

O ciclo de vida dos protozoários do gênero *Cryptosporidium* se assemelha ao de outros coccídios da subordem Eimeriorina e possui seis estágios de desenvolvimento, os quais ocorrem em um único hospedeiro. Todas as fases (sexuadas e assexuadas) do ciclo biológico desse protozoário ocorrem no hospedeiro infectado e, por isso, ele é considerado monoxeno, pois não necessita de um hospedeiro intermediário (SMITH; ROSE, 1998; XIAO; CAMA, 2006) (Figura 1).

Os oocistos esporulados eliminados no ambiente pelo hospedeiro infectado, seja nas fezes ou em secreções respiratórias, são os responsáveis pelo início do ciclo. O hospedeiro susceptível se contamina ao ingerir água ou alimentos contendo oocistos ou, menos frequentemente, por meio de inalação. Após a ingestão, ocorre a ruptura da parede do oocisto pela ação das enzimas pancreáticas, pH e temperatura e, conseqüentemente, há a liberação dos esporozoítos, em um processo denominado excitação. Os esporozoítos são envolvidos pelas microvilosidades presentes na superfície das células epiteliais do trato gastrointestinal, invadindo os enterócitos para formar um vacúolo parasitóforo (localização epicelular), onde passam a se designar trofozoíto (DUBEY et al., 1990; SMITH et al., 2007; XIAO; FAYER, 2008).

A diferenciação dos esporozoítos em trofozoítos corresponde ao início da fase de reprodução assexuada denominada merogonia. Os trofozoítos se

diferenciam em merontes tipo I, contendo de seis a oito merozoítos, ou em merontes tipo II, com quatro merozoítos, após múltiplas divisões nucleares. Os merozoítos do tipo I podem repetir a reprodução assexuada, reinfectar outras células e originar novos merontes tipo I, assim como podem também originar merontes do tipo II pela reprodução sexuada. Os merozoítos do tipo II, obrigatoriamente, iniciam o ciclo sexuada (gametogonia) ao infectar novas células e se diferenciam em macrogamontes que originarão os macrogametas (feminino) ou microgamontes que originarão os microgametas (masculino). O zigoto é formado após a fertilização dos macrogametas pelos microgametas e sofre meiose ou esporogonia, na qual origina o oocisto esporulado. Os oocistos formados durante essa fase podem ser de parede espessa ou parede delgada, sendo eliminados no ambiente ou permanecendo no hospedeiro (auto-infecção), respectivamente (XIAO; FAYER, 2008; SMITH et al., 2007) (Figura 1).

Os hospedeiros infectados eliminam os oocistos já esporulados nas fezes o que pode levar à contaminação do ambiente e fontes de água e, assim, atingir um grande número de animais. O potencial de infecção por *Cryptosporidium* está relacionado a diversas características, dentre elas: grande quantidade de oocistos eliminados no ambiente, baixa dose infectante (menos de 10 oocistos), baixa especificidade por hospedeiros, oocistos de tamanho reduzido, parede espessa e resistentes às condições ambientais, baixa velocidade de sedimentação dos oocistos e capacidade alta de flutuação na água (DILLINGHAMA et al., 2002; XIAO et al., 2004).

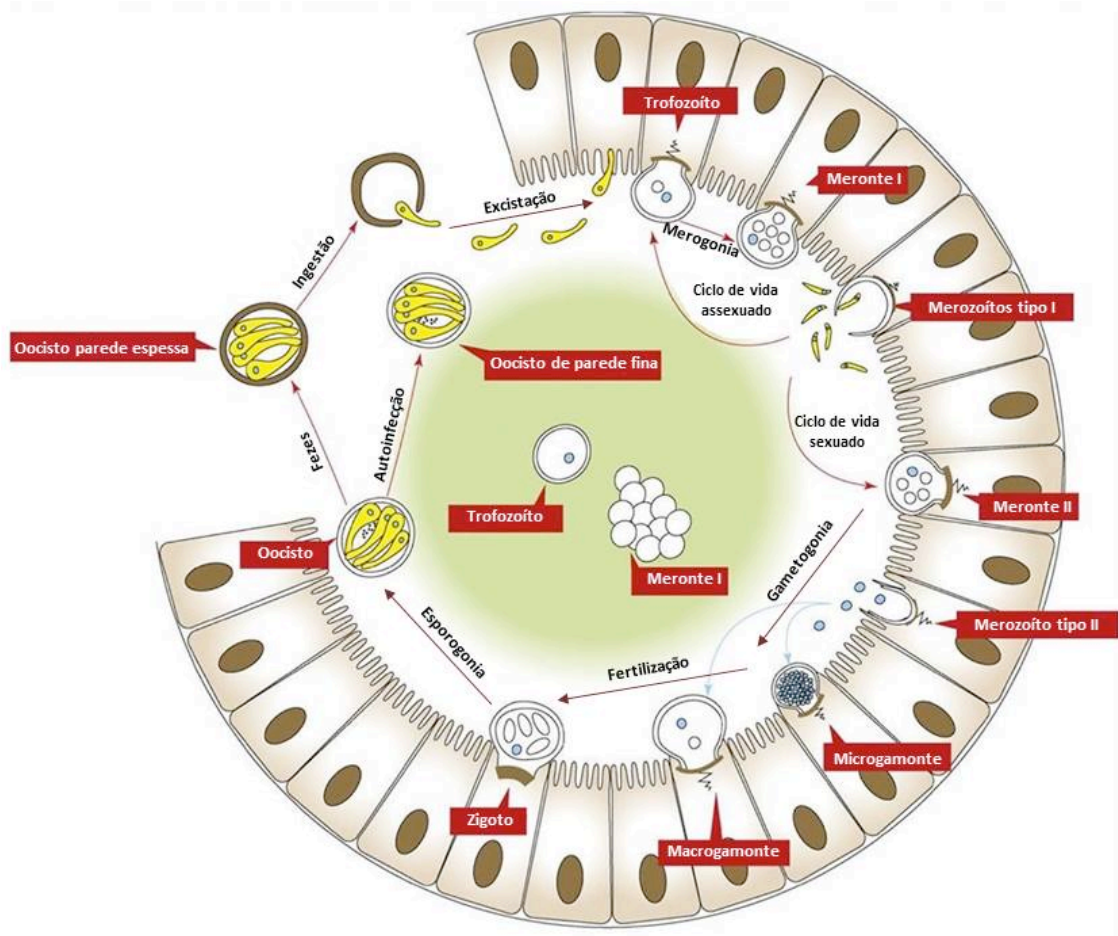


FIGURA 1 – Ciclo biológico do *Cryptosporidium* spp.  
Fonte: adaptado de Barta e Thompson, 2006

#### 4 RELEVÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA

A criptosporidiose já foi descrita em mais de 100 países (XIAO; FAYER, 2008) e possui alta prevalência com mais de 1000 relatos de casos documentados em humanos (RYAN et al., 2014), apesar de a incidência real não ser conhecida (WIDERSTRÖM et al., 2014). Isso se deve a diversos fatores como o fato de a doença não ser de notificação obrigatória, deficiência

da notificação aos órgãos responsáveis quando os casos são confirmados, falta de assistência médica ou mesmo falta de informação dos médicos, ausência de requisição para o diagnóstico laboratorial, técnicas diagnósticas impróprias, infecções assintomáticas, dentre outros, subestimando, assim, o número de casos de pessoas infectadas (DIETZ et al., 2000; WIDERSTRÖM et al., 2014).

A parasitose é considerada emergente devido, principalmente, à sua capacidade de atingir novas áreas geográficas ou outros hospedeiros (CDC, 2017). A grande preocupação com doenças emergentes e reemergentes é devido à facilidade de disseminação, infectando tanto os animais como os humanos e, conseqüentemente, gerando impactos econômicos, sanitários e sociais. Os prejuízos são vistos na saúde humana e animal, considerando perda da produtividade, custos de tratamento e mortalidade (VALLAT, 2017).

Diversas características estão relacionadas com o potencial zoonótico do protozoário e contribuem para a ocorrência de criptosporidiose como o fato de o organismo ser ubíquo, apresentar caráter cosmopolita, possuir grande número de hospedeiros e ser altamente infeccioso, além de os oocistos de *Cryptosporidium* serem muito resistentes e possuírem a capacidade de permanecer no ambiente por longos períodos, contaminando fontes de água e de alimentos (XIAO et al., 2004). Outros fatores como falta de monitoramento nos pontos de captação de água, falta de tratamento e de sistemas ineficazes para o controle e vigilância também contribuem para o surgimento da doença (RAZZOLINI et al., 2010; RYAN et al., 2014). O fato de os oocistos serem eliminados nas fezes por até cinco semanas, mesmo após o término da diarreia, também contribui para disseminação. A ausência de diarreia não significa, necessariamente, ausência ou diminuição da infecção (DIERS; MCCALLISTER, 1989).

Em adição, muitas variáveis estão relacionadas a prevalência da criptosporidiose e estão listadas no quadro 2 (PUTIGMANI; MENICHELLA, 2010).

A maioria dos relatos de surtos de *Cryptosporidium* em humanos está relacionada à ingestão de água contaminada com oocistos (BALDURSSON; KARANIS, 2011), o que contribuiu também para o protozoário ser classificado como o quinto parasito de origem alimentar mais importante pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e pela Organização Mundial da Saúde (RYAN et al., 2014). Além disso, essa mesma instituição incluiu a criptosporidiose na lista das doenças negligenciadas por considerar que o risco à saúde que o patógeno representa é, por muitas vezes, ignorado (SAVIOLI et al., 2006).

A transmissão da criptosporidiose por meio de água inclui contaminação de águas de superfície como bacias hidrográficas, rios e lagos, bem como fontes de tratamento de água e esgoto, além de áreas de recreação como piscinas e parques (PUTIGMANI; MENICHELLA, 2010). Os oocistos presentes em fontes de água também podem contaminar o solo e as plantações. Os alimentos crus como frutas e vegetais são considerados os maiores responsáveis pela transmissão de criptosporidiose, porém o leite e a cidra de maçã não pasteurizados também estão associados à doença (RYAN et al., 2014; WIDERSTRÖM et al., 2014). *Cryptosporidium* já foi relatado em mariscos como os mexilhões o que demonstra que animais aquáticos podem ser fontes de contaminação para outros animais e humanos e podem ser considerados fatores de risco, levando à morbidade e mortalidade em algumas populações. Esses animais também podem ser usados como monitores de qualidade de água (PUTIGMANI; MENICHELLA, 2010).

Quadro 2 – Fatores que afetam a prevalência e a vigilância adequada da criptosporidiose

<p><b>Índices epidemiológicos:</b></p> <p>Idade da população</p> <p>Gênero</p> <p>Estado imunológico individual</p> <p>Distribuição geográfica e grupo étnico</p>
<p><b>Atividades humanas:</b></p> <p>Práticas de higiene e alimentação</p> <p>Ambientes rurais e urbanos</p> <p>Contaminação de resíduos humanos</p> <p>Poluição pecuária</p> <p>Sistemas de tratamento de água; estilos e procedimentos de preparação de alimentos</p> <p>Viagens, imigração</p>
<p><b>Fatores ambientais e sociais:</b></p> <p>Poluição animal</p> <p>Fome, desnutrição, desidratação</p> <p>Geografia, adoções internacionais</p> <p>Calamidades (tufões, guerras locais, inundações, etc.)</p> <p>Variação climática, poluição, desmatamento e chuvas sazonais</p>
<p><b>Fatores subestimados na vigilância:</b></p> <p>Amostragem inadequada de sistemas de água e alimentos contaminados</p> <p>Dificuldade para identificar a provável fonte de infecção</p> <p>Identificação errônea de fontes de surto</p> <p>Coinfecções de protozoários múltiplos</p>
<p><b>Fatores subestimados em clínicas e diagnóstico:</b></p> <p>Apresentações de sintomas pobres ou diversificados e baixa sensibilidade do clínico para considerar protozoários como agentes de infecções gastrointestinais</p> <p>Inclusão limitada de busca de protozoários em fluxos de trabalho de diagnóstico operacional</p> <p>Curso de infecção auto-limitante em adultos e crianças imunocompetentes</p> <p>Baixa inclusão de ferramentas moleculares avançadas para o diagnóstico de rotina</p>

Fonte: adaptado de Putigmani e Menichella, 2010

Outro fator de risco relacionado à doença são as viagens para países tropicais e subtropicais. Há relatos de pessoas que viajaram para esses países e apresentaram sinais de infecções diarreicas após seu retorno, sendo *Cryptosporidium* um dos principais agentes etiológicos. As estações do ano também parecem ter influência no aumento de número de casos, especialmente nos picos de chuvas e verão (PUTIGMANI; MENICHELLA, 2010).

*Cryptosporidium* foi um dos quatro agentes responsáveis por casos de diarreia severa em crianças na África e Ásia e foi considerado a segunda principal causa de diarreia mais grave e morte em crianças, ficando atrás apenas do rotavírus (RYAN et al., 2014). Os países em desenvolvimento e áreas com poucos recursos possuem maior prevalência da doença e estão mais propensos à infecção por *Cryptosporidium* devido, principalmente, às más condições higiênico-sanitárias (BALDURSSON; KARANIS, 2011). Nesses locais, a diarreia aguda e persistente pode resultar em dificuldade de crescimento nas crianças (AGNEW et al., 1998; COLLINET-ADLER; WARD, 2010) e causar até morte (AJJAMPUR et al., 2010; ASHBOLT, 2004; CREEK et al., 2010; KOTLOFF et al., 2013; OSHIRO et al., 2000).

A infecção por esse protozoário em crianças tem sido descrita por diversos autores (MASCARINI; DONALISIO, 2006; OSHIRO et al., 2000). Algumas características contribuem para o aparecimento de doenças como imaturidade do sistema imunológico, fase de exploração, hábitos de higiene ainda em formação e por constantemente entrarem em contato com o solo (FRANCO; CORDEIRO, 1996; OSTERHOLM et al., 1992).

A criptosporidiose em pacientes imunocomprometidos têm sido bastante relatada por diversos autores pelo mundo (PUTIGMANI; MENICHELLA, 2010). A severidade da diarreia causada pela doença está relacionada com a quantidade de células CD4, podendo ser grave e incessante ou recidivante em pacientes com contagem de células CD4  $<100/\text{mm}^3$  e auto-limitante em

indivíduos com quantidades de células CD4  $>200/\text{mm}^3$ . A diarreia crônica pode levar a desidratação, desnutrição, má absorção de nutrientes e, em muitos casos, levar à morte (ROTTERDAM; TSANG, 1994). A infecção, muitas vezes, é resolvida com o aumento na contagem dos linfócitos CD4 e isso se deu com o advento da terapia antirretroviral altamente ativa (FOUDRAINE et al., 1998; MIAO et al., 2000)

Após o primeiro relato de surto de *Cryptosporidium* transmitido por água, em que mais de 2000 pessoas foram descritas com gastroenterite (D'ANTONIO et al., 1985), esse protozoário foi reconhecido como patógeno humano e vem sendo estudado por vários autores em todo o mundo. Diversos casos de surtos têm sido descritos nas últimas décadas e a água aparece como principal veiculador (CHECKLEY et al., 2015; RYAN et al., 2014). Um dos maiores surtos de criptosporidiose ocorreu nos Estados Unidos, em 1993, quando mais de 400 mil pessoas foram infectadas pela água contaminada com esgoto e mais de 100 morreram (MACKENZIE et al., 1994). Posteriormente, a espécie foi identificada como *C. hominis* por meio de técnicas moleculares (ZHOU et al., 2003).

Os surtos representam prejuízos na economia devido aos gastos com médicos, tratamento e diminuição da produtividade. Nos Estados Unidos, os gastos com hospitalizações por casos de criptosporidiose são de um valor estimado de 45,8 milhões de dólares por ano (COLLIER et al., 2012).

A infecção em seres humanos geralmente é causada por *C. hominis* e *C. parvum*. No entanto, há diversos relatos de infecção em humanos por outras espécies como *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. erinacei*, *C. fayeri*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. scrofarum*, *C. suis*, *C. tyzzeri*, *C. ubiquitum* e *C. viatorum*, o que demonstra que animais domésticos e selvagens podem atuar como reservatórios e representar fontes de infecção por meio de contaminação de fontes de água, de alimentos ou por contato direto (FAYER, 2010; RYAN et al., 2014).

Além disso, nos últimos anos houve um aumento no número de casos de criptosporidiose relatado em diversos países como Alemanha, Austrália, Canadá, Estados Unidos, Holanda, Itália e Reino Unido, confirmando que *Cryptosporidium* está cada vez mais reconhecido como protozoário importante em saúde pública (DESAI et al., 2012; CHECKLEY et al., 2015; RYAN et al., 2014).

## 5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da criptosporidiose realizado nos laboratórios na maioria dos países é baseado na detecção microscópica de oocistos após a coloração de esfregaços de fezes. Os métodos de coloração mais utilizados são Ziehl-Neelsen modificado e o Kinyoun (ARROWOOD, 1997; ZAGLOOL et al., 2013). Técnicas de coloração diferencial, como safranina-azul de metileno (BAXBY et al., 1984) e técnicas de coloração negativa com nigrosina (POHJOLA, 1984), verde claro, merbrometo (CHICHINO et al., 1992) e verde malaquita (ELLIOT et al., 1999) também são usadas. O diagnóstico microscópico, apesar de simples e de baixo custo, não discrimina as espécies de *Cryptosporidium*, possui baixa sensibilidade e requer experiência do observador para distinguir entre outros coccídeos, bactérias e fungos, o que pode resultar em diagnóstico falso-positivo (XIAO et al., 2004).

Em cortes histológicos, a detecção de *Cryptosporidium* também pode ser feita pela identificação dos estágios evolutivos dentro de vacúolos parasitóforos medindo de 2 a 7,5 µm na superfície de células epiteliais. A coloração mais utilizada é a hematoxilina-eosina, mas outras técnicas de coloração podem ser utilizadas como Giemsa, ácido periódico de Schiff e métodos a base de prata (CHALMERS; DAVIES, 2010).

Os métodos de concentração de amostras fecais para posterior detecção dos oocistos incluem princípios de centrífugo-flutuação em soluções como sacarose, cloreto de sódio, sulfato de zinco, cloreto de céσιο e centrífugo-sedimentação em água-éter ou formol-éter (BLAGBURN; BUTLER, 2006; FAYER et al., 2000; TULI, et al., 2010).

Para concentrar e recuperar os oocistos presentes em água ou esgoto, empregam-se técnicas de filtração com membranas de tamanho apropriado para reter os oocistos e purificação por separação imunomagnética, de acordo com o método de referência 1623 da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Após essa etapa, a imunofluorescência (direta ou indireta) é realizada para identificação morfológica por microscopia de contraste diferencial de fase e corantes vitais (USEPA, 2005).

Outros testes imunológicos também são usados como a detecção de antígenos por ensaios de imunoabsorção enzimática, aglutinação passiva e imunocromatografia (VOHRA, et al., 2012). Apesar das técnicas imunológicas apresentarem vantagens em relação à microscopia, por serem mais sensíveis, elas também não permitem a identificação das espécies de *Cryptosporidium* envolvidas na infecção (JEX et al., 2008).

Sendo assim, a análise molecular é essencial para a diferenciação entre as espécies de *Cryptosporidium*. As técnicas para caracterização molecular incluem reação em cadeia de polimerase (PCR) e suas variantes *nested* PCR, PCR em tempo real, análise do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de DNA amplificado após digestão com enzimas de restrição (RFLP), seguidas ou não do sequenciamento de ácidos nucleicos. A PCR destaca-se por amplificar uma única molécula de DNA milhares de vezes e, por esta razão, é bastante recomendada quando há baixa quantidade de oocistos nas amostras clínicas e ambientais, além de permitir diferenciar as espécies e genótipos de *Cryptosporidium*, quando seguida de RFLP ou de sequenciamento (CHALMERS; DAVIES, 2010). Por isso, as técnicas moleculares são

caracterizadas por alta sensibilidade e especificidade, apesar de possuírem custo elevado em relação aos outros métodos e, conseqüentemente, não serem empregadas na rotina dos laboratórios (JEX et al., 2008).

O gene de *Cryptosporidium* que codifica a subunidade 18S do RNA ribossômico (18S rRNA ou SSU rRNA) é o *locus* mais comumente utilizado para especiação, pelo fato de possuir baixo polimorfismo (XIAO et al., 2000). Outros genes também são utilizados para detecção do patógeno como os genes que codificam as proteínas actina, proteína do choque térmico resistente ao calor de 70kDa (HSP70), glicoproteína de 60kDa (GP60) e proteína da parede do oocisto (COWP). Esses genes, ao contrário do 18S rRNA, apresentam alto polimorfismo interespecies e são importantes na subtipagem e análise genética de espécies (XIAO et al., 2004).

A PCR em tempo real tem melhorado o fluxo de trabalho nos laboratórios por reduzir o tempo de análise e os riscos de contaminação, além de se mostrar altamente específica. Os ensaios em tempo real se tornaram uma importante ferramenta para os estudos epidemiológicos e para o diagnóstico clínico tanto em humanos (HADFIELD et al., 2011) quanto em animais (DE WAELE et al., 2011). Os métodos de diagnósticos moleculares para identificação simultânea de múltiplos patógenos ao mesmo tempo (PCR multiplex) também são importantes e mostram que as coinfeções são comuns em indivíduos com ou sem diarreia (TANIUCHI et al., 2013).

Entretanto, algumas das técnicas citadas são laboriosas e demoradas, bem como apresentam diferenças nas taxas de sensibilidade e especificidade entre elas (FAYER et al., 2000; GRACZYK et al., 1996; JEX et al., 2008).

O Ministério da Saúde brasileiro estabelece os procedimentos para o controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seus padrões de potabilidade e também prevê a triagem periódica de *Giardia* e *Cryptosporidium* em pontos de captura de água. A detecção de oocistos é realizada por imunofluorescência como controle de qualidade de instalações de

tratamento de água e é precedida por várias técnicas, como a purificação e a concentração de oocistos por separação imunomagnética (BRASIL, 2011; FRANCO et al., 2012). A imunofluorescência utiliza um kit comercial que precisa ser importado e possui um custo elevado. Por isso, a importância do desenvolvimento da tecnologia nacional para produção de anticorpos e utilização em técnicas de diagnóstico da criptosporidiose, o que reduziria os custos.

Embora os estudos de criptosporidiose sejam escassos no Brasil, são necessários novos métodos mais acessíveis economicamente e com altas taxas de especificidade e de sensibilidade para a detecção de *Cryptosporidium*.

## 6 TRATAMENTO

Não existe um fármaco eficaz que remova *Cryptosporidium* do hospedeiro. Por isso, a terapia consiste na administração de fluidos, no suporte nutricional e em medicamentos antidiarreicos, tanto para animais como para humanos (ZINTL et al., 2009).

A criptosporidiose geralmente é autolimitante em pessoas imunocompetentes, entretanto, em casos mais severos de diarreia, é necessário fazer o tratamento sintomático para reposição dos líquidos e eletrólitos. Em indivíduos imunocomprometidos, a prioridade é melhorar a resposta imune celular por meio de administração de drogas antirretrovirais (CABADA; WHITE JUNIOR, 2010).

Muitas drogas têm sido testadas contra os protozoários do gênero *Cryptosporidium* em humanos, em modelos animais e *in vitro* (CHECKLEY et al., 2015). No entanto, atualmente, a nitazoxanida (NTZ, Alinia; Romark Laboratories, Tampa, Florida, EUA) é o único fármaco aprovado para o

tratando da criptosporidiose, mas não possui eficácia se não houver uma resposta imune apropriada, ou seja, é ineficaz contra indivíduos imunocomprometidos (GARGALA, 2008). Em pacientes imunocompetentes, houve melhora do estado geral e dos sintomas como diminuição da diarreia aquosa, vômitos, dores abdominais e diminuição da excreção dos oocistos (ROSSIGNOL, 2006).

O tratamento com drogas antirretrovirais em pacientes com HIV mostrou melhora dos sintomas e redução da excreção dos oocistos (MENGIST et al., 2015). Paramomicina, azitromicina, furazolidona, diclazuril, colostro de bovino hiperimune, entre outros, podem melhorar os sintomas nos doentes imunocomprometidos (TZIPORI; WARD, 2002). A otimização da terapia antirretroviral aliada à terapia sintomática e à inclusão da nitazoxanida ou paramomicina podem ser consideradas no tratamento de pacientes com HIV (CABADA; WHITE JUNIOR, 2010).

Em animais, o uso de agentes antiprotozoários e antimicrobianos têm sido testados no tratamento contra a criptosporidiose. Alguns fármacos, como o decoquinato e a paramomicina, promovem a diminuição da excreção de oocistos e melhoram os sinais clínicos (TZIPORI; WARD, 2002). O lactato de halofuginona, um anticoccídeo utilizado em aves, foi testado em bovinos e demonstrou a mesma eficácia das drogas anteriores: diminuição da excreção dos oocistos e da severidade dos sinais clínicos (MARTINS et al., 2007). Em camundongos, o ácido aurintricarboxílico diminuiu a infecciosidade e viabilidade de *C. parvum* (KLEIN et al., 2008). In vitro, a curcumina também agiu na diminuição da infecciosidade e invasão das células do hospedeiro pelos esporozoítos, inibindo o desenvolvimento de *C. parvum* (SHAHIDUZZAMAN et al., 2009)

## 7 PREVENÇÃO E CONTROLE

A melhor forma de evitar a ocorrência da criptosporidiose é a prevenção. As medidas preventivas contra a criptosporidiose têm a finalidade de reduzir a eliminação, a propagação e a dispersão dos oocistos de *Cryptosporidium* no ambiente, além dos cuidados para não ingeri-los. O objetivo pode ser difícil de ser alcançado, pois o patógeno é ubiqüitário e resistente às condições ambientais (FAYER; XIAO, 2008). Os oocistos permanecem viáveis por longos períodos em temperaturas entre 4°C e 22°C (POKORNY et al., 2002), porém são sensíveis às temperaturas extremas como aquecimento (FUJINO et al., 2002) e congelamento (FAYER; NERAD, 1996).

As medidas de controle e prevenção da doença visam diminuir os riscos de contaminação por meio de programas de educação de higiene pessoal, focando em alguns cuidados básicos como a lavagem cuidadosa das mãos com água e sabão antes do preparo dos alimentos e das refeições, após o uso do banheiro e do contato com animais e fraldas de crianças; filtrar ou ferver a água e usar somente água potável para lavar frutas e verduras, entre outras precauções (CHALMERS; DAVIES, 2010; PAINTER et al., 2015).

A veiculação hídrica é a principal forma de transmissão de *Cryptosporidium* e causa de surtos. Por isso, o risco deve ser minimizado por meio de técnicas adequadas de tratamento de água no abastecimento na rede pública, seja pelo emprego de barreiras que removam o agente ou seja pelo emprego de substâncias que inativem os oocistos (WIDERSTRÖM et al., 2014). Os métodos recomendados no tratamento de água incluem a irradiação com luz ultravioleta e a ozonização que agem no DNA genômico, inativando os oocistos (YODER et al., 2012). O uso de desinfetantes comuns, como o cloro, não possui eficácia no tratamento de água de abastecimento ou de recreio, mesmo em altas concentrações. Já o uso de filtros com poros menores que um

micron podem reduzir a ocorrência de criptosporidiose em 79% (HUNTER; THOMPSON, 2005).

Em caso de ocorrência de surto (dois ou mais casos reportados), as autoridades de vigilância devem ser notificadas. O ideal seria um trabalho conjunto de investigadores, microbiologistas, médicos, agentes de saúde e outros profissionais da área para que se desencadeie uma investigação das vias de transmissão, monitoramento dos casos suspeitos e uso de medidas preventivas (COETZEE et al., 2008).

Outras formas de reduzir os riscos de transmissão da criptosporidiose, levando-se em conta que os bovinos são os principais eliminadores de oocistos no ambiente, incluem diminuir o número de animais no mesmo espaço, isolar os doentes dos sadios, separar os jovens dos adultos, tratar as fezes antes de usá-las como fertilizantes de solo, aliadas às boas práticas higiênico-sanitárias que são essenciais para o controle e prevenção da doença (RAMIREZ et al., 2004).

## **8 PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

A engenharia genética têm avançado muito e a produção de proteínas recombinantes têm se mostrado uma técnica fundamental para estudar processos biológicos na biologia molecular moderna. A tecnologia do DNA recombinante surgiu na década de 70 quando pesquisadores mostraram que era possível a transferência de genes de um organismo para outro, possibilitando a produção de proteínas heterólogas em grande quantidade (BRONDYK, 2009).

As etapas para a produção de uma proteína recombinante compreendem a escolha do gene de interesse, a clonagem em um vetor de

expressão, a transformação em um hospedeiro, a indução e a purificação da proteína. As proteínas podem ser expressas de forma recombinante utilizando como hospedeiros bactérias, leveduras, fungos, algas e células de mamíferos, sendo que a seleção adequada do sistema de expressão depende da proteína a ser produzida, suas características e finalidade. Esses conhecimentos são essenciais para a produção da proteína em grande escala (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

A bactéria *Escherichia coli* é o meio de expressão de proteínas heterólogas mais utilizado por ser um organismo geneticamente bastante conhecido e possuir rápido cultivo, podendo produzir altas quantidade de proteína recombinante a um custo baixo. Entretanto, o sistema *E. coli* é limitado porque carece de modificações pós-traducionais encontradas nos organismos eucariotos (BRONDYK, 2009). Além disso, podem ocorrer formação de corpos de inclusão, onde as proteínas estão biologicamente inativas e na forma insolúvel (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Para cada hospedeiro de expressão, existem diversos vetores de clonagem que podem ser empregados com a capacidade de se auto-replicar e carregar uma sequência de DNA estranha dando origem a um DNA recombinante (MONCLARO, 2012). Os principais vetores de clonagem normalmente utilizados são os plasmídeos de bactérias. Os plasmídeos possuem, entre outras sequências, um promotor forte; um marcador genético; uma origem de replicação que permite a replicação do vetor na célula hospedeira; dois ou mais sítios de restrição (sítio de múltipla clonagem) para que as enzimas específicas possam clivar e incorporar o inserto; um gene que confere resistência a um antibiótico, tais como ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e canamicina, permitindo que as células transformadas com o vetor se multipliquem em meio contendo antibiótico, ao contrário daquelas não transformadas (GILL, et al., 2009).

Alguns dos promotores mais comumente utilizados pelos plasmídeos são Lac, Tac, lambda e T7. Os promotores Lac e Tac utilizam a RNA polimerase bacteriana para transcrever o gene de interesse e são induzidos na presença do indutor (lactose ou IPTG). Nos últimos anos, os sistemas pET de expressão baseados em T7 RNA polimerase têm se tornado popular, pois essa RNA polimerase do fago é 20x mais ativa do que a bacteriana e, com isso, o nível de expressão da proteína é maior. No entanto, essa expressão elevada significa que há grandes quantidades de mRNA que podem causar destruição de ribossomos e morte celular, além de poder causar instabilidade do plasmídeo ou da proteína (STRACHAN; READ, 2013).

A clonagem do gene com a finalidade de produção de proteína é feita geralmente em dois sítios de restrição para que a sequência seja inserida de forma direcionada no vetor. As enzimas de restrição são endonucleases bacterianas que cortam o DNA de dupla-fita em ambas as fitas em sequências específicas de quatro a seis pares de bases. A sequência de interesse é flanqueada pelas enzimas de restrição em seus respectivos sítios. O fragmento obtido e o plasmídeo onde o mesmo será clonado são digeridos com as mesmas enzimas e, em seguida, ambos são ligados pela enzima DNA ligase (STRACHAN; READ, 2013).

A detecção e análise dos clones corretos contendo o gene de interesse é uma etapa muito importante na tecnologia do DNA recombinante. O gene de resistência é um dos sistemas que seleciona apenas aquelas bactérias transformadas pelo vetor e que se tornaram resistentes ao antibiótico. Aliado a isso, o vetor de clonagem pode conter um gene de marcação denominado gene repórter, que confere às colônias de bactérias contendo o vetor ligado ao fragmento de interesse a propriedade de ser identificada visualmente em função de sua coloração. O gene lacZ produz uma enzima, a  $\beta$ -galactosidase, que torna a colônia de bactéria azul na presença do indutor (lactose ou IPTG), pois este induz a produção da  $\beta$ -galactosidase (STRACHAN; READ, 2013).

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os casos de criptosporidioses em humanos são relatados com frequência, mesmo com a melhora nos processos de tratamento de água e os métodos de detecção para identificar o protozoário no ambiente e nas fezes terem se tornado mais sensíveis. Os animais, especialmente os bezerros, se infectam com os oocistos de *C. parvum* presentes no ambiente devido às grandes quantidades eliminadas nas fezes e por permanecerem viáveis por longos períodos, além de não existir desinfetantes, agentes profiláticos ou terapêuticos eficientes para o agente até o momento, como descrito previamente nessa revisão.

Assim, vários estudos têm como objetivo a produção de uma vacina contra *C. parvum* e diversos antígenos têm sido explorados com essa finalidade. Entre os antígenos, as proteínas recombinantes se mostraram candidatas promissoras para o desenvolvimento de vacinas (CHECKLEY et al., 2015).

O maior obstáculo para o desenvolvimento de novos tratamentos e vacinas para a criptosporidiose têm sido a dificuldade na propagação do protozoário *in vitro*. Entretanto, um estudo recente mostrou o desenvolvimento de um novo sistema de cultura celular que permite a propagação, criopreservação e investigação detalhada de *Cryptosporidium* em escala laboratorial. Isso poderá acelerar as pesquisas sobre *Cryptosporidium* e o desenvolvimento de medicamentos e vacinas anti-*Cryptosporidium* (MILLER et al., 2017).

Em um futuro próximo, as proteínas recombinantes terão papel fundamental no controle e prevenção da criptosporidiose por meio de uma combinação de imunoterapia passiva e diagnósticos mais sensíveis.

## 10 OBJETIVOS

Considerando os aspectos mencionados na revisão de literatura, o presente trabalho teve como objetivos:

- Expressar uma proteína recombinante de oocistos de *Cryptosporidium parvum*
- Produzir anticorpos contra essa proteína recombinante em coelhos
- Desenvolver uma reação de imunofluorescência indireta usando os anticorpos produzidos em coelho contra a proteína recombinante

## REFERÊNCIAS

AGNEW, D.G.; LIMA, A.A.M.; NEWMAM, R.D.; WUHIB, T.; MOORE, R.D.; GUERRANT, R.L.; SEARS, C.L. Cryptosporidiosis in northeastern Brazilian children: association with increases diarrhea morbidity. **The Journal of Infectious Diseases**, v.177, p.754-760, 1998.

AJJAMPUR, S.S.; SARKAR, R.; SANKARAN, P.; KANNAN, A.; MENON, V.K.; MULIYIL, J.; WARD, H.; KANG, G. Symptomatic and asymptomatic *Cryptosporidium* infections in children in a semi-urban slum community in southern India. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.83, p.1110-1115, 2010.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; SITJÀ-BOBADILLA, A. *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.1007-1021, 2002.

ALVAREZ-PELLITERO, P.; QUIROGA, M. I.; SITJÀ-BOBADILLA, A.; REDONDO, M. J.; PALENZUELA, O.; PADRÓS, F.; VÁSQUEZ, S.; NIETO, J. M. *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.62, p.133-145, 2004.

ASHBOLT, N.J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. **Toxicology**, v.198, p.229-238, 2004.

ARROWOOD, M.J. Diagnosis. In: FAYER, editor. ***Cryptosporidium and cryptosporidiosis***. New York: CRC Press; 1997, p. 43-64.

- BALDURSSON, S.; KARANIS, P. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks – an update 2004-2010. **Water Research**, v.45, p.6603-6614, 2011.
- BARALDI, S.R.; MARQUES, E.G.L.; DIAS, R.M.D.S. Ocorrência de *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli* na região de Campinas, SP. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.58, p.97-103, 1999.
- BARTA, J. R.; THOMPSON, A.R.C. What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. **Trends in Parasitology**, v.22, p.463-468, 2006.
- BAXBY, D.; BLUNDELL, N.; HART, C.A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocyst in faeces. **The Journal of Hygiene**, v. 93, p.317-323, 1984.
- BLAGBURN, B.L.; BUTLER, J.M. Optimize intestinal parasite detection with centrifugal faecal flotation. **Veterinary Medicine**, v.101, p.455-464, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez 2011. Seção 1.
- BRONDYK, W.H. Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. **Methods in Enzymology**, v.463, p.131-147, 2009.
- BROWNSTEIN, D. G.; STRANDBERG, J.D.; MONTALI, R.J.; BUSH, M.; FORTNER, J. *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. **Veterinary Pathology**, v.14, p.606-617, 1977.
- CABADA, M.M.; WHITE JUNIOR, A.C. Treatment of cryptosporidiosis: do we know what we think we know? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.23, p.494–99, 2010.

CASEMORE, D.P.; SANDS, R.L.; CURRY, A. *Cryptosporidium* species a “new” human pathogen. **Journal of Clinical Pathology**, v.38, p.1321-1336, 1985.

CDC. Journal Background and Goals. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, Estados Unidos, 2017. Disponível em: < [wwwnc.cdc.gov/eid/page/background-goals](http://wwwnc.cdc.gov/eid/page/background-goals) >. Acesso em: 25 jun 2017.

CHALMERS, R.M.; DAVIES, A.P. Minireview: clinical cryptosporidiosis. **Experimental Parasitology**, v.124, p.138-146, 2010.

CHECKLEY, W.; WHITE JUNIOR, A.C.; JAGANATH, D.; ARROWOOD, M.J.; CHALMERS, R.M.; CHEN, X.M.; FAYER, R.; GRIFFITHS, J.K.; GUERRANT, R.L.; HEDSTROM, L.; HUSTON, C.D.; KOTLOFF, K.L.; KANG, G.; MEAD, J.R.; MILLER, M.; PETRI JUNIOR, W.A.; PRIEST, J.W.; ROOS, D.S.; STRIEPEN, B.; THOMPSON, R.C.; WARD, H.D.; VAN VOORHIS, W.A.; XIAO, L.; ZHU, G.; HOUP, E.R. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. **The Lancet Infectious Diseases**, v.5, p.85–94, 2015.

CHICHINO, G.; BRUNO, A.; CEVINI, C.; ATZORI, C.; GATTI, S.; SCAGLIA, M. New rapid staining methods of *Cryptosporidium* oocyst in stools. **The Journal of Protozoology**, v.38, p.212S-214S, 1992.

COETZEE, N.; EDEGHERE, O.; ORENDI, J.; CHALMERS, R.; MORGAN, L. A swimming pool-associated outbreak of cryptosporidiosis in Staffordshire, England, October to December 2007. **Euro surveillance: European Communicable Disease Bulletin**, v. 13, p.1-3, 2008.

COLLIER, S.A.; STOCKMAN, L.J.; HICKS, L.A.; GARRISON, L.E.; ZHOU, F.J.; BEACH, M.J. Direct healthcare costs of selected diseases primarily or partially transmitted by water. **Epidemiology and Infection**, v.11, p.1–11, 2012.

COLLINET-ADLER, S.; WARD, H.D. Cryptosporidiosis: environmental, therapeutic, and preventive challenges. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 29, p. 927-935, 2010.

CREEK, T.L.; KIM, A.; LU, L.; BOWEN, A.; MASUNGE, J.; ARVELO, W.; SMIT, M.; MACH, O.; LEGWAILA, K.; MOTSWERE, C.; ZAKS, L.; FINKBEINER, T.; POVINELLI, L.; MARUPING, M.; NGWARU, G.; TEBELE, G.; BOPP, C.; PUHR, N.; JOHNSTON, S.P.; DASILVA, A.J.; BERN, C.; BEARD, R.S.; DAVIS, M.K. Hospitalization and mortality among primarily nonbreastfed children during a large outbreak of diarrhea and malnutrition in Botswana, 2006. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.53, p.14-19, 2010.

CURRENT, W.L.; GARCIA, L.S. Cryptosporidiosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.4, p.325-358, 1991.

CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; HAYNES, T. B. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. s. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. **Journal of Protozoology**, v.33, p.289-296, 1986.

D'ANTONIO, R.G.; WINN, M.D.; TAYLOR, J.; GUSTAFSON, T.L.; CURRENT, W.L.; RHODES, M.M.; GARY, G.W.; ZAJAC, R.A. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. **Annals of Internal Medicine**, v.103, p.886-888, 1985.

DE WAELE, V.; BERZANO, M.; BERKVEN, D.; SPEYBROECK, N.; LOWERY, C.; MULCAHY, G.M.; MURPHY, T.M. Age-stratified Bayesian analysis to estimate sensitivity and specificity of four diagnostic tests for detection of *Cryptosporidium* oocysts in neonatal calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.76-89, 2011.

DESAI, N.T.; SARKAR, R.; KANG, G. Cryptosporidiosis: an under-recognized public health problem. **Tropical Parasitology**, v.22, p.91-98, 2012.

DIERS, J.; MCCALLISTER, G.L. Occurrence of *Cryptosporidium* in home daycare centers in west-central Colorado. **Journal of Parasitology**, v.75, p.637-638, 1989.

DIETZ, V.; VUGIA, D.; NELSON, R.; WICKLUND, J.; NADLE, J.; MCCOMBS, K.G.; REDDY, S. Active, multisite, laboratory-based surveillance for

*Cryptosporidium parvum*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, p.368-372, 2000.

DILLINGHAMA, R.A.; LIMAB, A.A.; GUERRANT, R.L. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. **Microbes and Infection**, v.4, p.1059-1066, 2002.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

ELLIOT, A.; MORGAN, U.M.; THOMPSON, R.C. Improved staining method for detecting *Cryptosporidium* oocysts in stools using malachite green. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.45, p.139-142, 1999.

ELWIN, K.; HADFIELD, S.J.; ROBINSON, G.; CROUCH, N.D.; CHALMERS, R.M. *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from the Indian subcontinent, 2007–2011. **International Journal for Parasitology**, v.42, p.675-682, 2012.

FAYER, R. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. **Experimental Parasitology**, v.124, p.90-97, 2010.

FAYER, R.; NERAD, T. Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.1431-1433, 1996.

FAYER, R.; SANTIN, M. *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). **Veterinary Parasitology**, v.164, p. 192-200, 2009.

FAYER, R.; XIAO, L. ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis**. 2<sup>nd</sup>. ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. 560p

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1305-1322, 2000.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; MACARISIN, D. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. In animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v.172, p.23-32, 2010.

FAYER, R.; SANTÍN, M.; TROUT, J.M. *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Veterinary Parasitology**, v.156, p.191-198, 2008.

FAYER, R.; SANTIN, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). **Journal of Parasitology**, v.91, p.624-629, 2005.

FAYER, R.; TROUT, J.M.; XIAO, L.; MORGAN, U.M.; LAL, A.A.; DUBEY, J.P. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. **Journal of Parasitology**, v.87, p.1415-1422, 2001.

FOUDRAINE, N.A.; WEVERLING, G.J.; VAN GOOL, T.; ROOS, M.T.; DE WOLF, F.; KOOPMANS, P.P.; VAN DEN BROEK, P.J.; MEENHORST, P.L.; VAN LEEUWEN, R.; LANGE, J.M.; REISS, P. Improvement of chronic diarrhoea in patients with advanced HIV-1 infection during potent antiretroviral therapy. **AIDS**, v. 12, p. 35-41, 1998.

FRANCO, R.M.B.; CORDEIRO, N.S. Giardíase e criptosporidiose em creches no município de Campinas, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.29, p.583-591, 1996.

FRANCO, R.M.B.; BRANCO, N.; LEAL, D.A.G. Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, p.119-135, 2012.

FUJINO, T.; MATSUI, T.; KOBAYASHI, F.; HARUKI, K.; YOSHINO, Y.; KAJIMA, J.; TSUJI, M. The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.64, p.199-200, 2002.

GARGALA G. Drug treatment and novel drug target against *Cryptosporidium*. **Parasite**, v.15, p.275-281, 2008.

GILL, D.R.; PRINGLE, I.A.; HYDE, S.C. Progress and prospects: the design and production of plasmid vectors. **Gene Therapy**, v.16, p.165-171, 2009.

GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; FAYER, R. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.54, p.274–279, 1996.

HADFIELD, S.J.; ROBINSON, G.; ELWIN, K.; CHALMERS, R.M. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. in human clinical samples using real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, p.918-924, 2011.

HOLUBOVÁ, N.; SAK, B.; HORČIČKOVÁ, M.; HLÁSKOVÁ, L.; KVĚTOŇOVÁ, D.; MENCHACA, S.; MCEVOY, J.; KVÁČ, M. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. **Parasitology Research**, v.115, p.2243-2251, 2016.

HUNTER, P.R.; NICHOLS, G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p.145-154, 2002.

HUNTER, P. R.; THOMPSON, R. C. A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **International journal for parasitology**, v. 35, p. 1181-1190, 2005.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp from the domestic cat. **Japanese Journal of Parasitology**, v.28, p.13-35, 1979.

JEX, A.R.; SMITH, H.V.; MONIS, P.T.; CAMPBELL, B.E.; GASSER, R.B. *Cryptosporidium* – biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v.26, p.304-17, 2008.

JIRKŮ, M.; VALIGUROVÁ, A.; KOUDELA, B.; KŘÍŽEK, J.; MODRÝ, D.; ŠLAPETA, J. New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. **Folia Parasitologica**, v.55, p.81-94, 2008.

KLEIN, P.; CIRIONI, O.; GIACOMETTI, A.; SCALISE, G. In vitro and in vivo activity of aurintricarboxylic acid preparations against *Cryptosporidium parvum*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.1101-1104, 2008.

KOTLOFF, K.L.; NATARO, J.P.; BLACKWELDER, W.C.; NASRIN, D.; FARAG, T.H.; PANCHALINGAM, S.; WU, Y.; SOW, S.O.; SUR, D.; BREIMAN, R.F.; FARUQUE, A.S.; ZAIDI, A.K.; SAHA, D.; ALONSO, P.L.; TAMBOURA, B.; SANOGO, D.; ONWUCHEKWA, U.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENG, J.B.; OMORE, R.; OUNDO, J.O.; HOSSAIN, A.; DAS, S.K.; AHMED, S.; QURESHI, S.; QUADRI, F.; ADEGBOLA, R.A.; ANTONIO, M.; HOSSAIN, M.J.; AKINSOLA, A.; MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSA, T.; ACÁCIO, S.; BISWAS, K.; O'REILLY, C.E.; MINTZ, E.D.; BERKELEY, L.Y.; MUHSEN, K.; SOMMERFELT, H.; ROBINS-BROWNE, R.M.; LEVINE, M.M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v.13, p.60844-60842, 2013.

KOUDELA, B.; MODRÝ, D. New species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from lizards. **Folia Parasitologica**, v.45, p.93-100, 1998.

KVÁČ, M.; HOFMANNOVÁ, L.; HLASKOVÁ, L.; KVETONOVÁ, D.; VÍTOVEC, J.; MCEVOY, J.; SAK, B. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. **Veterinary Parasitology**, v.201, p.9-17, 2014.

KVÁČ, M.; KESTŘÁNOVÁ, M.; PINKOVÁ, M.; KVĚTOŇOVÁ, D.; KALINOVÁ, J.; WAGNEROVÁ, P.; KOTKOVÁ, M.; VÍTOVEC, J.; DITRICH, O.; MCEVOY, J.; STENGER, B.; SAK, B. *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa:

Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). **Veterinary Parasitology**, v.191, p.218-227, 2013.

KVÁČ, M.; HAVRDOVÁ, N.; HLÁSKOVÁ, L.; DAŇKOVÁ, T.; KANDĚRA, J.; JEŽKOVÁ, J.; VÍTOVEC, J.; SAK, B.; ORTEGA, Y.; XIAO, L.; MODRÝ, D.; CHELLADURAI, J.R.J.J.; PRANTLOVÁ, V.; McEVOY, J. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. **PLoS One**, v.11, 2016.

LEVINE, N.D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **Journal of Parasitology**, v.66, p.830-834, 1980.

LEVINE, N.D. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). **Journal of Protozoology**, v.31, p.94-98, 1984.

LI, X.; PEREIRA, M.G.C.; LARSEN, R.; XIAO, C.; PHILLIPS, R.; STRIBY, K.; McCOWAN, B.; ATWILL, E.R. *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus* ground squirrel species. **Internacional Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.4, p.343-350, 2015.

LINDSAY, D.S.; UPTON, S.J.; OWENS, D.S.; MORGAN, M.; MEAD, J.R.; BLAGBURN, B.L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Cattle, *Bos Taurus*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, p. 91-95, 2000.

MACKENZIE, W.R.; HOXIE, N.J.; PROCTOR, M.E.; GRADUS, M.S.; BLAIR, K.A.; PETERSON, D.E.; KAZMIERCZAK, J.J.; ADDISS, D.G.; FOX, K.R.; ROSE, J.B.; DAVIS, J.P. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **New England Journal of Medicine**, v.331, p.161-167, 1994.

MARTINS, S.; SOUSA S.; MADEIRA DE CARVALHO, L.M.; BACELAR, J.; CANNAS DA SILVA, J. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in

Northwest Portugal dairy calves and efficacy of Halofuginone Lactate on the prevention of cryptosporidiosis. **Cattle Practice**, v.15, p.152-156, 2007.

MASCARINI, L.M.; DONALÍSIO, M.R. Giardíase e criptosporidiose em crianças institucionalizadas em creches no estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p.577-579, 2006.

MEISEL, J.L.; PERERA, D.R.; MELIGRO, B.S.; RUBIN, C.E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. **Gastroenterology**, v.70, p.1156-1160, 1976.

MENGIST, H.M.; TAYE, B.; TSEGAYE, A. Intestinal parasitosis in relation to CD4 + T cells levels and anemia among HAART initiated and HAART naive pediatric HIV patients in a model ART center in Addis Ababa, Ethiopia. **PLoS One**, v.10, 2015.

MIAO, Y.M.; AWAD-EL-KARIEM, F.M.; FRANZEN, C.; ELLIS, D.S.; MÜLLER, A.; COUNIHAN, H.M.; HAYES, P.J.; GAZZARD, B.G. Eradication of cryptosporidia and microsporidia following successful antiretroviral therapy. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.25, p. 124-129, 2000.

MILLER, C.N.; JOSSÉ, L.; BROWN, I.; BLAKEMAN, B.; POVEY, J.; YIANGOU, L.; PRICE, M.; CINATL, J.J.; XUE, W.F.; MICHAELIS, M.; TSAOUSIS, A.D. A Cell culture platform for *Cryptosporidium* that enables long-term cultivation and new tools for the systematic investigation of its biology. **BioRxiv**, p.134770, 2017. Disponível em: <<http://www.biorxiv.org/content/early/2017/05/04/134270>>. Acesso em: 04 jul. 2017.

MONCLARO, A.V. Expressão de proteínas recombinantes: sistema vetor-hospedeiro. **Materiais e Métodos**, v. 2, p.123, 2012.

MORGAN-RYAN, U. M.; FALL, A.; WARD, L. A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, R. C. A.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L.

*Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.49, p.433-440, 2002.

NIME, F.A.; BUREK, J.D.; PAGE, D.L.; HOLSCHER, M.A.; YARDLEY, J.H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v. 70, p. 592-598, 1976.

OSHIRO, E.T.; DORVAL, M.E.C.; NUNES, V.L.B.; SILVA, M.A.A.; SAID, L.A.M. Prevalência do *Cryptosporidium parvum* em crianças abaixo de 5 anos, residentes na zona urbana de Campo Grande, MS, Brasil, 1996. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, p.277-280, 2000.

OSTERHOLM, M.T.; REVES, R.R.; MURPH, J.R.; PICKERING, L.K. Infectious disease and child day care. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.11, p.32-41, 1992.

PAINTER, J. E.; HLAVSA, M. C.; COLLIER, S. A.; XIAO, L.; YODER, J. S. Cryptosporidiosis Surveillance - United States, 2011–2012. **The Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries**, v. 64, p. 1-14, 2015.

PANCIERA, R.J.; THOMASSEN, R.W.; GARNER, F.M. Cryptosporidial infection in a calf. **Veterinary Pathology**, v.8, p.479-484, 1971.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. **Remedia - Klinicka Mikrobiologie**, v.3, p.290-301, 1999.

PAVLÁSEK, I.; LÁVICKOVÁ, M.; HORÁK, P.; KRÁL, J.; KRÁL, B. *Cryptosporidium varanii* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus* Schlegel, 1893) in captivity in Prague zoo. **Gazella**, v.22, p.99-108, 1995.

POHJOLA, S. Negative staining method with nigrosin for the detection of cryptosporidial oocysts: a comparative study. **Research in Veterinary Science**, v.36, p.217-219, 1984.

POKORNY, N.J.; WEIR, S.C.; CARRENO, R.A.; TREVORS, J.T.; LEE, H. Influence of temperature on *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in river water samples as detected by tissue culture assay. **The Journal of Parasitology**, v.88, p.641-643, 2002.

POWER, M.; RYAN, U. *Cryptosporidium macropodum* n.sp (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern gray kangaroos (*Macropus giganteus*). **Journal of Parasitology**, v.94, p.1114-1171, 2008.

PUTIGNANI, L.; MENICHELLA, D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2010, p.1-39, 2010.

RAMIREZ, N.E.; WARD, L.A.; SREEVATSAN, S. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. **Microbes and Infection**, v.6, p.773-785, 2004.

RASKOVÁ, V.; KVETONOVÁ, D.; SAK, B.; MCEVOY, J.; EDWINSON, A.; STENGER, B.; KVÁC, M. Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, p.360-362, 2013.

RAZZOLINI, M.; DA SILVA SANTOS, T.; BASTOS, V. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* cysts/oocysts in watersheds and drinking water sources in Brazil urban areas. **Journal of Water and Health**, v. 8, p. 399-404, 2010.

ROBINSON, G.; WRIGHT, S.; ELWIN, K.; HADFIELD, S.J.; KATZER, F.; BARTLEY, P.M.; HUNTER, P.R.; NATH, M.; INNES, E.A.; CHALMERS, R.M. Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. **International Journal for Parasitology**, v.40, p.1539-1548, 2010.

ROSANO, G.L.; CECCARELLI, E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v.5, p.172, 2014.

ROSSIGNOL, J.F. Nitazoxanide in the treatment of acquired immune deficiency syndrome-related cryptosporidiosis: results of the United States compassionate use program in 365 patients. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.24, p.887-894, 2006.

ROTTERDAM, H.; TSANG, P. Gastrointestinal disease in the immunocompromised patient. **Human Pathology**, v. 25, p.1123-1140, 1994.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v. 141, n. 13, p. 1667- 1685, 2014.

RYAN, U.M.; POWER, M.; XIAO, L. *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.55, p.22–26, 2008.

RYAN, U.; PAPANINI, A.; TONG, K.; YANG, R.; GIBSON-KUEH, S.; O'HARA, A.; LYMBERG, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). **Experimental Parasitology**, v.150, p.31-35, 2015.

RYAN, U. M.; XIAO, L.; READ, C.; SULAIMAN, M.; MONIS, P.; LAL, A. A.; FAYER, R.; PAVLASEK, I. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. **Journal of Parasitology**, v.89, p.809-813, 2003.

RYAN, U. M.; MONIS, P.; ENEMARK, H. L.; SULAIMAN, I.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDLE, R.; RIBERTSON, I.; ZHOU, L.; THOMPSON, R. C. A.; XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v.4, p.769-773, 2004.

SAUDA, F.C.; ZAMARIOLI, L.A.; EBNER FILHO, W.; MELLO, L.B. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. and *Isospora belli* among AIDS patients attending Santos Reference Center for AIDS, São Paulo, Brazil. **The Journal of Parasitology**, v.79, p.454-456, 1993.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the “neglected diseases initiative”. **Trends in Parasitology**, v.22, p.203-208, 2006.

SHAHIDUZZAMAN, M.; DYACHENKO, V.; KHALAFALLA, R.E.; DESOUKY, A.Y.; DAUGSCHIES, A. Effects of curcumin on *Cryptosporidium parvum* in vitro. **Parasitology Research**, v.105, p.1155-1161, 2009.

SLAVIN, D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). **Journal of Comparative Pathology**, v.65, p.262-266, 1955.

SMITH, H.V.; ROSE, J.B. Waterborne Cryptosporidiosis: current status. **Parasitology Today**, v.14, p.14-22, 1998.

SMITH, H.V.; CACCIÒ, S.M.; COOK, N.; NICHOLS, R.A.; TAIT, A. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.29-40, 2007.

SRÉTER, T.; VARGA, I. Cryptosporidiosis in birds: a review. **Veterinary Parasitology**, v.87, p.261-279, 2000.

STRACHAN, T.; READ, A. P. **Genética molecular humana**. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, 2013, 808p.

TALI, A.; ADDEBBOUS, A.; ASMAMA, S.; CHABAA, L.; ZOUGAGHI, L. Respiratory cryptosporidiosis in two patients with HIV infection in a tertiary care hospital in Morocco. **Annales de Biologie Clinique**, v.69, p.605-608, 2011.

TANIUCHI, M.; SOBUZ, S.U.; BEGUM, S.; PLATTS-MILLS, J.A.; LIU, J.; YANG, Z.; WANG, X.Q.; PETRI JUNIOR, W.A.; HAQUE, R.; HOUP, E.R. Etiology of diarrhea in Bangladeshi infants in the first year of life analyzed using molecular methods. **The Journal of Infectious Diseases**, v.208, p.1794–1802, 2013.

TULI, L.; SINGH, D.K.; GULATI, A.K.; SUNDAR, S.; MOHAPATRA, T.M. A multiattribute utility evaluation of different methods for the detection of enteric

protozoa causing diarrhea in AIDS patients. **BMC Microbiology**, v.10, p.11, 2010.

TYZZER, E. E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.5, p.12-13, 1907.

TYZZER, E.E. An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. **Journal of Medical Research**, v.23, p.487-509, 1910.

TYZZER, E.E. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. **Archives fur Protistenkunde**, v.26, p.394-412, 1912.

TZIPORI, S.; WARD, H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. **Microbes and Infection**, v.4, p.1047-1058, 2002.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in Water by Filtration/IMS/FA**. EPA- 821-R-01-25, Washington, DC: Environmental Protection Agency Publication. U.S. Environmental Protection Agency, 2005.

VALLAT, B. **Emerging and re-emerging zoonoses**. Editorials, 2017. Disponível em: < [www.oie.int/for-the-media/editorials/detail/article/emerging-and-re-emerging-zoonoses](http://www.oie.int/for-the-media/editorials/detail/article/emerging-and-re-emerging-zoonoses) >. Acesso em: 25 jun 2017.

VETTERLING, J.M.; JERVIS, H.R.; MERRILL, T.G.; SPRINZ, H. *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the Guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. **Journal of Protozoology**, v.18, p.243-247, 1971.

VOHRA, P.; SHARMA, M.; CHAUDARY, U. A comprehensive review of diagnostic techniques for detection of *Cryptosporidium parvum* in stool samples. **Journal of Pharmaceutical**, v.2, p. 15-26, 2012.

WIDERSTRÖM, M.; SCHÖNNING, C.; LILJA, M.; LEBBAD, M.; LJUNG, T.; ALLESTAM, G.; FERM, M.; BJÖRKHOLM, B.; HANSEN, A.; HILTULA, J. Large outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. **Emerging infectious diseases**, v. 20, p. 581, 2014.

XIAO, L.; CAMA, V. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. In: ORTEGA, Y. R. **Foodborne Parasites**. New York: Springer Verlag, 2006.

XIAO, L.; FAYER, R. Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. **International Journal for Parasitology**, v.38, p.1239-1255, 2008.

XIAO, L.; ALDERISIO, K.; LIMOR, J.; ROYER, M.; LAL, A.A. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5492-5498, 2000.

XIAO, L.; FAYER, R.; RYAN, U.; UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p.72-97, 2004.

XIAO, L.; SULAIMAN, I.M.; RYAN, U.M.; ZHOU, L.; ATWILL, E.R.; TISCHLER, M.L.; ZHANG, X.; FAYER, R.; LAL, A.A. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.1773-1785, 2002.

YODER, J.S.; WALLACE, R.M.; COLLIER, S.A.; BEACH, M.J.; HLAVSA, M.C. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cryptosporidiosis surveillance – United States, 2009-2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries**, v.61, p.1-12, 2012.

ZAGLOOL, D.A.; MOHAMED, A.; KHODARI, Y.A.; FAROOQ, M.U. *Crypto-Giardia* antigen rapid test versus conventional modified Ziehl-Neelsen acid fast staining method for diagnosis of cryptosporidiosis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.6, p.212-215, 2013.

ZINTL, A.; PROCTOR, A.F.; READ, C.; DEWAAL, T.; SHANAGHY, N.; FANNING S; MULCAHY, G. The prevalence of *Cryptosporidium* species and subtypes in human faecal samples in Ireland. **Epidemiology and Infection**, v.137, p.270- 277, 2009.

ZHOU, L.; SINGH, A.; JIANG, J.; XIAO L. Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.5254-5257, 2003.

***CAPÍTULO 2 - DETECTION OF Cryptosporidium parvum OOCYSTS  
BY INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY USING ANTIBODIES  
PRODUCED AGAINST RECOMBINANT CP41 PROTEIN***

---

## **CAPÍTULO 2 – DETECTION OF *Cryptosporidium parvum* OOCYSTS BY INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY USING ANTIBODIES PRODUCED AGAINST RECOMBINANT CP41 PROTEIN**

Milena Sato de Souza<sup>1</sup>, Mark Jenkins<sup>2</sup>, Marcelo Vasconcelos Meireles<sup>1</sup>

<sup>1</sup> São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine, Araçatuba, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Animal Parasitic Diseases Laboratory, Agricultural Research Service, USDA, Beltsville, MD, USA.

### **HIGHLIGHTS**

- Expression and purification of recombinant CP41 protein
- Immunization of rabbits for production of antiserum against recombinant CP41 protein
- Development of an indirect immunofluorescence assay using antibodies produced against recombinant CP41 protein

## ABSTRACT

*Cryptosporidium parvum* is an intracellular protozoan that infects the epithelial cells of the digestive tract in humans and some mammals and is spread by the fecal-oral route of infection causing cryptosporidiosis. Since there are no effective therapies against cryptosporidiosis, prevention of this zoonotic disease requires sensitive methods to detect *C. parvum* in the environment. In this study, the gene for a recombinant *C. parvum* protein, namely CP41, was expressed in *Escherichia coli* and used to prepare antiserum specific for recombinant CP41 (rCP41). SDS-PAGE/immunoblotting analysis verified that the anti-rCP41 sera recognized native CP41 protein. Moreover, anti-rCP41 sera recognized *C. parvum* oocysts pre-treated with 100% methanol or 0.1% Triton-X by indirect immunofluorescence assay (IFA). Anti-rCP41 sera should provide a useful reagent for detecting *C. parvum* oocysts in environmental samples.

**Keywords:** cryptosporidiosis, public health, zoonosis

## 1 INTRODUCTION

*Cryptosporidium* spp. are intracellular protozoan parasites that infect the epithelial cells of the digestive tract in humans and animals causing enteric disease. Cryptosporidiosis is a cause of life-threatening disease in immunodeficient patients such as those afflicted with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), and it is also a significant risk to children, especially in developing countries (RYAN et al., 2014).

*Cryptosporidium parvum* is the leading cause of infection in mammals, and contact with infected calves is a major cause of cryptosporidiosis outbreaks in humans. Cattle have an important role in the epidemiological chain of cryptosporidiosis and are considered to be a significant source of environmental contamination, due to a large number of oocysts present in stool during the patent period of the disease. This disease impacts in public health and incurs a significant economic loss in the livestock industry (CHALMERS; GILES, 2010; HILL et al., 2011; SANTÍN; TROUT, 2007; SANTÍN, 2013).

Several methods are used to detect *C. parvum* oocysts in environmental and stool samples such as oocyst staining techniques, direct or indirect immunofluorescence assay, enzyme immunoassays, rapid immunochromatographic assays or molecular techniques (FAYER et al., 2000; GRACZYK et al., 1996; JEX et al., 2008).

The Brazilian Ministry of Health establishes the procedures for control and surveillance of water quality for human consumption and its potability standards and also requires for periodic screening of *Giardia* and *Cryptosporidium* in water capture points. Detection of oocysts is accomplished as quality control of water treatment facilities and is preceded by several techniques such as purification and oocyst concentration by immunomagnetic separation (BRASIL, 2011; FRANCO et al., 2012). This procedure to monitor

*Cryptosporidium* in water is based on the method 1623 of the United States Environmental Protection Agency and requires a final step that involves fluorescent monoclonal antibodies capable of detecting a specific antigen on the wall of *C. parvum* oocysts (GRACZYK et al., 1996; USEPA, 2005).

Commercial cryptosporidiosis diagnostic kits are highly expensive, particularly in developing countries, where their importation is required. The high cost of these products makes their use difficult in the laboratory routine. Therefore, we choose an antigen present in *C. parvum* oocyst to develop a similar and cheaper polyclonal antibody to be used instead of the kit. The 41-kDa protein is associated with the oocyst wall and was already successfully cloned and expressed in *E. coli*. The CP41 gene sequence has been identified in the genome of other *Cryptosporidium* species that do not infect humans and calves (*C. baileyi* and *C. wairi*) (JENKINS, et al., 1999).

The present work standardized an indirect immunofluorescence assay using anti-*Cryptosporidium* polyclonal antibodies produced by immunization of rabbits with a 41-kDa recombinant protein from *C. parvum* (CP41).

## **2 MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Production of recombinant protein**

Recombinant plasmid retaining the CP41 sequence in-frame with the pTrcHis plasmid polyHis (Thermo Fisher Scientific, USA) coding region was subjected to PCR amplification using pTrcHis-specific forward and reverse primers, followed by agarose gel electrophoresis, and then the PCR amplification product was purified using Gel Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). DNA sequence was obtained by using a S-dideoxy

Sequencing Kit (Amersham-Pharmacia Biotech, USA) and PCR fluorescence Dye Terminator Kit (Applied Biosystems, USA), and analyzed on an ABI 373 sequencer (Applied Biosystems, USA). After sequence confirmation, recombinant CP41 plasmid was introduced into *E. coli* BL21 or Rosetta (source) for high-level expression (JENKINS et al., 1999).

Cultures of *E. coli* harboring the pTrcHis-CP41 plasmid were evaluated for high-level expression of the recombinant CP41 protein. Parameters that were assessed included incubation time (4hr, 8 hr and overnight) and temperature (30°C and 37°C), and isopropyl- $\beta$ -thiogalactoside (IPTG) concentration (0,2 mM, 0,5 mM and 1mM).

## **2.2 Protein purification**

Recombinant CP41 polyhistidine fusion protein was purified by denaturing Ni-nitrilotriacetic acid (NiNTA) affinity chromatography in accordance with the manufacturer's directions (Invitrogen, USA). Eluates containing peak amounts of purified protein, as indicated by SDS-PAGE, were pooled, quantified using BCA® kit (Sigma, USA), and used to immunize rabbits for the production of polyclonal antibodies against rCP41.

## **2.3 Immunization of rabbits for production of antisera**

Two New Zealand White rabbits (Pacific Immunology, USA) were immunized with NiNTA-purified recombinant protein that had been dialyzed against PBS. The rabbits received a primary immunization of rCP41 in Freund's complete adjuvant, followed by two booster immunizations of rCP41 in incomplete Freund's adjuvant. The rabbits were bled before immunization and two weeks after the last booster immunization by central auricular artery

puncture. The serum was separated from blood clot by centrifugation and used for the accomplishment of Western Blot and indirect immunofluorescence.

#### **2.4 SDS-PAGE and immunoblotting of rCP41 or *C. parvum* proteins**

*C. parvum* (Iowa isolate) oocysts (University of Arizona, USA) were pelleted by centrifugation at 5,000 x g for 5 min, and then suspended in sonication buffer (10 mM Tris, pH 7.3, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) containing phenylmethylsulfonyl fluoride as a protease inhibitor. Total oocyst proteins (equivalent to 10<sup>7</sup> *C. parvum* oocysts) were stored at -70°C until analysis.

*C. parvum* total oocysts proteins or rCP41 were treated with sample buffer containing 2-mercaptoethanol, heated in a boiling-water bath, fractionated by 12.5% SDS-PAGE, and transblotted to an Immobilon membrane (Millipore, USA).

The antigen-impregnated membranes with rCP41 or total oocysts proteins were treated briefly with phosphate-buffered saline (PBS), then immersed in PBS containing 2% nonfat dry milk (NFDM) to block nonspecific-Ab binding in subsequent steps. After blocking, the membranes were incubated with a 1:100 dilution of rabbit antiserum anti-rCP41 in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-Tw20). The membranes were probed with biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) (Sigma Chemical Co., USA) followed by a 1 hr incubation with a 1:1000 dilution of alkaline-phosphatase (Sigma Chemical Co., USA), and then incubation with alkaline phosphatase substrate (NBT-BCIP, Pierce Chemical Co., USA) to visualize Ab binding. The membranes were washed with PBS-Tween 20 three times between each incubation step (JENKINS et al., 1993).

## 2.5 Immunofluorescence staining of parasites

An indirect immunofluorescence assay was employed to determine if anti-CP41 serum was useful for detecting *C. parvum* oocysts. The oocysts (University of Arizona, USA) were first treated in suspension for 5 minutes with 100% methanol or 0.1% Triton-X, washed several times with PBS, and then transferred to individual wells of a multi-well slide at about  $10^4$  *C. parvum* oocysts/well. After air-drying, the oocysts were treated in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) at room temperature to block non-specific binding of antibodies in subsequent steps.

After preincubation in PBS-BSA, oocysts were exposed to a 1:100 dilution of antiserum specific for purified recombinant CP41 protein in PBS-BSA for 1 hr at room temperature followed by a second incubation with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma Chemical Co., USA). The wells were washed three times after each incubation step by gentle immersion of the entire slide in PBS. After the final wash, the slides were examined under a Zeiss Axioscope epifluorescence microscope at 1000x magnification to visualize the antibody binding pattern (JENKINS et al., 1993).

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

This study represents the production of polyclonal antibodies for the detection of *C. parvum* oocysts. Immunofluorescence results show the presence of CP41 antigen on the *C. parvum* oocysts wall that indicates the antibodies to CP41 can be valuable tools for immunodetection of this protozoan in environmental samples.

Recombinant CP41 plasmid DNA was subjected to PCR amplification using pTrcHis-specific forward and reverse primers which confirmed the 740 bp CP41 insert as described by Jenkins et al. (1999) (GenBank accession number AF144621). The CP41 sequence was confirmed by DNA sequencing using pTrcHis-specific forward and reverse primers.

Preliminary studies were conducted to optimize the level of rCP41 expression by comparing two different induction temperatures - 30°C and 37°C, and two different *E. coli* hosts - BL21 and Rosetta. Proteins expression was accomplished during 4 hr using 1mM IPTG when the cultures had reached an O.D.600 = 0.5. Expression of rCP41 was observed at both induction temperatures, but only in *E. coli* Rosetta cells. The results of SDS-PAGE showed that there were two samples with a strong protein band with the expected molecular weight – 41Kda (Figure 1).

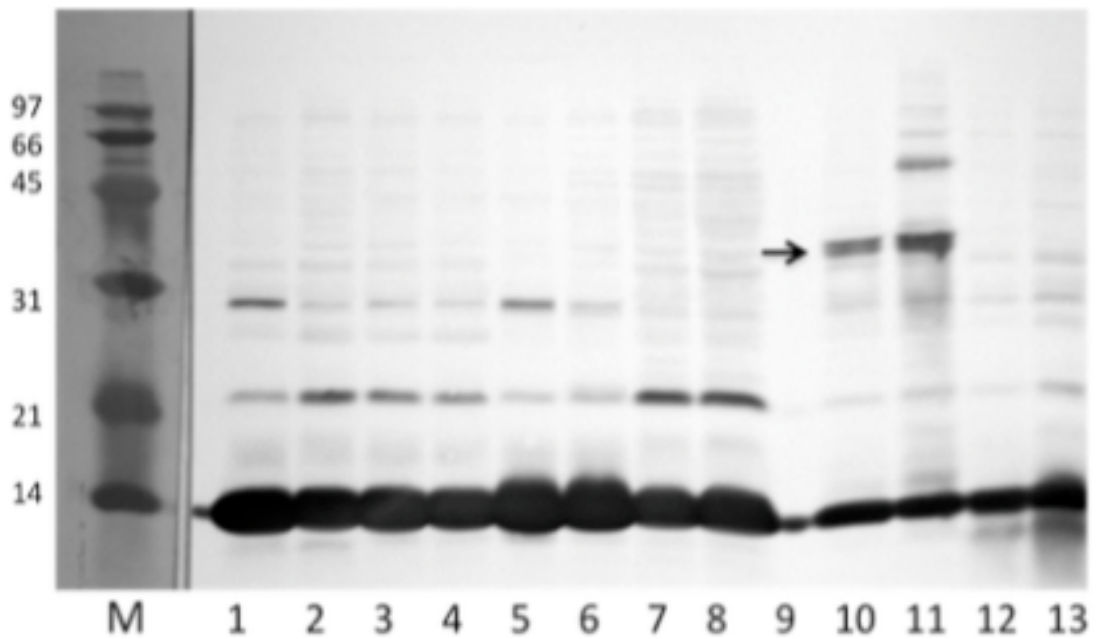


FIGURE 1 – SDS-PAGE showing expression of rCP41 in *E. coli* BL21(1-8), Rosetta recombinant (10-11) and Rosetta non-recombinant (12-13); M: protein molecular weight markers (kDa).

The lysate of induced *E. coli* containing CP41 vector was purified by denaturing Ni-nitrilotriacetic acid (NiNTA) affinity chromatography. The results of SDS-PAGE confirmed a protein band of the expected size (41-kDa) (Figure 2). Eluates containing high levels of rCP41 were pooled after purification, dialyzed against PBS, then used to immunize rabbits.

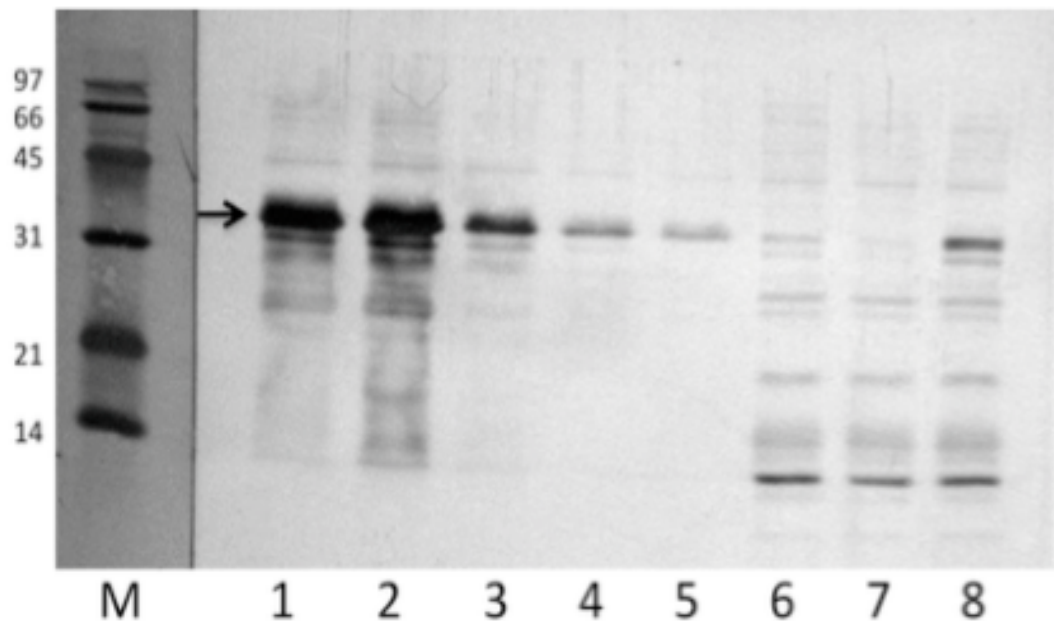


FIGURE 2 – SDS-PAGE of protein purification - rCP41 elutions (1-5); flow through (6-7); unpurified (8); M: protein molecular weight markers (kDa).

Sera from rabbits were tested before immunization and were negative for *Cryptosporidium* by Western blot using rCP41 or *C. parvum* oocysts. Antisera from immunized rabbits reacted with a 41-kDa band in both rCP41 and *C. parvum* oocysts by immunoblotting (Figure 3). The results showed multiple bands mostly from total oocyst proteins, probably because rabbits IgGs recognize a homologous proteins that shares one or more epitopes with rCP41. Furthermore, the antibodies can recognize proteins at lower and higher molecular weights that it could be protein degradation and aggregation, respectively.

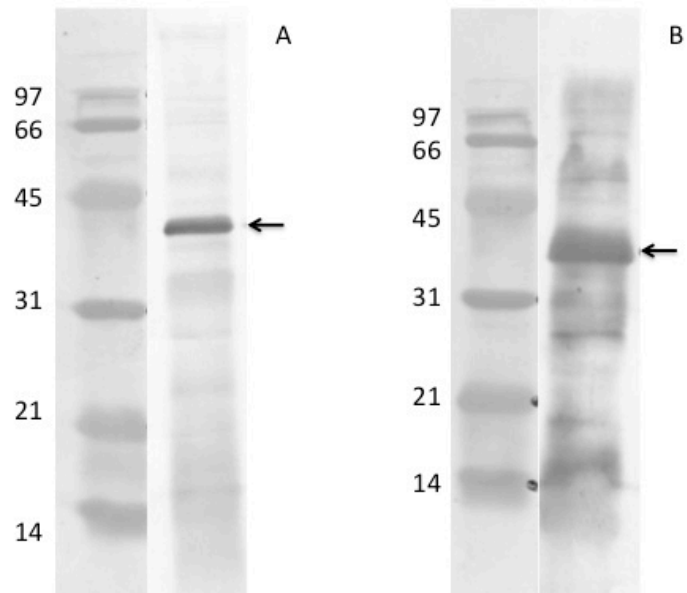


FIGURE 3 – Immunostaining of SDS-PAGE - rCP41 protein (A) or *C. parvum* total proteins (B) with rabbit antiserum to rCP41.

Antisera prepared in rabbits by immunization with purified rCP41 antigen recognized *C. parvum* oocysts treated with methanol (Figure 4) or Triton-x (Figure 5).

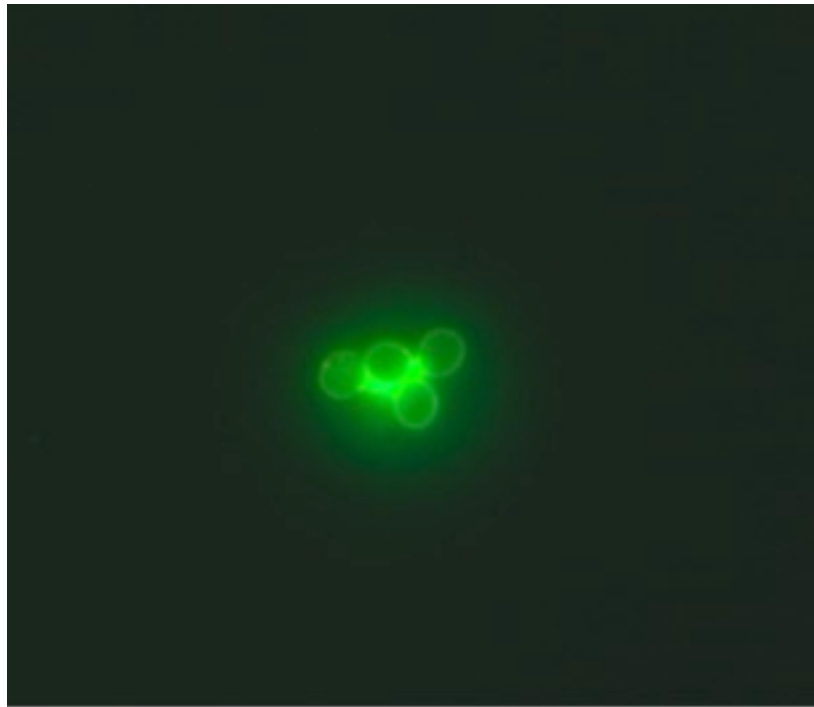


FIGURE 4 – Immunofluorescence staining of Methanol fixed *C. parvum* with rabbit anti-rCP41 sera.

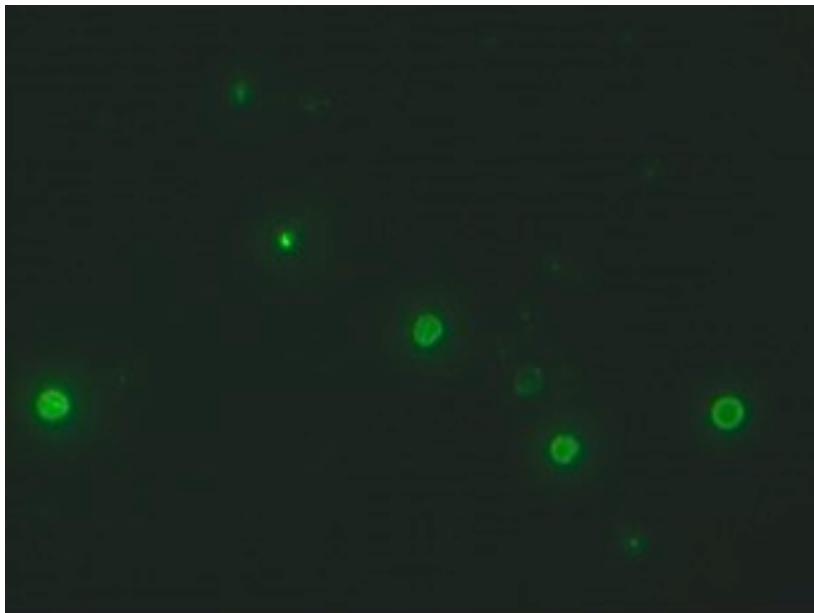


FIGURE 5 – Immunofluorescence staining of Triton-X fixed *C. parvum* with rabbit anti-rCP41 sera.

The choice for polyclonal antibody production in this study was made because the procedures are less laborious and relatively simpler and cheaper than monoclonal antibodies production. In addition, polyclonal antibodies detect a multiplicity of epitopes on the specific antigen. Furthermore, the use of rabbits to produce antibodies allows a recovery of large volumes of serum rich in immunoglobulins, when compared with mice (NELSON et al., 2000).

To the author's knowledge, this is the first study to describe the production of polyclonal antibodies in rabbits against a specific recombinant protein from *C. parvum* oocysts in Brazil. Production of anti-*C. parvum* polyclonal antibodies and development of direct immunofluorescence assay were successfully performed by other authors in Brazil (OSAKI et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2011). However, these studies produced antibodies following rabbit's immunization with total proteins from *C. parvum* oocysts, which means that the antibodies can recognize multiple antigens from *C. parvum*, increasing the chances of cross-reactions, unlike a specific antigen from a single protein.

The indirect immunofluorescence technique was chosen aiming at greater sensitivity than direct immunofluorescence. Direct method uses a single fluorescent-tagged antibody to bind directly to the antigen while indirect immunofluorescence uses two antibodies - the primary is unconjugated and the secondary is fluorophore-conjugated. Therefore, indirect immunofluorescence is more widely used than direct immunofluorescence due to the principle that more than one secondary antibody can bind to one primary antibody, which amplifies the fluorescence signal (COICO; SUNSHINE, 2015).

Unfortunately in our study, it was not possible to test the antiserum for cross-reactivity since oocysts from other species of *Cryptosporidium* and isolates, eggs, cysts or sporocysts from different etiological agents were not available. However, in a previous report, cloning and expression of this DNA sequence encoding a 41-kDa protein from *C. parvum* were conducted to produce a recombinant specific antigen for use in immunodiagnosis (JENKINS

et al., 1999). These authors performed immunofluorescence staining with antiserum against rCP41 and detected it on the surface of *C. parvum* oocysts but not on *C. baileyi* oocysts. Graczyk et al. (1996) evaluated the specificity of the monoclonal antibody used in a commercial assay (Merifluor Cryptosporidium/Giardia kit, Meridian Diagnostics, Cincinnati, USA) and showed there was no cross-reactivity with different species of helminths, *Eimeria* spp, *Candida* spp and *Sarcocystis cruzi*. This study also tested the presence of cross-reactivity with other species of *Cryptosporidium* (*C. serpentis*, *C. meleagridis*, *C. wrairi*, *C. muris* and *C. muris*-like), and observed cross-reactions with all species tested. Other authors have also described the presence of cross-reactivity using monoclonal antibodies (BULL et al., 1998; RODGERS et al., 1995).

Cross-reactivity with other agents demonstrates a lack of specificity. Indeed, the detection of other *Cryptosporidium* species by immunofluorescence does not have an influence on the final result, since the microscopy is a diagnosis of genus level, and species differentiation enable by molecular methods. Although we were not able to test the antiserum for cross-reactivity with different *Cryptosporidium* species in this study, further testing is required before it can be concluded that CP41 is *C. parvum* specific.

Proteins such as low molecular (15-, 17- and 23-kDa) and high molecular weight (44- 94- and 190-kDa) were tested in the past and appear to be useful for immunodiagnosis or protective immunity (ENRIQUEZ; RIGGS, 1998; GOMEZ-MORALES et al., 1995; MOSS et al., 1998; ORTEGA-MORA et al., 1994); PEETERS et al., 1992). In fact, several proteins for *Cryptosporidium* have been identified and used to develop diagnostic methods (LAN et al., 2014; WANG et al., 2009) and protection/prevention against *C. parvum* (ASKARI et al., 2016; BONAFONTE et al., 2000; OMIDIAN, 2014; PERRYMAN et al., 1999). However, some proteins are located in the inner part of the wall of the oocysts and, for this reason, antibodies do not bind to intact oocysts, which make it impossible for their use to detect oocysts in feces or environmental samples

(TEMPLETON et al., 2004). Furthermore, other proteins are present on the surface of sporozoites and merozoites which holds some promise in an ELISA-based assay for the presence of serum antibodies and induction of humoral and cellular immune responses, but these proteins are not useful to detect oocysts in environmental samples. Therefore, CP41 is associated with the oocyst wall, and may be useful to detect oocysts at immunofluorescence assay.

Requirements to develop new detection methods for *Cryptosporidium* and methodologies for future studies, such as prevention and treatment of cryptosporidiosis, are quite important, and recombinant proteins and their antibodies have potential for the development of drugs, vaccines and new diagnostic methods that could be more affordable and with high sensitivity and specificity. The production of polyclonal antibodies against rCP41 for immunodiagnosis of cryptosporidiosis comprises a reliable and cost-effective method.

In conclusion, we successfully expressed the rCP41 protein raising the prospect for a specific antibody production in rabbits. Immunofluorescence using antisera against rCP41 showed staining in *C. parvum* oocysts indicating that the antibody is likely to serve routinely as a useful tool to detect *C. parvum* oocysts.

## REFERENCES

ASKARI, N.; SHAYAN, P.; MOKHBER-DEZFOULI, M.R.; EBRAHIMZADEH, E.; LOTFOLLAHZADEH, S.; ROSTAMI, A.; AMININIA, N.; RAGH, M.J. Evaluation of recombinant P23 protein as a vaccine for passive immunization of newborn calves against *Cryptosporidium parvum*. **Parasite Immunology**, v.38, p.282-9, 2016.

BONAFONTE, M.T.; SMITH, L.M.; MEAD, J.R. A 23-kDa recombinant antigen of *Cryptosporidium parvum* induces a cellular immune response on in vitro stimulated spleen and mesenteric lymph node cells from infected mice. **Experimental Parasitology**, v.96, p.32–41, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez 2011. Seção 1.

BULL, S.; CHALMERS, R.; STURDEE, A.P.; CURRY, A.; KENNAUGH, J. Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p.195-197, 1998.

CHALMERS, R.M.; GILES, M. Zoonotic cryptosporidiosis in the UK – challenges for control. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.487-497, 2010.

COICO, R.; SUNSHINE, G. Antigen-antibody interactions, immune assays, and experimental systems. In: **Immunology: A Short Course**,. 7th ed., 2015.

ENRIQUEZ, F.J.; RIGGS, M.W. Role of immunoglobulin A monoclonal antibodies against P23 in controlling murine *Cryptosporidium parvum* infection. **Infection and Immunity**, v.66, p.4469-4473, 1998.

FAYER, R.; MORGAN, U.M.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1305-1322, 2000.

FRANCO, R.M.B.; BRANCO, N.; LEAL, D.A.G. Parasitologia ambiental: métodos de concentração e detecção de *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. em amostras de água. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, p.119-135, 2012.

GOMEZ-MORALES, M.A.; AUSIELLO, C.M.; URBANI, F. Crude extract and recombinant protein of *Cryptosporidium parvum* oocysts induce proliferation of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. **The Journal of Infectious Diseases**, v.172, p.211-216, 1995.

GRACZYK, T.K.; CRANFIELD, M.R.; FAYER, R. Evaluation of commercial enzyme immunoassay (EIA) and immunofluorescent antibody (FA) test kits for detection of *Cryptosporidium* oocysts of species other than *Cryptosporidium parvum*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.54, p.274–279, 1996.

HILL, A.; NALLY, P.; CHALMERS, R.M.; PRITCHARD, G.C.; GILES, M. Quantitative risk assessment for zoonotic transmission of *Cryptosporidium parvum* infection attributable to recreational use on farmland. **Zoonose Public Health**, v.58, p.323-333, 2011.

JENKINS, M.C.; FAYER, R.; TILLEY M.; UPTON, S.J. Cloning and expression of cDNA encoding epitopes shared by 15- and 60-kilodalton proteins of *Cryptosporidium parvum* sporozoites. **Infection and Immunity**, v.61, p.2377–2382, 1993.

JENKINS, M.C.; TROUT, J.; MURPHY, C.; HARP, J.A.; HIGGINS, J.; WERGIN, W.; FAYER, R. Cloning and expression of a DNA sequence encoding a 41-Kilodalton *Cryptosporidium parvum* oocyst wall protein. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, p.912-20, 1999.

JEX, A.R.; SMITH, H.V.; MONIS, P.T.; CAMPBELL, B.E.; GASSER, R.B. *Cryptosporidium* — biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. **Biotechnology Advances**, v.26, p.304-317, 2008.

LAN, D.T.B.; LAN, T.T.; VIET, L.Q.; QUYET, P.V.; QUANG, H.T.; LOC, N.H.; LONG, P.T., 2014. Cloning and expression of gene encoding P23 protein from *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Bioscience and Biotechnology**, v.3, p.189-193, 2014.

MOSS, D.M.; CHAPPELL, C.L.; OKHUYSEN, P.C.; DUPONT, H.L.; ARROWOOD, M.J.; HIGHTOWER, A.W.; LAMMIE, P.J. The antibody response to 27-, 17-, and 15-kDa *Cryptosporidium* antigens following experimental infections in humans. **The Journal of Infectious Diseases**, v.178, p.827-833, 1998.

NELSON, P.N.; REYNOLDS, G.M.; WALDRON, E.E.; WARD, E.; GIANNOPOULOS, K.; MURRAY, P.G. Monoclonal antibodies. **Journal Clinical of Pathology**, v.53, p.111-117, 2000.

OMIDIAN, Z.; EBRAHIMZADEH, E.; SHAHBAZI, P.; ASGHARI, Z.; SHAYAN, P. Application of recombinant *Cryptosporidium parvum* P23 for isolation and prevention. **Parasitology Research**, v.113, p.229-37, 2014.

ORTEGA-MORA, L.M.; TRONCOSO, J.M.; ROJO-VAZQUEZ, F.A.; GOMEZ-BAUTISTA M. Identification of *Cryptosporidium parvum* oocyst/sporozoite antigens recognized by infected and hyperimmune lambs. **Veterinary Parasitology**, v.53, p.159-166, 1994.

OSAKI, S.C.; COSTA, A.O.; TROIANO, L.D.C.; KRUGER, E.R.; PEREIRA, J.T.; FERNANDES, N.L.M.; SILVA, M.B.O.; SOCCOL, V.T. Production of anti-*Cryptosporidium* polyclonal antibodies and standardization of direct immunofluorescence for detecting oocysts in water. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p.587-590, 2011.

PEETERS, J.E.; VILLACORTA, I.; VANOPDENBOSCH, E.; VANDERGHEYNST, D.; NACIRI, M.; ARES-MAZA'S, E.; YVOR'E, P. *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin A [IgA], IgG, and IgM) after natural and experimental infections. **Infection and Immunity**, v. 60, p.2309-2316, 1992.

PERRYMAN, L.E.; KAPIL, S.J.; JONES, M.L.; HUNT, E.L. Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrums induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. **Vaccine**, v.17, p.2142-2149, 1999.

RODGERS, M.R.; FLANIGAN, D.J.; JAKUBOWSKI, W. Identification of algae which interfere with the detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts and a method for alleviating this interference. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, p.3759-3763, 1995.

RYAN, U.; FAYER, R.; XIAO, L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. **Parasitology**, v.141, p.1667- 1685, 2014.

SANTÍN, M. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. **The New Zealand Veterinary Journal**, v.61, p.1-10, 2013.

SANTÍN, M.; TROUT, J.M. Livestock. In: Fayer, R. and Xiao, L. ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis**. CRC Press., Florida, 2007, p.451-484.

TEIXEIRA, W.F.P.; COELHO, W.M.D.; NUNES, C.M.; MEIRELES, M.V. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in calf fecal samples by direct immunofluorescence assay. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, p. 269-273, 2011.

TEMPLETON, T.J.; LANCTO, C.A.; VIGDOROVICH, V.; LIU, C.; LONDON, N.R.; HADSALL, K.Z.; ABRAHAMSEN, M.S. The *Cryptosporidium* oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*. **Infection and Immunity**, v.72, p.980-987,2004.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 1623:** *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA. EPA- 821-R-01-25, Washington, DC: Environmental Protection Agency Publication. U.S. Environmental Protection Agency, 2005.

WANG, C.; HE, H.; DUAN, M. Development and evaluation of a recombinant CP23 antigen-based ELISA for serodiagnosis of *Cryptosporidium parvum*. **Experimental Parasitology**, v.121, p.157-162, 2009.