

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE
IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA DETECÇÃO DE
OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* EM AMOSTRAS
FECALIS DE BEZERROS

Weslen Fabricio Pires Teixeira
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE
IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA DETECÇÃO DE
OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* EM AMOSTRAS
FECAIS DE BEZERROS**

Weslen Fabricio Pires Teixeira

Orientador: Prof. Adj. Marcelo Vasconcelos Meireles

Co-orientadora: Prof^a Adj. Cárís Maroni Nunes

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – UNESP, Curso de Medicina Veterinária, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2011

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

WESLEN FABRICIO PIRES TEIXEIRA - Dourados – MS, 12 de Abril de 1983. Graduação em Medicina Veterinária, 2008, Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina, Fundação Educacional de Andradina FEA, Andradina, SP. Aluno do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal – Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA – Curso de Medicina Veterinária – Campus de Araçatuba, São Paulo.

EPÍGRAFE

**“Saber cada dia um pouco mais e usá-lo todos
os dias para o bem”**

(Jigoro Kano)

DEDICATÓRIA

À Deus por ter me dado força, sabedoria e saúde para conclusão desta dissertação de mestrado. Aos meus pais que sempre com muito amor e dedicação, nunca medirão esforços para que eu realizasse este sonho. À minha irmã Jaqueline por todas as noites de conversa, desabafos e consolos. Aos meus amigos Willian e Fernando por todo apoio e amizade desde a faculdade. Aos professores Marcelo Vasconcelos Meireles e Cárís Maroni Nunes, por todo apoio e conhecimentos cedidos a mim durante o curso.

AGRADECIMENTOS

À meus Pais Sebastião da Silva Teixeira e Vera Lucia Pires Teixeira, pessoas maravilhosas das quais me orgulho muito, e que com extrema dedicação nunca mediram esforços para que eu alcançasse este objetivo. Amo vocês.

À minha irmã, Jaqueline Pires Teixeira, pessoa a quem admiro muito pelo seu caráter e honestidade. Te amo muito!

À minha avó, Clotilde Martinho Pires, e minha tia Sirlei Regina Pires, pelos conselhos e carinhos cedidos durante toda minha vida.

À minha namorada Mariana, ao seu lado me sinto forte!

Aos meus amigos Willian Marinho e Fernando Paes, amigos desde a faculdade, que sempre não mediram esforços para me ajudar nas difíceis etapas que percorri, tanto na vida profissional quanto na vida pessoal.

Ao amigo Ricardo Velludo Gomes de Soutello, pela ajuda, conselhos e orientações a mim oferecidos.

À minha co-orientadora Cárís Maroni Nunes, pessoa responsável por grande parte do desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Marcelo Vasconcelos Meireles por todo apoio, paciência e conhecimento a mim cedido durante todo o desenvolvimento desta dissertação.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho, minha sincera e gratidão.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	12
1.1 O gênero <i>Cryptosporidium</i>	12
1.2 Ciclo de vida e características biológicas e físicas do parasito.....	12
1.3 Importância em saúde pública.....	14
1.4 Infecção em bovinos.....	16
1.5 Emprego da microscopia e de métodos imunológicos no diagnóstico de criptosporidiose.....	17
1.6 Objetivos.....	18
Referências.....	19
 CAPÍTULO 2 - PRODUÇÃO DE CONJUGADO ANTI-CRYPTOSPORIDIUM PARVUM PARA DETECÇÃO DE OOCISTOS EM AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA.....	 30
Resumo.....	30
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Material e Métodos.....	32
Resultados	35
Discussão.....	38
Conclusões.....	40
Referências.....	40
 CAPÍTULO 3 - DIAGNÓSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSE EM AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA E MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE.....	 44
Resumo.....	44
Abstract.....	44
Introdução.....	45
Material e Métodos.....	46
Resultados e Discussão.....	48

Conclusões.....	51
Referências.....	52

LISTA DE TABELAS

	Página
Espécies de <i>Cryptosporidium</i> consideradas válidas.....	13
Volume e concentração protéica de gamaglobulinas e de imunoglobulinas G (IgG) do soro dos coelhos inoculados com oocistos de <i>C. parvum</i>	35
Resultados da reação imunoenzimática (ELISA) realizada nas amostras de soros dos coelhos, antes e após a inoculação de oocistos de <i>C. parvum</i> , e nas frações de imunoglobulinas G (IgG) obtidas dos dois coelhos.....	36
Porcentagem de positividade e média e total de oocistos observados e intervalo de confiança calculado para as cinco repetições de cada alíquota de amostras fecais adicionadas de oocistos, em lâminas examinadas por imunofluorescência direta (IFD) e microscopia em contraste de fase (MCF).....	49
Pesquisa de <i>Cryptosporidium</i> sp. em amostras de fezes de bezerros naturalmente infectados utilizando as técnicas de Imunofluorescência direta (IFD) e microscopia em contraste de fase (MCF).....	50
Análise semi-quantitativa* de oocistos de <i>C. parvum</i> presentes nas 35 amostras simultaneamente positivas pela microscopia com contraste de fase em solução de Sheather (MCF) e imunofluorescência direta (IFD).....	50
Análise semi-quantitativa* de oocistos de <i>C. parvum</i> e <i>C. andersoni</i> presentes nas 24 amostras positivas somente pela imunofluorescência direta (IFD).....	51

PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA DETECÇÃO DE OOCISTOS DE *Cryptosporidium parvum* EM AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS

RESUMO - O objetivo deste estudo foi padronizar a reação de Imunofluorescência direta (IFD) para detecção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em amostras fecais de bezerros. Os anticorpos policlonais anti-*C. parvum* foram produzidos em dois coelhos adultos da raça Nova Zelândia, e titulados por meio do ensaio imuno-enzimático indireto (ELISA). A fração de imunoglobulina G (IgG) foi purificada a partir do soro do coelho imunizado, utilizando-se diálise em sulfato de amônio seguida de cromatografia em coluna de DEAE celulose e conjugação com isotiocianato de fluoresceína. Por meio da IFD padronizada, foi testada a reatividade cruzada do conjugado produzido contra outras espécies de *Cryptosporidium* (*C. andersoni* e *C. serpentis*) e com outros agentes etiológicos presentes em fezes de bovinos (*Escherichia coli*, *Eimeria* sp. e *Candida* sp.). A IFD foi comparada à microscopia com contraste de fase em solução de Sheather (MCF), avaliando a capacidade de detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em alíquotas de fezes de bezerro inoculadas com oocistos de *C. parvum*, e em amostras fecais de bezerros naturalmente infectados provenientes de 37 propriedades leiteiras da região de Araçatuba, SP. Nas amostras comprovadas como positivas, foi ainda feita uma análise semi-quantitativa de oocistos de *Cryptosporidium* sp., visualizados por campo de microscopia em ambas as técnicas. O conjugado anti-*C. parvum* apresentou reatividade com *C. andersoni* e *C. serpentis*. A IFD foi utilizada com sucesso para detecção de oocistos de *C. parvum* em fezes de bezerros, apresentando sensibilidade para detecção de até 10^4 oocistos em 3 g de fezes. Entre as 300 amostras fecais de bezerros naturalmente infectados, 19,67% (59/300) foram positivas para a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp. pela IFD, apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação às amostras positivas pela MCF.

Palavras chave: anticorpos policlonais, bovinos, criptosporidiose, diagnóstico, ELISA, zoonose.

STANDARDIZATION OF DIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY FOR DETECTION OF *Cryptosporidium parvum* OOCYSTS IN FECAL SAMPLES OF CALVES

SUMMARY - The objective of this experiment was to standardize the direct immunofluorescence assay (DIF) for detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in fecal samples of calves. The anti-*C. parvum* polyclonal antibodies were produced in two adult rabbits of New Zealand breed, and titrated by an indirect enzyme-linked immunosorbent (ELISA). The immunoglobulin G (IgG) was purified from the serum of immunized rabbits by dialysis in ammonium sulfate followed by column chromatography on DEAE cellulose, and conjugated with fluorescein isothiocyanate. Using DIF the anti-*C. parvum* conjugate was tested for the presence of cross-reactivity against other species of *Cryptosporidium* (*C. andersoni* and *C. serpentis*), and other infectious agents present in cattle fecal samples (*Escherichia coli*, *Eimeria* sp. and *Candida* sp.). A comparison between the DIF and phase contrast microscopy in Sheather solution (MCF) was accomplished for evaluation of the efficiency of both techniques for detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in fecal samples of calves seeded with *C. parvum* oocysts, and in fecal samples from naturally infected calves from 37 dairy farms in the region of Araçatuba, SP. A semi-quantitative analysis of *Cryptosporidium* sp. oocysts per microscopic field was accomplished for both techniques. The anti-*C. parvum* conjugate showed cross-reactivity with *C. andersoni* and *C. serpentis* oocysts. The DIF has been used successfully in the detection of *C. parvum* oocysts in fecal samples of calves, with sensitivity for detecting 10^4 oocysts in 3 g of fecal samples. Among the 300 fecal samples from naturally infected calves, 19.67% (59/300) were positive for *Cryptosporidium* oocysts by DIF, with significant statistical difference ($p < 0.05$) when compared to the number of positive samples by MCF.

Keywords: polyclonal antibodies; bovine, cryptosporidiosis, diagnosis, ELISA, zoonoses.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 O gênero *Cryptosporidium*

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* são coccídios reconhecidos como parasitos de mamíferos, aves, répteis, peixes, e anfíbios. São classificados no Filo Apicomplexa, Classe Sporozoasida, Subclasse Coccidiasina, Ordem Eucoccidiorida, Subordem Eimeriorina e Família Cryptosporidiidae (LEVINE, 1984; XIAO; FAYER, 2008).

A primeira espécie de *Cryptosporidium* foi descoberta em 1907, por Ernest Edward Tyzzer, em glândulas gástricas de camundongos, sendo denominada *Cryptosporidium muris*. Em 1912, o mesmo pesquisador descobriu outra espécie, denominada como *Cryptosporidium parvum*, também encontrada em camundongos, mas em células do intestino delgado (TYZZER, 1912)

Antes de 1980, infecção por *Cryptosporidium* em animais era considerada rara e, em seres humanos, era descrita como uma infecção oportunista em indivíduos imunologicamente comprometidos. A partir da década de 80 este conceito mudou, sendo atualmente considerado um importante agente etiológico de diarreia em seres humanos imunossuprimidos e em alguns animais domésticos e selvagens (SRÉTER; VARGA, 2000; ASHBOLT, 2004; XIAO et al. 2004), além de ser reconhecida como uma grave enfermidade de veiculação hídrica, tendo como agravante a dificuldade de prevenção da contaminação ambiental e ausência de terapias eficazes (DILLINGHAMA et al. 2002).

A padronização da taxonomia desse gênero vem sendo realizada pelo uso de métodos moleculares. Esses métodos, conjuntamente com estudos morfológicos, biológicos ou de especificidade por hospedeiros, auxiliam na validação das 21 espécies descritas (Tabela 1) (XIAO; CAMA, 2006).

1.2 Ciclo de vida e características biológicas e físicas do parasito

As espécies de *Cryptosporidium* possuem um ciclo de vida monoxeno muito semelhante ao de outros coccídios da subordem Eimeriorina, composto por seis estágios de desenvolvimento no organismo hospedeiro: excistação, merogonia, gametogonia, fertilização, formação da parede do oocisto e esporogonia (XIAO;

CAMA, 2006). O ciclo se inicia com a eliminação de oocistos já esporulados nas fezes de animais infectados (DUBEY et al. 1990).

Tabela 1. Espécies de *Cryptosporidium* consideradas válidas.

Espécie	Hospedeiro	Bibliografia
<i>C. andersoni</i>	Bovinos, camelos	LINDSAY et al. (2000)
<i>C. baileyi</i>	Aves	CURRENT et al. (1986)
<i>C. bovis</i>	Bovinos	FAYER et al. (2005)
<i>C. canis</i>	Cães	FAYER et al. (2001)
<i>C. fayeri</i>	Canguru vermelho	RYAN et al. (2008)
<i>C. fragile</i>	Anfíbios	JIRKU et al. (2008)
<i>C. felis</i>	Gatos	ISEKI, (1979)
<i>C. galli</i>	Aves	PAVLASEK, (1999)
<i>C. hominis</i>	Humanos, Macacos	MORGAN RYAN et al. (2002)
<i>C. macropodum</i>	Canguru cinza	POWER; RYAN, (2008)
<i>C. meleagridis</i>	Aves, humanos	SLAVIN, (1955)
<i>C. molnari</i>	Peixes	ALVAREZ PELLITERO; SITJÀ BOBADILLA, (2002)
<i>C. muris</i>	Roedores	TYZZER, (1910)
<i>C. parvum</i>	Ruminantes, humanos	TYZZER, (1912)
<i>C. ryanae</i>	Bovinos	FAYER et al. (2008)
<i>C. scophthalmi</i>	Peixes	ALVAREZ PELLITERO et al. (2004)
<i>C. serpentis</i>	Serpentes	BROWNSTEIN et al. (1977); LEVINE, (1980)
<i>C. suis</i>	Suínos	RYAN et al. (2004)
<i>C. varanii</i>	Lagarto monitor	PAVLASEK et al. (1995)
<i>C. xiaoi</i>	Ovinos	FAYER; SANTÍN, (2009)
<i>C. wrairi</i>	Porquinho da Índia	VETTERLING et al. (1971)

Após a ingestão dos oocistos ocorre a excistação, que é a fase em que os quatro esporozoítos são liberados, e se aderem à superfície das células epiteliais do trato gastrointestinal, onde são envolvidos pelas microvilosidades para formação de um vacúolo parasitóforo (localização intracelular porém, extracitoplasmática). Os

esporozoítos se diferenciam em trofozoítos, iniciando a multiplicação assexuada ou merogonia (SRÉTER; VARGA, 2000; XIAO et al. 2004; SMITH et al. 2007).

Os trofozoítos dão origem a dois tipos de merontes: o tipo I, com seis a oito merozoítos e o tipo II, com quatro merozoítos. Os merozoítos tipo I podem dar origem a novos merozoítos do tipo I ou do tipo II; os merozoítos tipo II iniciam a fase sexual do ciclo ou gametogonia, com diferenciação em estágios masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas) (SMITH et al. 2007). Após a fertilização, o macrogameta desenvolve-se em oocisto, podendo formar oocistos de parede delgada, que são responsáveis por auto infecção (capazes de iniciar um novo ciclo dentro do mesmo hospedeiro), e os de parede espessa, que são eliminados nas fezes e são resistentes às condições ambientais. A esporulação dos oocistos ocorre *in situ*, ou seja, logo após sua formação; sendo assim, eliminados em sua forma infectante, o que potencializa a possibilidade de infecção de novos hospedeiros (DUBEY et al. 1990).

O potencial infeccioso de *Cryptosporidium* está relacionado às características como: grande quantidade de excreção de oocistos pelos hospedeiros infectados; baixa especificidade por hospedeiros mamíferos (particularmente apresentada por *C. parvum*); tamanho reduzido e baixa velocidade de sedimentação dos oocistos na água; baixa dose infectante (menos de 10 oocistos) e por serem eliminados já em sua forma infectante (DILLINGHAMA et al. 2002; XIAO et al. 2004).

Os oocistos eliminados no ambiente são sensíveis à dessecação, ao congelamento e às temperaturas de 55°C/30 segundos ou 70°C/5 segundos (FUJINO et al. 2002). São ainda extremamente resistentes à ação do cloro utilizado no tratamento de água (XIAO et al. 2004), e permanecem viáveis no ambiente por até três meses em temperatura de 25-30°C, seis meses em temperatura de 20° C ou sete meses quando armazenados em água a 15°C (ANDERSON, 1985; FAYER et al. 1998).

1.3 Importância em Saúde Pública

A partir do surto de criptosporidiose na cidade de Milwaukee (EUA), em 1993, quando 403.000 pessoas apresentaram diarreia atribuída ao parasito, o gênero *Cryptosporidium* despertou atenção como um agente etiológico de importância em saúde pública (MACKENZIE et al. 1994).

Em humanos, já foram atribuídos surtos de criptosporidiose em mais de 90 países em seis continentes, principalmente pelo protozoário apresentar alta infectividade aliada a grande resistência em condições ambientais (XIAO et al. 2004).

As espécies que mais comumente infectam humanos são *C. parvum* e *C. hominis* (SMITH et al. 2006). Em humanos há dois tipos de transmissão: a antroponótica, que envolve geralmente *C. hominis* e ocorre mais frequentemente em áreas urbanas, e a transmissão zoonótica, mais freqüente com *C. parvum*, e está associada principalmente aos ruminantes, em sua maioria em áreas rurais (MORGAN et al. 1999), fato que pode estar relacionado ao maior contato com animais infectados e com o ambiente que estes habitam (LEARMONTH et al. 2004). Já em áreas urbanas, devido à densidade populacional, que leva a uma maior transmissão pelo contato pessoa-a-pessoa, prevalece infecção por *C. hominis* (LAKE et al. 2007).

Surtos de criptosporidiose em humanos podem se originar não somente de veiculação hídrica, mas também por ingestão de alimentos contaminados. Oocistos de *Cryptosporidium* foram identificados em mariscos (JOHNSON et al. 1995), mexilhões, ostras (GRACZYK et al. 1999), leite (GELLETLIE et al. 1997), legumes e vegetais (MONGE; CHINCHILA, 1996; ORTEGA-MORA et al. 1992) e alimentos industrializados, como bebidas (MILLARD et al. 1994).

Existem relatos de oocistos de *C. canis* (PIENIAZEK et al. 1999; PEDRAZA-DIAS et al. 2001; CAMA et al. 2003) *C. felis* (GUYOT et al. 2001; PEDRAZA-DIAS et al. 2001; CAMA et al. 2003), *C. meleagridis* (MCLAUCHLIN et al. 2000; MORGAN et al. 2000; PEDRAZA-DIAS et al. 2000; GUYOT et al. 2001; TIANGTIP; JONGWUTIWES 2002; CAMA et al. 2003; GATEI et al. 2003), *C. muris* (GUYOT et al. 2001; TIANGTIP; JONGWUTIWES, 2002; GATEI et al. 2002; GATEI et al. 2003) e os genótipos suíno (CAMA et al. 2003) e cervídeo (ONG et al. 2002) em fezes humanas.

A duração e patogenia da criptosporidiose em humanos dependem do estado imune dos indivíduos, variando de diarreia autolimitante grave em indivíduos imunocompetentes, a diarreia crônica e prolongada em pacientes imunocomprometidos, que pode resultar em óbito (ABRAHAMSEN et al. 2004).

A facilidade de transmissão desse parasito para o ser humano, em conjunto com a inexistência de tratamentos efetivos para a criptosporidiose, faz desta parasitose uma importante causa de morbidade e mortalidade, principalmente em

indivíduos imunossuprimidos e crianças em países em desenvolvimento (LEAV et al. 2003, ASHBOLT, 2004).

No Brasil existem vários relatos de infecção causada por *Cryptosporidium* em seres humanos, principalmente em crianças e pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SAUDA et al. 1993; OSHIRO et al. 2000; PEREIRA et al. 2002; BRANTLEY et al. 2003). Em um estudo realizado na cidade de Uberlândia – MG, Silva et al. (2003), por meio do teste de imunoadsorção enzimática (ELISA), encontraram 5,8% de pacientes humanos, portadores da imunodeficiência adquirida, com a presença de oocistos em amostras fecais. Na cidade de São Paulo, Carvalho-Almeida et al. (2006), por meio da técnica de Kinyoun, diagnosticaram 20,3% (13/64) das amostras fecais de crianças e uma amostra de adulto com presença de oocistos de *Cryptosporidium*. Mascarini e Donalísio (2006), em estudo transversal avaliaram, por meio da técnica de Ziehl-Neelsen modificada, 379 e 397 amostras de fezes de crianças em 2002 e 2003, respectivamente, de cinco creches de Botucatu, SP, e encontraram 15,5% (2002) e 3,7% (2003) das amostras positivas para oocistos de *Cryptosporidium spp.*

1.4 Infecção em bovinos

Distúrbios gastrintestinais são freqüentes em criações de bovinos, sendo a diarreia a enfermidade gastrintestinal mais comum neste tipo de criação (NAVARRE et al. 2000).

Os bezerros parecem ser mais suscetíveis à infecção clínica por *Cryptosporidium*, sendo que grande parte das infecções diagnosticadas em indivíduos adultos são de natureza assintomática ou associadas a sintomas clínicos de pouca gravidade (O'DONOGHUE, 1995).

Existem quatro espécies do gênero *Cryptosporidium* que acometem bovinos. Os animais adultos e os bezerros desmamados são acometidos principalmente por *C. andersoni*, *C. bovis* e *C. ryanae*, já os bezerros em lactação são infectados por *C. parvum* e considerados como os maiores reservatórios desta espécie, que apresenta alto potencial zoonótico (XIAO; FENG, 2008).

Segundo Angus (1987) um bezerro infectado pode eliminar mais de 10^{10} oocistos por dia, em períodos de quatro a 14 dias, confirmando seu importante papel na contaminação ambiental.

Sanford e Josephson (1982) descreveram o envolvimento de *C. parvum* em episódios de diarreia em bezerros neonatos, fato também descrito por Heine et al. (1984) e Feitosa et al. (2008), confirmando sua participação em quadros de diarreia, enterite e mortalidade em bezerros, nas primeiras semanas de vida.

Bezerros de aptidão leiteira e de corte mantidos em confinamento são mais acometidos por *C. parvum*, sendo rara a ocorrência em bezerros criados extensivamente (MARTINS-VIEIRA et al. 2009).

A mortalidade observada na criptosporidiose bovina pode ser baixa quando a diarreia é unicamente causada por este protozoário, ou mais elevada, quando existir associação com outros agentes infecciosos, ou quando o hospedeiro apresentar má nutrição (CHERMETTE; BOUFASSA-OUZROUT, 1988). A morbidade é considerada significativa em bovinos neonatos, com presença de enterite severa e perdas econômicas relacionadas ao seu desenvolvimento (XIAO et al. 1998).

Um estudo epidemiológico realizado em 1103 fazendas nos Estados Unidos, revelou a presença de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em 22,4% (1642/7369) das amostras analisadas, e em 59,1% (652/1103) das propriedades estudadas, demonstrando grande disseminação deste parasito naquela região (GARBER et al. 1994).

Na região de Araçatuba, interior do estado de São Paulo, Feitosa et al. (2004) constatarem a prevalência de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em 12,4% (57/459) amostras fecais bezerros com até duas semanas de vida, provenientes de 33 propriedades leiteiras.

1.5 Emprego da microscopia e de métodos imunológicos no diagnóstico de criptosporidiose

Há uma grande variedade de métodos utilizados no diagnóstico da criptosporidiose, sendo a maioria relacionada à detecção direta de oocistos por meio de microscopia. As técnicas mais conhecidas para este fim são: coloração por Kinyoun (MA; SOAVE, 1983), Ziehl-Neelsen modificado (HENRIKSEN; POHLENZ et al. 1981), safranina azul de metileno (BAXBY et al. 1984), verde malaquita (ELLIOT et al. 1999), visualização microscópica em contraste de fase em solução de Sheather (FEITOSA et al. 2008) e reação de imunofluorescência direta (BIALEK et al. 2002).

A visualização de oocistos de *Cryptosporidium* por métodos tradicionais de microscopia possui algumas vantagens, como a diminuição do tempo e o baixo custo, e como desvantagens a possibilidade de resultados falsos positivos e baixa sensibilidade (CASEMORE, 1991).

Para o diagnóstico imunológico, há disponibilidade no mercado de *kits* comerciais de reação imunoenzimática (ELISA), que detectam coproantígenos em amostras fecais, e de imunofluorescência direta (IFD), que emprega anticorpos monoclonais *anti-Cryptosporidium* marcados com isotiocianato de fluoresceína (BIALEK et al. 2002). Estes testes têm substituído a análise microscópica tradicional, em amostras fecais, para pesquisa de oocistos, com bons resultados de sensibilidade e especificidade (ARROWOOD; STERLING, 1989; ZIMMERMAN; NEEDHAM, 1995; JOHNSTON et al. 2003).

O custo de aquisição de *kits* comerciais de ELISA e IFD inviabiliza seu uso na rotina laboratorial (GARCIA; SHIMIZU, 1997; BIALEK et al. 2002), o que faz com que os métodos de microscopia tradicionais sejam mais utilizados para detecção de *Cryptosporidium* spp. em amostras fecais (MAGI et al. 2006; WEISEL et al. 2006).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Padronizar a reação de imunofluorescência direta para detecção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em amostras fecais de bezerros.

Objetivos específicos

Produzir um conjugado anti-*Cryptosporidium parvum* contendo anticorpos policlonais anti-*C. parvum* produzidos em coelhos.

Desenvolver o teste de ensaio imuno-enzimático indireto (ELISA), para testar a reatividade dos anticorpos policlonais anti-*C. parvum* contra antígenos de oocistos sonificados de *C. parvum*.

Comparar o limiar de detecção da imunofluorescência direta com a microscopia de contraste de fase em solução de Sheather, em amostras fecais inoculadas com oocistos de *C. parvum* e amostras fecais de bezerros naturalmente infectados.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSEN, M.S., TEMPLETON, T.J., ENOMOTO, S., ABRAHANTE, J.E., ZHU, G. et al. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, v. 304, p. 441- 445, 2004.

ALVAREZ-PELLITERO, P., QUIROGA, M.I., SITJÀ-BOBADILLA, A., REDONDO, M.J., PALENZUELA, O., PADRÓS, F., VÁZQUEZ, 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.

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

ANDERSON, B.C. Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. American. **Journal of Public Health**, v. 75, p. 133-1434, 1985.

ANGUS, K.W. Cryptosporidiosis in domestic animals and humans. **In Practice**, v.9, p. 47-49, 1987.

ARROWOOD, M.J., STERLING, C.R. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1490-1495, 1989.

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

BAXBY, D., BLUNDELL, N., HART, C.A. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. **The Journal of Hygiene (Cambridge)**, v. 92, p. 317-323, 1984.

BIALEK, R., BINDER, N., DIETZ, K., JOACHIM, A., KNOBLOCH, J., ZELCK, U. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, p. 283–288, 2002.

BRANTLEY, R.K., WILLIAMS K.R., SILVA T.M., SISTROM M., THIELMAN, N.M., WARD, H., LIMA, A.A., GUERRANT, R.L. AIDS-Associated diarrhea and wasting in Northeast Brazil is associated with subtherapeutic plasma levels of antiretroviral medications and with both bovine and human subtypes of *Cryptosporidium parvum*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, 16-22, 2003.

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.

CAMA, V.A., BERN, C., SULAIMAN, I.M., GILMAN, R.H., RICONA, E., VIVAR, A., KAWAI, V., VARGAS, D., ZHOU, L., XIAO, L. *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. **Journal of Eukariotic Microbiology**, v. 50, p. 531-533, 2003.

CARVALHO-ALMEIDA, T.T., PINTO, P.L.S., QUADROS, C.M.S., TORRES, D.M.A.G.V., KANAMURA, H.Y. & CASIMIRO, A.M. - Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 27-32, 2006

CASEMORE, D.P. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 44, p. 445-451, 1991.

CHERMETTE, R., BOUFASSA-OUZROUT, S. *Cryptosporidiosis: a cosmopolitan disease in animals and in man*. **OIE**, Paris, 2. ed. p. 122, 1988.

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

DILLINGHAMAA, 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. **CRC Press**, v. 199, p. 95-103, 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.

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., SANTÍN, 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., JENKINS, M.C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. **Journal of Parasitology**, v. 84, p. 1165-1169, 1998.

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.

FEITOSA, F.L.F., SHIMAMURA, G.M., MENDES, L.C.N., PEIRÓ, J.R., FÉRES, F.C., BOVINO, F., PERRI, S.H.V., MEIRELES, M.V. Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarreia em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 452-456, 2008.

FEITOSA, F. L., SHIMAMURA, G.M., ROBERTO, T., MEIRELES, M.V., NUNES, C.M., CIARLINI, P.C., BORGES, A.S. Prevalência de criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 189-193, 2004.

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, n. 3, p. 199-200, 2002.

GARBER, L.P., SALMAN, M.D., HURD, H.S., KEEFE, T., SCHLATER, J.L. Potential risk factor for *Cryptosporidium* infections in dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, p. 86-91, 1994.

GARCIA, L. S., SHIMIZU, R. Y. Evaluation of nine immunoassay Kits (enzyme immune assay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 209-212, 1997.

GATEI, W., ASHFORD, R.W., BEECHING, N.J., KAMWATI, S.K. GREENSILL, J., HART, C.A. *Cryptosporidium muris* infection in an HIV-infected adult, Kenya. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 204-206, 2002.

GATEI, W., GREENSILL, J., ASHFORD, R.W., CUEVAS, L.E., PARRY, C.M., CUNLIFFE, N.A., BEECHING, N.J., HART, C.A. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1458-1462, 2003.

GELLETLIE, R., STUART, J., SOLTANPOOR, N., ARMSTRONG, R., NICHOLS, G.. Cryptosporidiosis associated with school milk. **Lancet**, v. 350, p. 1005-1006, 1997.

GRACZYK, T.K., FAYER, R., LEWIS, E.J., TROUT, J.M., FARLEY, C.A. *Cryptosporidium* oocysts in bent mussels (*Ischadium recurvum*) in the Chesapeake bay. **Parasitology Research**, v. 85, p. 518-520, 1999.

GUYOT, K., FOLLET-DUMOULIN, A., LELIEVRE, E., SARFATI, C., RABODONIRINA, M., NEVEZ, G., CAILLIEZ, J.C., CAMUS, D., DEI-CAS, E. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3472-3480, 2001.

HEINE, J., POHLENZ, J.F.L., MOON, H.W. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 150, p. 768-775, 1984.

HENRIKSEN, S. A. AND POHLENZ, J. F. L. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 22, p. 594–596, 1981.

ISEKI, M. *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 28, p. 285- 307, 1979.

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

JOHNSON, D.C., REYNOLDS, K.A., BERBA, C.P., PEPPER, I.L., ROSE, J.B. Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in marine waters. **Water Science Technology**, v. 31, p. 439-442, 1995.

JOHNSTON, S.P., BALLARD, M.M., BEACH, M.J., CAUSER, L., WILKINS, P.P. Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Organisms in Fecal Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 623-626, 2003.

LAKE, I. R., NICHOLS, G., BENTHAM, G., HARRISON, F.C.D., HUNTER, P. R., KOVATS, R. S. Cryptosporidiosis decline after regulation, England and Wales, 1989–2005. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 623-625, 2007.

LEARMONTH, J. J., IONAS, G., EBBETT, K. A., KWAN, E. S. Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 3973, 2004.

LEAV, B.A., MACKAY, M., WARD, H.D. *Cryptosporidium* species: new insights and old challenges. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 906-913, 2003.

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.

LINDSAY, D.S., UPTON, S.J., OWENS, D.S., MORGAN, U.M., MEAD, J.R., Blagburn, B.L. *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) 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.

MAGI, B., CANOCCHI, V., TORDINI, G., CELLESI, C., BARBERI, A. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. **Parasitology Research**, v. 98, p. 150-152, 2006.

MA, P., SOAVE, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhoea. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 147, p. 824–828, 1983.

MARTINS-VIEIRA, M.B.C., BRITO, L.A.L. and HELLER, L. Oocistos de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerro infectado experimentalmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.6, p. 1454-1458, 2009.

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, n. 6, p. 577-579, 2006.

MCLAUCHLIN, J., AMAR, C., PEDRAZA-DIAZ, S., NICHOLS, G.L. Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3984-

3990, 2000.

MILLARD, P.S., GENSHEIMER, K.F., ADDISS, D.G., SOSON, D.M., BECKETT, G.A., HOUCK-JANKOSKI, A., HUDSON, A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh-pressed apple cider. **Journal of the American Medical Association**, v. 272, p. 1592-1196, 1994.

MONGE, R., CHINCHILLA, M. Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 202-203, 1996.

MORGAN-RYAN, U.M., FALL, A., WARD, L.A., HIJJAWI, N., SULAIMAN, I., FAYER, R., THOMPSON, R.C., OLSON, M., LAL, A., AND XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 49, p. 433-440, 2002.

MORGAN, U., WEBER, R., XIAO, L., SULAIMAN, I., THOMPSON, R.C., NDIRITU, W., LAL, A., MOORE, A., DEPLAZES, P. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1180-1183, 2000.

MORGAN, U. M., XIAO, L., FAYER, R., LAL, A. A., THOMPSON, R. C. A. Variation in *Cryptosporidium*: Towards a taxonomic revision of the genus. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 1733-1751, 1999

NAVARRE, C. B., BELKNAP, E. B., ROWE, S. E. Differentiation of Gastrointestinal Diseases of Calves. Veterinary Clinics of North America: **Food Animal Practice**, v. 16, p. 37-57, 2000.

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 25, p. 139-95, 1995.

ONG, C.S.L., EISLER, D.L., ALIKHANI, A., FUNG, V.W.K., TOMBLIN J., BOWIE, W.R., ISSAC-RENTON, J.L. Novel *Cryptosporidium* genotypes specific in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype.

Emerging Infectious Diseases, v. 8, p. 263-268, 2002.

ORTEGA-MORA, L.M., TRONCOSO, J.M., ROJO-VÁSQUES, F.A., GÓMEZ-BAUTISTA, M. Cross-reactivity of polyclonal serum antibodies generated against *Cryptosporidium parvum* oocysts. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 3442-3445, 1992.

OSHIRO, E.T., DORVAL, M.E.C., NUNES, V.L.B., SILVA, M.A.A., SAID, L.A.M. Prevalência de *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. 22, 277-280, 2000.

PAVLÁSEK, I. Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum specificity and the environment. *Rem. Klinikal Mikrobiology*, 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.

PEDRAZA-DIAS, S., AMAR, C., IVERSEN, A.M., STANLEY, P.J., McLAUCHLIN, J. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* dog type from patients in England. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 293-296, 2001.

PEDRAZA-DIAS, S., AMAR, C., McLAUCHLIN, J. The identification and characterisation of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human faeces as *Cryptosporidium meleagridis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, p. 189-194, 2000.

PEREIRA, M.D., ATWILL, E.R., BARBOSA, A.P., SILVA, S.A., GARCIA-ZAPATA, M.T. Intra-familial and extra-familial risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection among children hospitalized for diarrhea in Goiânia, Goiás, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 787-793, 2002.

PIENIAZEK, N.J., BORNAY-LLINARES, F.J., SLEMENDA, S.B., DA SILVA, A.J., MOURA, I.N., ARROWOOD, M.J., DITRICH, O., ADDISS, D.G. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 444-449, 1999.

POWER, M., RYAN, U. *Cryptosporidium macropodum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos *Macropus giganteus*. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 1114-1117, 2008.

RYAN, U.M., MONIS, P., ENEMARK, H.L., SULAIMAN, I., SAMARASINGHE, B., READ, C., BUDDLE, R., ROBERTSON, I., ZHOU, L., THOMPSON, R.C., XIAO, L. *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 769-773, 2004.

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.

SANFORD, S. A., JOSEPHSON, G. K. A. Bovine cryptosporidiosis : clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves. **Canadian Veterinary Journal**, v.23, p. 243-47, 1982.

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

SILVA, C.V., FERREIRA, M.S., GONÇALVES-PIRES, M.R.F., COSTA-CRUZ, J.M. Detection of *Cryptosporidium*–specific coproantigen in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome patients by using a commercially available immunoenzymatic assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1097-1099, 2003.

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

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.

SMITH, H.V., CACCIÒ, S.M., TAIT, A., MCLAUCHLIN, J., THOMPSON, R. C. A. Tools for investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 161-167, 2006.

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

TIANGTIP, R., JONGWUTIWES, S. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. **Tropical Medicine and International Health**, v. 7, p. 357-364, 2002.

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.

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.

XIAO, L., CAMA, V. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in: ORTEGA, Y. R. Foodborne Parasites. **Springer US**, p. 108, 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., FAYER, R., RYAN, U., UPTON, S. J. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n.1, p. 72-97, 2004.

XIAO, L., FENG, Y. Zoonotic cryptosporidiosis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, p. 309-323, 2008.

XIAO, L., SULAIMAN, I., FAYER, R., LAL, A. Species and strain-specific typing of *Cryptosporidium* parasites in clinical and environmental samples. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 687-692, 1998.

WEISEL, T., DITTRICH, S., MÖHL, I., ADUSU, E., JELINEK, T. Evaluation of seven commercial antigen detection tests for *Giardia* and *Cryptosporidium* in stool samples. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 656-659, 2006.

ZIMMERMAN, S.KI., NEEDHAM, C.A. Comparison of conventional stool concentration and preserved-smear methods with Merifluor *Cryptosporidium* / *Giardia* Direct Immunofluorescence Assay and ProSpecT *Giardia* EZ Microplate Assay for detection of *Giardia lamblia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1942–1943, 1995.

CAPÍTULO 2 - PRODUÇÃO DE CONJUGADO ANTI-CRYPTOSPORIDIUM PARVUM PARA DETECÇÃO DE OOCISTOS EM AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA DIRETA

Weslen F. P. Teixeira¹, Willian M. D. Coelho², Cáris M. Nunes¹, Marcelo V. Meireles^{1*}.

¹Curso de Medicina Veterinária - FOA-UNESP - Araçatuba, SP, Rua Clóvis Pestana, 793 16050-680 - Araçatuba, SP. ²Curso de Medicina Veterinária – FCAV - UNESP - Jaboticabal, SP.

RESUMO - O objetivo deste estudo foi produzir um conjugado contendo anticorpos policlonais anti-*Cryptosporidium parvum* e padronizar a reação de imunofluorescência direta (IFD) para detecção de oocistos de *C. parvum* em amostras fecais de bezerros. Para produção de anticorpos policlonais anti-*C. parvum*, dois coelhos da raça Nova Zelândia foram imunizados com uma solução purificada de oocistos de *C. parvum* e adjuvante de Freund. A purificação da fração de imunoglobulina G (IgG) foi realizada por meio de precipitação em sulfato de amônio e cromatografia em coluna de DEAE celulose e a titulação dos anticorpos policlonais anti-*C. parvum* foi determinada por meio do ensaio imuno-enzimático (ELISA). A fração IgG de coelho anti-*C. parvum* foi conjugada com tiocianato de fluoresceína e a padronização da reação foi feita utilizando-se várias diluições do conjugado, em lâminas positivas para *C. parvum*. Foi pesquisada também a presença de reatividade cruzada do conjugado anti-*C. parvum* com *C. serpentis*, *C. andersoni*, *Escherichia coli*, *Eimeria* sp. e *Candida* sp.. A produção do conjugado anti-*C. parvum* foi bem sucedida, sendo possível a padronização da IFD para detecção de oocistos em fezes. Foi também observada reatividade cruzada dos anticorpos policlonais anti-*C. parvum*, com *C. andersoni* e *C. serpentis*.

Palavras-chave: Imunofluorescência direta, oocistos, *Cryptosporidium parvum*, amostras fecais, bovinos.

ABSTRACT - The aim of this research was to produce a conjugate containing polyclonal anti-*Cryptosporidium parvum* antibodies and standardize a direct immunofluorescence assay (DIF) for detection of *C. parvum* oocysts in fecal samples of calves. In order to obtain anti-*C. parvum* polyclonal antibodies, two New Zealand

rabbits were immunized with a purified solution of *C. parvum* oocysts and Freund's adjuvant. The purification of the immunoglobulin G (IgG) fraction was performed by precipitation in ammonium sulfate and chromatography using DEAE cellulose column. The titer of polyclonal anti-*C. parvum* antibodies was determined by means of the enzyme-immunosorbent assay (ELISA). The rabbit anti-*C. parvum* IgG fraction was conjugated with fluorescein thiocyanate and the standardization of the IFD was performed using various dilutions of conjugate in slides positive for *C. parvum* oocysts. The cross-reactivity of the anti-*C. parvum* conjugate was tested using oocysts of *Cryptosporidium serpentis*, *Cryptosporidium andersoni*, *Eimeria* sp., *Escherichia coli*, and *Candida* sp.. The production of a conjugate anti-*C. parvum* was successful, allowing the standardization of DIF for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples. It was also observed cross-reactivity of polyclonal anti-*C. parvum* antibodies, with *C. andersoni* and *C. serpentis*.

Keywords: Direct immunofluorescence assay, oocysts, *Cryptosporidium parvum*, fecal samples, cattle.

INTRODUÇÃO

A criptosporidiose em bezerros neonatos é geralmente causada por *Cryptosporidium parvum*, com relatos de infecções em que há eliminação de até 6×10^{11} oocistos por animal durante o primeiro mês de vida (UGA et al. 2000), o que representa risco transmissão para outros animais e também para humanos, já que *C. parvum* apresenta alto potencial zoonótico (XIAO; FAYER, 2008).

A importância de *C. parvum* como agente etiológico de diarreia, enterite e mortalidade em bezerros, nas primeiras semanas de vida, já foi confirmada por diversos pesquisadores (SANFORD; JOSEPHSON, 1982; HEINE et al. 1984; FEITOSA et al. 2008).

Entre as técnicas empregadas para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais, destaca-se a reação de imunofluorescência direta (IFD) (FAYER et al. 2000; BIALEK et al. 2002; JEX et al. 2008), reconhecida por apresentar melhor sensibilidade e especificidade quando comparada às técnicas tradicionais de coloração (ARROWOOD; STERLING, 1989; JOHNSTON et al. 2003).

Existem no mercado *kits* de IFD importados que utilizam anticorpos monoclonais anti-*C. parvum*, marcados com isotiocianato de fluoresceína (GRACZYK et al. 1996). No entanto, o valor de aquisição desses produtos

praticamente inviabiliza seu uso em rotina laboratorial (ALLES et al. 1995; CARVALHO, 2009).

O objetivo deste estudo foi produzir um conjugado com anticorpos policlonais anti-*C. parvum* e padronizar a IFD para detecção de oocistos de *C. parvum* em amostras fecais de bezerros.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Faculdade de Odontologia da UNESP – Campus de Araçatuba, em 10/10/2008, sob o protocolo 2008-006645.

Produção dos anticorpos policlonais anti-*C. parvum*

Os anticorpos policlonais anti-*C. parvum* foram produzidos em dois coelhos adultos (A e B), ambos da raça Nova Zelândia, por meio de inoculação inicial, via intradérmica, com solução contendo 3×10^6 oocistos de *C. parvum* e adjuvante completo de Freund, na proporção de 1:1, seguindo-se inoculações intramusculares com 2×10^6 oocistos e adjuvante incompleto de Freund, na proporção de 1:1, após 3, 6, e 8 semanas depois da primeira inoculação (STIBBS; ONGERTH, 1986). Os oocistos utilizados nas inoculações foram provenientes de uma amostra de fezes de bovino, positiva para *C. parvum*, submetida à técnica de centrífugo-sedimentação em água e éter (MELONI; THOMPSON, 1996), purificação em solução de cloreto de cézio (ARROWOOD; DONALDSON, 1996) e quantificação em câmara de Neubauer.

Cinco dias após a última inoculação, os coelhos foram anestesiados com acepromazina e tiopental sódico, e as alíquotas sanguíneas coletadas por punção cardíaca. Os soros foram obtidos por meio de centrifugação das alíquotas sanguíneas a 1.500 rpm, por 5min a 4°C, sendo posteriormente armazenado a -20°C (STIBBS; ONGERTH, 1986).

Para verificação do título de anticorpos anti-*C. parvum*, antes e após a inoculação dos oocistos, por meio do teste de ensaio imuno-enzimático indireto (ELISA), duas alíquotas de 1mL de soro de cada coelho foram armazenadas, uma no dia da primeira inoculação e outra cinco dias após a última inoculação.

ELISA indireto para titulação de anticorpos de coelho anti-*C. parvum*

O antígeno utilizado no ELISA foi feito a partir de 23×10^6 oocistos de *C. parvum*, purificados em cloreto de cério, diluídos em PBS pH 7.4 e sonificados em banho de gelo, durante 10 ciclos de dez segundos, com intervalos de 20 segundos de descanso entre um ciclo e outro. Após a dosagem protéica com o *kit* BCA[®] (Sigma, Saint Louis, EUA), o antígeno foi utilizado na concentração de 10µg/ml.

As amostras de soro dos coelhos, colhidas antes e após inoculações de oocistos, foram testadas na proporção de 1:1000 (soro/leite desnatado 5%).

O conjugado composto por IgG de cabra anti-IgG de coelho, ligada à peroxidase - A6154[®] (Sigma, Saint Louis, EUA) e o substrato tetrametilbenzidina - TMB[®] (Invitrogen, Carlsbad, USA) foram utilizados na proporção de 1:5.000 (conjugado e substrato/leite desnatado 5%).

A leitura da reação foi feita em um leitor de microplacas (Labsystems Multiskan EX), com filtro de 450 nm.

Produção do conjugado

Para produção do conjugado foi utilizado o soro do coelho A. A fração gamaglobulínica foi purificada por precipitação com sulfato de amônia 35% (solução de sulfato de amônia a 70% diluída na proporção de 1:1 com o soro do coelho) e centrifugada a 7.000 g, durante 30min. O sedimento resultante foi diluído em 3mL de PBS 0,01M, pH 7,2, colocado em membrana de diálise e submerso em tampão Tris-HCl 0,025M, pH 8,8, durante 18 horas, para retirada do excesso de sulfato de amônio (HERBERT et al. 1973).

A fração IgG foi obtida por meio de cromatografia por troca iônica em coluna com gel de DEAE-celulose (CORTHIER et al. 1984) e a dosagem protéica da fração gamaglobulínica e fração IgG realizadas por meio do *kit* BCA[®] (Sigma, Saint Louis, EUA).

A reatividade da fração IgG anti-*C. parvum* foi testada por meio do ELISA indireto, na proporção de 1:400 (IgG/leite desnatado 5%). Após a comprovação de sua reatividade contra antígenos de *C. parvum*, a fração IgG foi conjugada com isotiocianato de fluoresceína, por meio de diluição de 15mL da fração IgG do coelho A em 3mL de tampão carbonato bicarbonato 0,5M, pH 9,5. A esta solução adicionou-se 1,46mg de isotiocianato de fluoresceína (0,02mg para cada mg de

proteína contida na amostra de IgG do coelho), com incubação a 4°C, durante a noite.

A purificação do anticorpo conjugado foi feita em coluna de gel de Sephadex G25 (Sigma, Saint Louis, EUA), na proporção de 1cm de gel na coluna para cada 1mL de amostra do conjugado.

A solução contendo o conjugado foi aliquoteada em tubos âmbar de 2mL e congelada a -20°C.

Reação de imunofluorescência direta

As lâminas utilizadas na IFD foram previamente tratadas com polilisina (Sigma, Saint Louis, EUA), diluída na proporção de 1:20, em água deionizada (ARROWOOD et al. 1991) e adicionados de 25µL de amostra de fezes purificada, positiva para oocistos de *C. parvum* (conservada em 10% formalina tamponada, na proporção de 1:3), deixando a gota da amostra secar totalmente em temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 25µL do conjugado anti-*C. parvum*, em várias diluições (1:40, 1:80 e 1:100, em PBS 0,01M, pH 7,2 e 4'.6'-diamidino-2-phenilindole (DAPI) (50µL de DAPI a 2mg/mL para 50mL de PBS 0,01M, pH 7,2), incubando a lâmina a 37°C, por 30min em câmara úmida. Ao término da incubação foi realizada uma lavagem com PBS 0,01M, pH 7,2, finalizando a montagem com uma lamínula sobre 25µL do tampão de montagem (glicerol 90% em PBS 0,01M, pH 7,2; p-phenylenediamine, 0,1mg/ ml) (PLATT; MICHAEL, 1983).

A leitura da reação foi feita em um microscópio Olympus BX-50, com lâmpada de mercúrio de 100 W, filtros U-MWU2 (DAPI) e U-MWU2-B (fluoresceína), em aumento de 400x.

Determinação da especificidade da IFD

A confirmação do diagnóstico obtido pela IFD foi realizada utilizando-se coloração com 4',6'-Diamidino-2-Phenilindole (DAPI) e microscopia com contraste diferencial de fase (SMITH et al. 2002).

Foi pesquisada também a presença de reatividade cruzada da IgG anti-*C. parvum* com *Escherichia coli*, *Eimeria* sp., *Candida* sp. e com outras espécies de *Cryptosporidium* (*C. andersoni* e *C. serpentis*).

RESULTADOS

O volume das amostras de soro sanguíneo obtidas dos coelhos A e B foi respectivamente de 36mL e 39mL. Nos resultados de concentração protéica e do ELISA das frações de gamaglobulina e de IgG purificada em coluna de DEAE celulose foi constatado que o coelho A teve maior produção de anticorpos que o coelho B (Tabela 1).

Tabela 1. Volume e concentração protéica de gamaglobulinas e de imunoglobulinas G (IgG) do soro dos coelhos inoculados com oocistos de *C. parvum*.

Coelhos	Gamaglobulinas		IgG	
	Volume (mL)	Concentração Protéica (mg/mL)	Volume (mL)	Concentração Protéica (mg/mL)
A	4,5	43,91	30	4,87
B	5,5	22,62	15	4,42

Na Tabela 2 estão descritos os resultados do ELISA realizado nos soros dos coelhos colhidos antes e após a inoculação de oocistos de *C. parvum* e na fração IgG purificada em coluna de DEAE celulose.

O volume total do conjugado produzido foi de 12mL, sendo utilizado na diluição 1:80, já que esta diluição possibilitou a obtenção de melhores resultados quanto à visualização dos oocistos de *C. parvum*.

A fluorescência observada nos oocistos de *C. parvum* emanava principalmente a partir das suas paredes (Figura 1). No teste de especificidade da IFD, o conjugado não apresentou reatividade cruzada com *E. coli*, *Eimeria sp.* e *Candida sp.* No entanto, houve reatividade cruzada com *C. andersoni* (Figura 2) e *C. serpentis* (Figura 3).

Tabela 2. Resultados da reação imunoenzimática (ELISA) realizada nas amostras de soros dos coelhos, antes e após a inoculação de oocistos de *C. parvum*, e nas frações de imunoglobulinas G (IgG) obtidas dos dois coelhos.

Coelhos	Absorbância (450 nm)		
	Soro		Fração de IgG
	Antes da inoculação	Depois da inoculação	
A	0.270	2.444	0.877
B	0.262	1.655	0.730

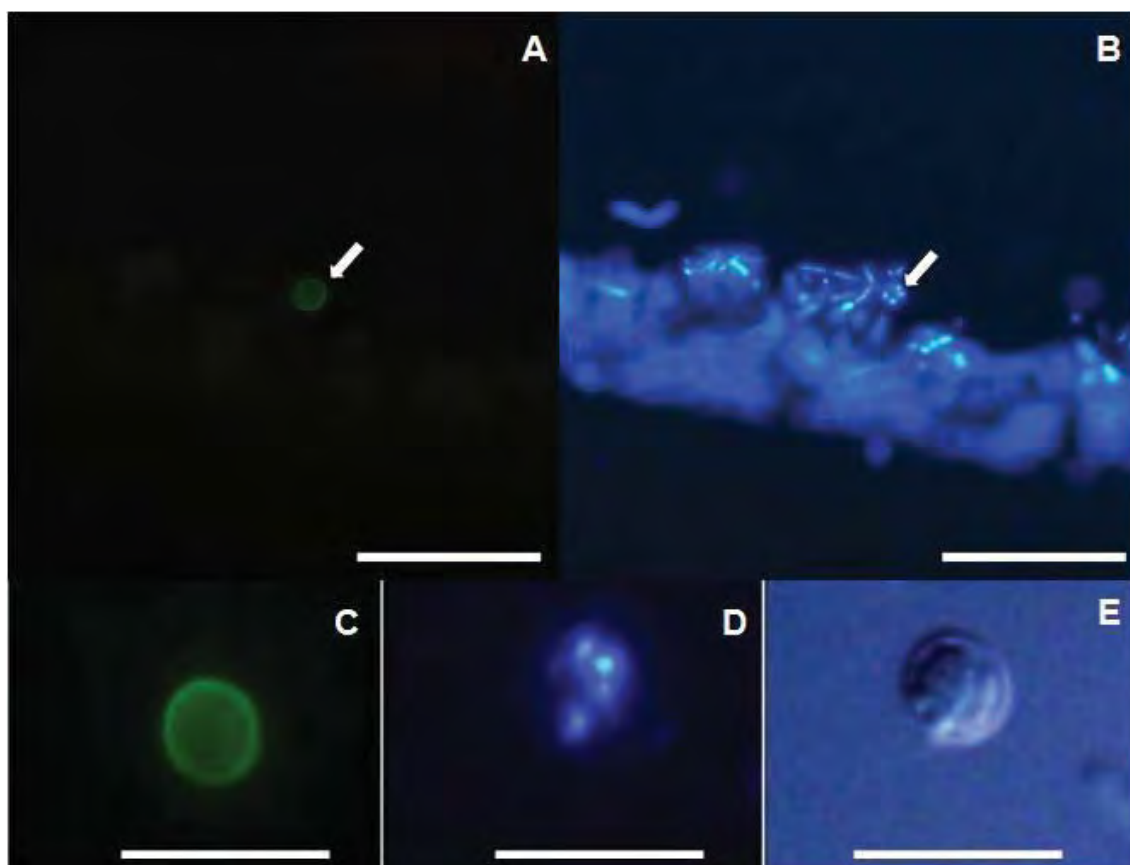


Figura 1. Oocistos de *C. parvum*. A: imunofluorescência direta (barra: 20 μ m). B: mesmo campo de microscopia em A, coloração com DAPI (barra: 20 μ m). C, D e E: mesmo campo de microscopia, respectivamente, imunofluorescência direta, coloração com DAPI e contraste diferencial de fase (barra: 10 μ m).

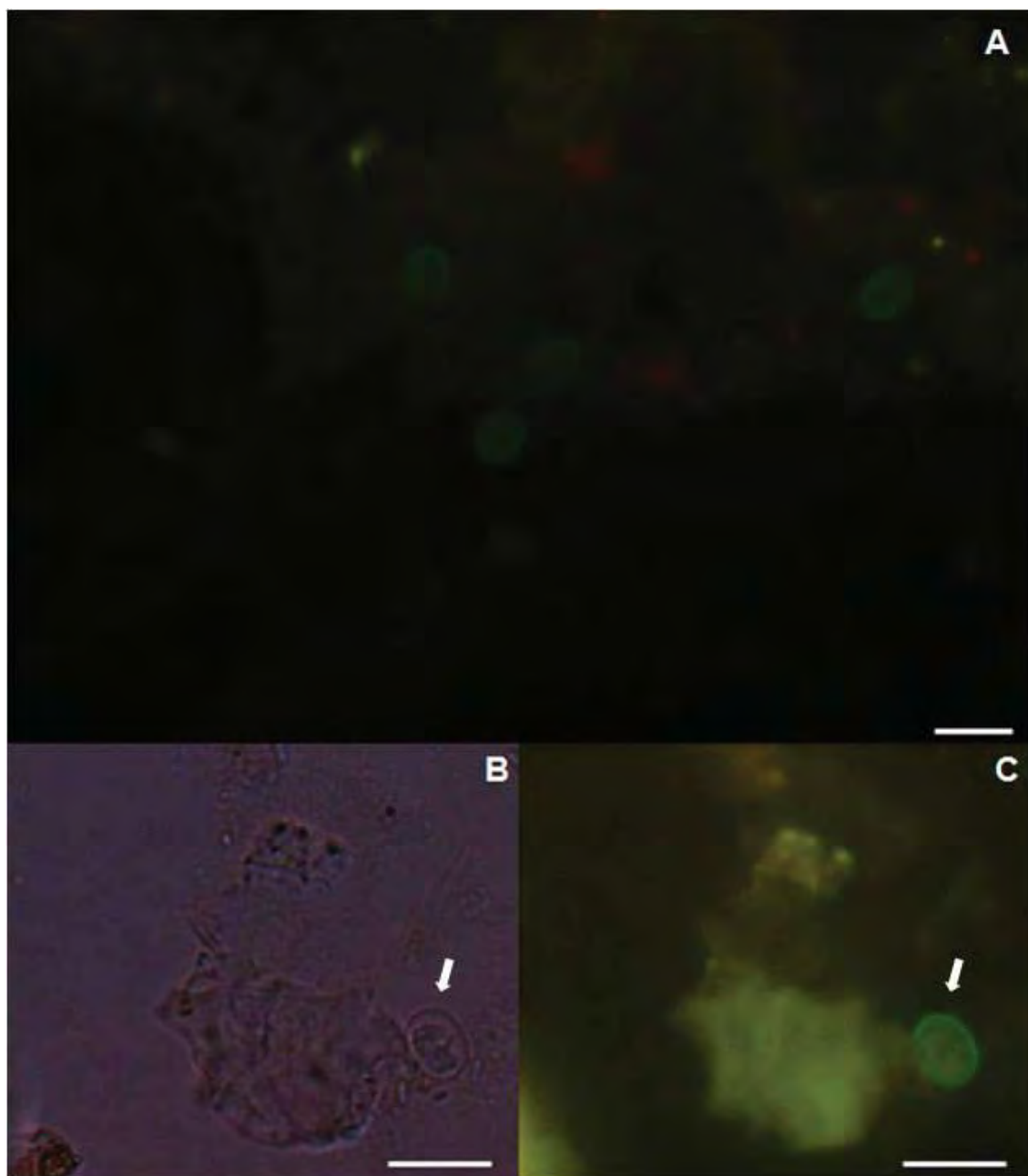


Figura 2. Oocistos de *C. andersoni*. A: imunofluorescência direta. B: Contraste diferencial de fase. C: imunofluorescência direta, mesmo campo de microscopia em B (barra: 10 μ m).

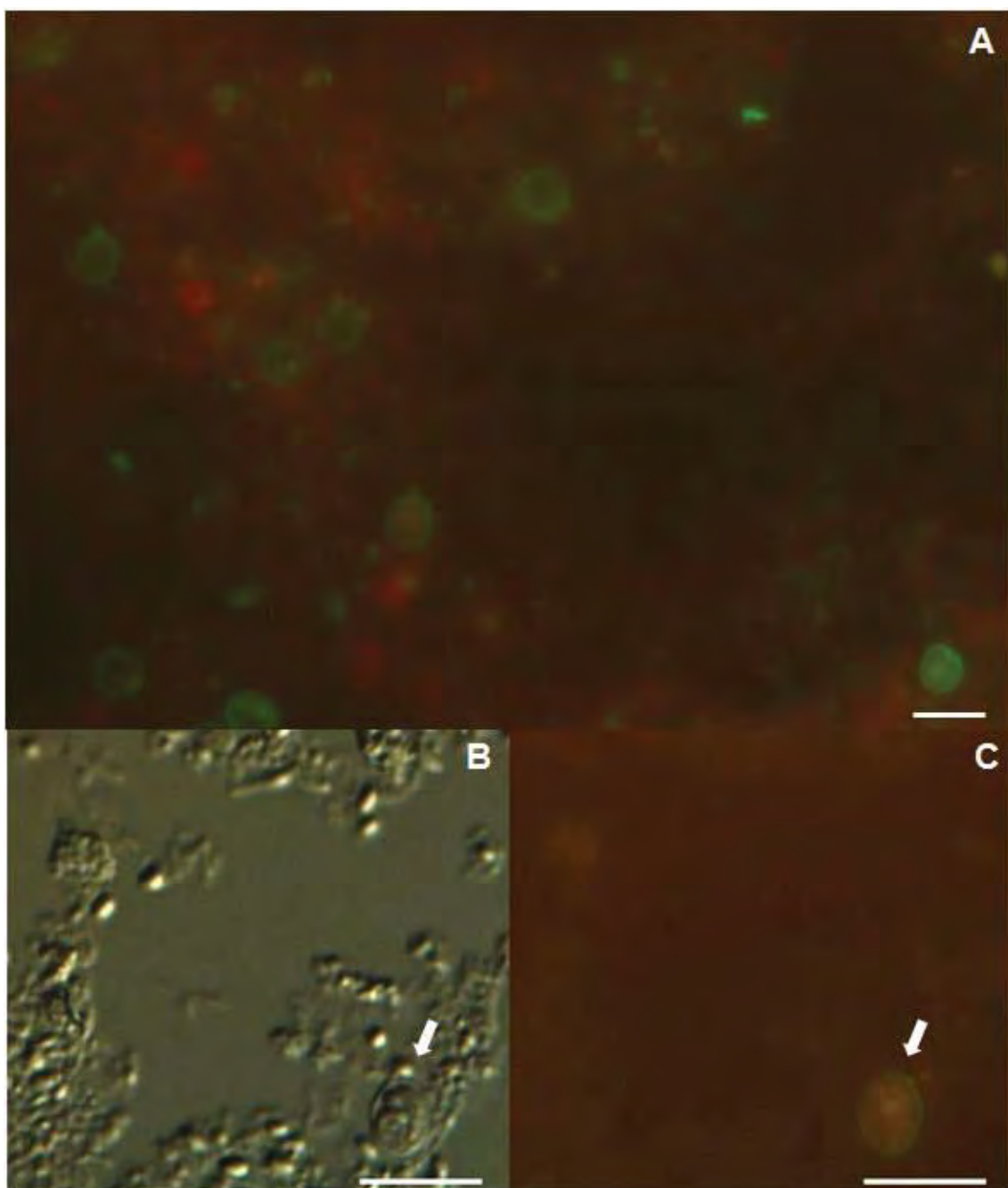


Figura 3. Oocistos de *C. serpentis*. A: imunofluorescência direta. B: Contraste diferencial de fase C: Imunofluorescência direta, mesmo campo de microscopia em B (barra: 10 μ m).

DISCUSSÃO

O volume da fração IgG do coelho A foi maior que a do coelho B, isto pelo fato do pico de eliminação de IgG no processo de purificação da fração gamaglobulínica do coelho A ter sido maior que o pico de eliminação de IgG da fração gamaglobulínica do coelho B, aumentando o tempo do procedimento e

resultando em maior diluição da amostra em tampão Tris HCL 0,025M pH 8,8, em decorrência da maior concentração protéica da fração gamaglobulínica do coelho A.

As inoculações pelas vias intradérmica e intramuscular com solução de oocistos íntegros de *C. parvum* foram realizadas com o intuito de promover a produção de anticorpos contra antígenos existentes na parede dos oocistos. Esta ligação pode ser comprovada na realização da IFD, quando foi observado que a fluorescência dos oocistos emanava a partir das suas paredes, não sendo testada neste estudo a afinidade dos anticorpos anti-*C. parvum* por estruturas internas dos oocistos.

O conjugado foi utilizado na diluição de 1:80 (em PBS pH 7,4), com bons níveis de fluorescência dos oocistos, ocorrendo diminuição de fluorescência apenas na diluição 1:100. Stibbs e Ongerth (1986), ao padronizar o ensaio de imunofluorescência indireta (IFI), para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de macacos e humanos, obtiveram melhores resultados quanto à fluorescência dos oocistos nas diluições do conjugado de 1:20, 1:40 e 1:60 (em PBS pH 7,6), diminuindo consideravelmente na diluição 1:80.

O conjugado na diluição 1:80 possibilitou, com um volume de apenas 1µL, a realização da IFD, em duplicata, em 1,6 amostras de fezes de bezerros. Ou seja, com 12mL de conjugado anti-*C. parvum*, produzidos a partir de 15mL de amostra da fração IgG do coelho A, poderão ser realizadas análises, em duplicata, de 19.200 amostras, o que diminui consideravelmente o custo deste procedimento em comparação ao custo de utilização de kits comerciais.

A ausência de reatividade cruzada dos anticorpos policlonais utilizados neste estudo, com outros agentes etiológicos, corrobora os resultados obtidos por Graczyk et al. (1996) que, ao verificar a especificidade do anticorpo monoclonal utilizado no kit de IFD Merifluor *Cryptosporidium/Giardia*® (Meridian Diagnostics, Cincinnati, EUA), para detecção de *Cryptosporidium*, não constataram reatividade cruzada com amostras contendo ovos de oito espécies de helmintos, de três espécies de *Eimeria*, esporocistos de *Sarcocystis cruzi* e dois isolados de *Candida* sp. Esses mesmos autores também testaram a presença de reatividade cruzada com outras espécies de *Cryptosporidium* (*C. serpentis*, *C. meleagridis*, *C. wrairi*, *C. muris* e *C. muris-like*), verificando reatividade cruzada com todas as espécies testadas, dados também semelhantes ao presente estudo, onde o conjugado apresentou reatividade cruzada com *C. serpentis* e *C. andersoni*.

Stibbs e Ongerth (1986) não observaram ligação inespecífica dos anticorpos policlonais anti-*Cryptosporidium* sp., quando testados contra *Candida albicans*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia* sp., *Entamoeba* sp. e *Blastocystis hominis*. No entanto, ocorreu ligação inespecífica dos anticorpos anti-*Cryptosporidium* com oocistos de *Eimeria* sp. e *Caryospora*, o que não ocorreu com nenhum dos agentes etiológicos testados no presente estudo.

CONCLUSÕES

A produção do conjugado anti-*C. parvum* contendo anticorpos produzidos em coelho foi bem sucedida, sendo possível a padronização da IFD para detecção de oocistos de *C. parvum* em fezes.

Não foi observada reatividade cruzada entre o conjugado produzido com *Escherichia coli*, *Eimeria* sp. e *Candida* sp.

O conjugado anti-*C. parvum* apresentou reatividade cruzada com *C. andersoni* e *C. serpentis*, o que possibilita sua utilização para detecção de oocistos de outras espécies de *Cryptosporidium* em amostras fecais.

Agradecimentos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – auxílio pesquisa – processo número 2008/57380-1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLES, A.J., WALDRON, M.A., SIERRA, L.S., MATTIA, A.R. Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1632–1634, 1995.

ARROWOOD, M.J., DONALDSON, K. Improved purification methods for cow derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 43, p. 89, 2002.

ARROWOOD, M.J., STERLING, C.R. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocysts detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p.1490-1495, 1989.

ARROWOOD, M.J., STERLING, C.R., HEALEY, M.C. Immunofluorescent microscopical visualization of trails left by gliding *Cryptosporidium parvum* sporozoites. **Journal of Parasitology**, v. 77, p. 315-317, 1991.

BIALEK, R., BINDER, N., DIETZ, K., JOACHIM, A., KNOBLOCH, J., ZELCK, U. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, p.283-288, 2002.

CARVALHO, T.T.R. Estado atual do conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, p. 1-16, 2009.

CORTHIER, G., BOSCHETTI, E., CHARLEY-POULAIN, J. Improved method for the IgG purification from various animals' species by ion exchange chromatography. **The Journal of Immunological Methods**, v. 66, p. 75-79, 1984.

FAYER, R., MORGAN, U., UPTON, S. J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification. **Journal of Parasitology**, v. 30, p. 12-13, 2000.

FEITOSA, F.L.F., SHIMAMURA, G.M., MENDES, L.C.N., PEIRÓ, J.R., FÉRES, F.C., BOVINO, F., PERRI, S.H.V., MEIRELES, M.V. Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarreia em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 452-456, 2008.

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

HEINE, J., POHLENZ, J.F.L., MOON, H.W. Enteric Lesions and Diarrhea in Gnotobiotic Calves Monoinfected with *Cryptosporidium* Species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 150, p. 768-775, 1984.

HERBERT, G.A., PELHAM, P.L., PITTMAN, B. Determination of the optimal ammonium sulfate. **Applied Microbiology**, v. 25, p. 26-36, 1973.

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

JOHNSTON, S.P., BALLARD, M.M., BEACH, M.J., CAUSER, L., WILKINS, P.P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 623-626, 2003.

MELONI, B.P., THOMPSON, R.C.A. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. **Journal of Parasitology**, v. 82, p. 757-762, 1996.

PLATT, J. L., MICHAEL, A. F. Retardation of fading and enhancement of intensity of immunofluorescence by p-phenylenediamine. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 31, p. 840–842, 1983.

SANFORD, S. A., JOSEPHSON, G. K. A. Bovine cryptosporidiosis : clinical and pathological findings in forty-two scouring neonatal calves. **Canadian Veterinary Journal**, v.23, p. 243-47, 1982.

SMITH, H.V., CAMPBELL, B.M., PATON, C.A., NICHOLS, R.A.B. Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in water concentrates determined by using 4,6-Diamidino-2-Phenylindole and immunofluorescence microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5198-5201, 2002.

STIBBS, H.H., ONGERTH, J.E. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, p. 517-521, 1986.

UGA, S., MATSUO, J., KONO, E., KIMURA, K., INOUE, M., RAI, S.K., ONO, K. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocyst shedding in calves in Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 27-32, 2000.

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

CAPÍTULO 3 - DIAGNÓSTICO DE CRIPTOSPORIDIOSE EM AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA E MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE

Weslen F. P. Teixeira¹, Willian M. D. Coelho², Ricardo V. G. de Soutelo³, Fernando P. de Oliveira³, Camila G. Homem¹, Cáris M. Nunes⁴, Marcelo V. Meireles^{4*}

²Curso de Medicina Veterinária - FCAV - UNESP - Jaboticabal, SP. ³Curso de Medicina Veterinária - FCAA - Andradina, SP. ¹Curso de Medicina Veterinária - FOA-UNESP - Araçatuba, SP, Rua Clóvis Pestana, 793 16050-680 -Araçatuba, SP

RESUMO - O presente estudo teve como objetivo comparar as técnicas de Imunofluorescência direta (IFD) e a microscopia com contraste de fase em solução de Sheather (MCF), para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de bezerros. A comparação entre o limiar de detecção da IFD e a MCF foi realizada utilizando cinco alíquotas de uma amostra fecal de bezerro, comprovadamente negativa para *Cryptosporidium* spp., adicionadas com diferentes quantidades de oocistos de *Cryptosporidium parvum* e, posteriormente, submetidas às duas técnicas de diagnóstico. Foi também realizada a comparação entre a positividade obtida pela IFD e MCF em 300 amostras fecais de bezerros. Em todas as amostras positivas foi realizada uma análise semi-quantitativa do número de oocistos observados por campo de microscopia. A IFD e a MCF apresentaram, respectivamente, limiar de detecção de 10^4 e 10^5 oocistos em 3 g fezes. Entre as 300 amostras, 19,67% (59/300) foram positivas pela IFD, com diferença estatisticamente significativa ($p=0.0098$) quando comparada com a positividade obtida pela MCF, que foi de 11,67% (35/300), comprovando que a IFD foi mais eficiente que a MCF para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais de bezerros.

Palavras chave: anticorpo, bezerros, criptosporidiose, diagnóstico.

ABSTRACT - This study aimed to compare the direct immunofluorescence assay (DIF) and the phase contrast microscopy in Sheather solution (PCM) for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples of calves. The comparison between the threshold of detection of DIF and PCM was performed using five aliquots of a fecal sample of a calf negative for *Cryptosporidium* spp. oocysts, spiked

with different amounts of *C. parvum* oocysts and subsequently submitted to both diagnostic methods. Another analysis was accomplished to compare the positivity obtained by DIF and PCM in 300 fecal samples from calves. A semi-quantitative analysis of the number of oocysts per field of microscopy was accomplished in all positive samples. The DIF and MCF showed respectively, detection threshold of 10^4 and 10^5 oocysts in 3 g of fecal sample. Among the 300 samples analyzed, 19.67% (59/300) were positive by DIF, result that was statistically significant ($p = 0.0098$) when compared with the positivity obtained by the PCM, which was 11.67 % (35/300), indicating that the DIF was more effective than PCM in the detection of *Cryptosporidium* in fecal samples of calves.

Keywords: antibodies, calves, cryptosporidiosis, diagnosis.

INTRODUÇÃO

Parasitos do gênero *Cryptosporidium* são coccídios reconhecidos como importantes patógenos causadores de diarreia em vertebrados, incluindo bovinos e o homem (FAYER et al. 2000). Em bovinos, os bezerros neonatos são mais suscetíveis à infecção clínica, sendo os animais adultos acometidos por infecções de natureza assintomática ou associadas a sintomas clínicos de pouca gravidade (O'DONOGHUE, 1995). Os bovinos pode ainda atuar como reservatórios de *Cryptosporidium parvum*, espécie que apresenta potencial zoonótico (FAYER et al. 2000).

Em pesquisas realizadas no Brasil, utilizando amostras fecais de bovinos de até 90 dias de idade, foi constatada ocorrência de *Cryptosporidium* sp. de 0,6 a 72,13% (GARCIA; LIMA, 1994; SOUZA; LOPES, 1995; FEITOSA et al. 2004; CARDOSO et al. 2008), em muitos casos com presença de diarreia, associada ou não a outros agentes etiológicos (SOUZA; LOPES, 1995; LANGONI et al. 2004; OLIVEIRA-FILHO et al. 2007; CARDOSO et al. 2008; FEITOSA et al. 2008).

Inúmeros métodos foram desenvolvidos para diagnóstico de criptosporidiose, sendo as técnicas que envolvem a detecção direta do parasito por observação microscópica as mais comumente utilizadas na rotina laboratorial (JEX et al. 2008). No entanto, essas técnicas podem apresentar resultados falso-positivos (CASEMORE, 1991), baixa sensibilidade (ARROWOOD; STERLING, 1989; CASEMORE, 1991), além de promoverem alterações na morfologia e morfometria dos oocistos (MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992).

O objetivo deste experimento foi comparar a técnica de imunofluorescência direta (IFD), realizada com conjugado contendo anticorpos policlonais anti-*C. parvum*, e a microscopia com contraste de fase em solução de Sheather (MCF) para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros com faixa etária entre uma semana e quatro meses de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

O limiar de detecção da IFD e da MCF foi determinado a partir de uma amostra fecal não diarreica de um bezerro com quatro meses de idade, comprovadamente negativa para *Cryptosporidium* sp., por meio de MCF e da reação em cadeia da polimerase (nested PCR) para amplificação de fragmentos da subunidade 18S do RNA ribossômico (XIAO et al. 2000). Foram preparadas cinco alíquotas de 3 g, adicionadas de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 oocistos de *C. parvum* e posteriormente submetidas à centrífugo-sedimentação em água éter (MELONI; THOMPSON, 1996). A partir de cada alíquota foram feitas dez lâminas: cinco para exame por IFD e cinco para MCF. Em cada lâmina foram visualizados 80 campos de microscopia (aumento de 400x), totalizando 400 campos por alíquota.

Também foi realizada a comparação da positividade para oocistos de *Cryptosporidium* spp., obtida pela IFD e MCF, em 300 amostras fecais de bezerros, com faixa etária de 1 semana a 4 meses de idade, provindas de 37 propriedades leiteiras dos municípios de Araçatuba, Pereira Barreto e Suzanápolis, região noroeste do estado de São Paulo, submetidas à centrífugo-sedimentação em água/éter e divididas em duas alíquotas, uma diluída em formol tamponado 10% (proporção de 1:3), para ser utilizada na IFD, e a outra em bicromato de potássio 5% (proporção de 1:3), utilizada na MCF, ambas armazenadas a 4°C, até o momento da análise.

As lâminas utilizadas para IFD foram previamente tratadas com polilisina (Sigma, Saint Louis, EUA), diluída na proporção de 1:20, em água deionizada (ARROWOOD et al. 1991). Sobre a lâmina foram adicionados 25µL da amostra diluída em formol, deixando secar totalmente em temperatura ambiente. Após, foram adicionados 25µL do conjugado composto por IgG policlonal de coelho anti-*C. parvum* (produzido no laboratório de Ornitopatologia da UNESP, campus de Araçatuba, SP) diluído na proporção de 1:80 em PBS 0,01M, pH 7,2 e 4,6-diamidino-2-phenilindole - DAPI (Sigma, Saint Louis, EUA), (50µL de DAPI a 2mg/mL para

50mL de PBS 0,01M, pH 7,2), com incubação da lâmina a 37°C, por 30min, em câmara úmida. Ao término da incubação, foi realizada uma lavagem com PBS 0,01M, pH 7,2, finalizando a montagem com uma lamínula sobre 25µL do tampão de montagem (glicerol 90% em PBS 0,01M, pH 7,2; p-phenylenediamine a 0,1mg/ml (Sigma, Saint Louis, EUA). A leitura da reação foi feita em um microscópio Olympus BX-50, com lâmpada de mercúrio de 100 W, filtros U-MWU2 (DAPI) e U-MWU2-B (fluoresceína), em aumento de 400x.

Para preparação das lâminas utilizadas na MCF os sedimentos fecais foram lavados por centrifugação com água deionizada, para retirada do bicromato de potássio, e posteriormente diluídos em água deionizada, na proporção de 1:3. Sobre a lâmina foram adicionados 25µL da amostra e 25µL de solução de Sheather, homogeneizando e finalizando a montagem com uma lamínula. A leitura da reação foi realizada em um microscópio Olympus BX-50, com objetiva de contraste de fase, em aumento de 400x.

Ambas as reações (IFD e MCF) foram realizadas em duplicata, com observação de 400 campos de microscopia por lâmina, sendo que a positividade das amostras fecais foi confirmada por observação em microscopia com contraste diferencial de fase ou com visualização após coloração com DAPI (SMITH et al. 2002). Em todas as amostras positivas na IFD e MCF foram realizadas análises semi-quantitativas do número de oocistos observados por campo de microscopia, segundo protocolo descrito por Féres et al. (2009), com algumas modificações: escore 1: 1 a 10 oocistos por lâmina; escore 2: 1 a 5 oocistos por campo; escore 3: 5 a 20 oocistos por campo e escore 4: acima de 21 oocistos por campo (aumento de 400x).

Para identificação das espécies de *Cryptosporidium* presentes nas amostras fecais dos bezerros naturalmente infectados, todas as amostras positivas pela microscopia foram submetidas à extração de DNA (MEIRELES et al. 2007) para realização da reação em cadeia de polimerase tipo *nested* (nPCR), na qual foram utilizados *primers* específicos para a sequência da subunidade 18S do gene do RNA ribossômico (XIAO et al. 2000) e sequenciamento dos fragmentos amplificados. Em todas as reações utilizou-se água ultrapura, como controle negativo, e DNA de *Cryptosporidium galli*, como controle positivo.

Foi calculado o intervalo de confiança do número de oocistos de *C. parvum* encontrados nas lâminas de IFD e MCF, preparadas a partir das cinco alíquotas adicionadas de oocistos. Para determinação da significância estatística dos

resultados de positividade e número de oocistos observados nas diferentes alíquotas, quando submetidas às duas técnicas de diagnóstico, foram utilizados, respectivamente, teste exato de Fisher e teste t de student. O teste de Qui-Quadrado (χ^2) foi aplicado para verificar a significância estatística entre a positividade obtida pela IFD e MCF em amostras fecais de bezerros naturalmente infectados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A MCF é pouco utilizada para pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais, apesar de ser considerado um método rápido e eficiente e não promover alterações na morfologia e morfometria dos oocistos, que podem observadas em técnicas de coloração (WILSON; ACRES, 1982; MEIRELES; FIGUEIREDO, 1992), que apresentam ainda as desvantagens de baixa sensibilidade e de eventuais resultados falso-positivos (CASEMORE, 1991; WEBER et al. 1991). Devido a essas características, foi realizada sua comparação com a IFD, que apresenta melhor sensibilidade e especificidade que as técnicas convencionais de visualização microscópica de oocistos (STIBBS; ONGERTH, 1986; ARROWOOD; STERLING, 1989; WEBER et al. 1991; ALLES et al. 1995).

A MCF apresentou pior limiar de detecção e menor positividade que a IFD, respectivamente em alíquotas fecais inoculadas com oocistos de *C. parvum* e em amostras de bezerros naturalmente infectados. Com utilização da IFD e MCF foi possível obter positividade, respectivamente, em 40% (2/5) das lâminas contendo 10^4 e em 20% (1/5) das lâminas contendo 10^5 oocistos de *C. parvum*, em 3 g de fezes. Os valores de porcentagem de lâminas positivas, o número de oocistos encontrados e o intervalo de confiança, obtidos pela IFD e a MCF nas alíquotas fecais inoculadas com oocistos de *C. parvum*, estão descritos na Tabela 1.

As técnicas mais utilizadas para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais são as de Kinyoun e Ziehl Neelsen modificada, porém apresentam baixa sensibilidade, conforme demonstrado por Weber et al. (1991), que relataram 100% de detecção de oocistos de *C. parvum* na presença de 5×10^5 e 5×10^4 oocistos por grama de fezes humanas não diarréicas, respectivamente com a utilização da técnica de Kinyoun e pela imunofluorescência indireta. Na presente pesquisa, a MCF e a IFD apresentaram 100% de detecção em amostras contendo respectivamente 10^6 e 10^5 oocistos presentes em três gramas de fezes não

diarréicas, ou seja, $3,3 \times 10^5$ e $3,3 \times 10^4$ oocistos por grama de fezes, respectivamente para MCF e IFD (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de positividade e média e total de oocistos observados e intervalo de confiança calculado para as cinco repetições de cada alíquota de amostras fecais adicionadas de oocistos, em lâminas examinadas por imunofluorescência direta (IFD) e microscopia em contraste de fase (MCF).

Nº de oocistos	Técnica de diagnóstico							
	IFD				MCF			
	Positividade %	Média de oocistos	Total de oocistos	IC	Positividade %	Média de oocistos	Total de oocistos	IC
$*10^6$	100 (5/5)	36,8	184	3,44	100 (5/5)	7,2	36	1,03
$*10^5$	100 (5/5)	6,4	32	1,41	20 (1/5)	0,2	1	0,54
$*10^4$	40 (2/5)	0,4	2	0,68	0 (0/5)	0	0	-
10^3	0 (0/5)	0	0	-	0 (0/5)	0	0	-
10^2	0 (0/5)	0	0	-	0 (0/5)	0	0	-

* Apresenta diferença estatisticamente significativa entre o número de oocistos encontrados na IFD e na MCF ($p < 0.0001$), pelo teste t, e entre a positividade obtida na IFD e na MCF ($p < 0,05$), pelo teste de Fisher. IC: Intervalo de Confiança com nível de significância de 95%.

Na Tabela 2 está relacionado o resultado da pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium*, utilizando a IFD e MCF, em amostras de fezes de bezerros naturalmente infectados. Foi observado que em 59,32% (35/59) houve positividade nas duas técnicas (MCF e IFD), sendo que 40,68% (24/59) das amostras foram positivas apenas pela IFD, o que demonstra que a imunofluorescência de fato apresenta maior sensibilidade que técnicas não imunológicas de visualização microscópica (ALLES et al. 1995; JOHNSTON et al. 2003).

Por meio da nPCR e sequenciamento dos fragmentos amplificados foi constatada a presença de *Cryptosporidium andersoni* em 11,87% (7/59) e de *C. parvum* em 88,13% (52/59) das amostras positivas. Diversos autores também relataram que *C. parvum* é a espécie mais frequentemente encontrada em bezerros nos primeiros meses de vida (GEURDEN et al. 2006; COKLIN et al. 2009; KESHAVARZ et al. 2009).

As amostras que continham oocistos de *C. andersoni* foram positivas somente pela IFD, o que sugere que a visualização de oocistos de *C. andersoni* em solução

de Sheather é menos eficiente para diagnóstico desta espécie do que para o diagnóstico de *C. parvum*, conforme demonstrado por Kvác et al. (2003).

Tabela 2. Pesquisa de *Cryptosporidium* sp. em amostras de fezes de bezerros naturalmente infectados utilizando as técnicas de Imunofluorescência direta (IFD) e microscopia em contraste de fase (MCF).

Técnicas de diagnóstico	Amostras positivas (%)	Amostras negativas (%)
IFD	19,67 (59/300)a	80,33 (241/300)a
MCF	11,67 (35/300)b	88,33 (265/300)b

Valores na mesma coluna com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ($p < 0.05$).

Os resultados da análise semi-quantitativa dos oocistos de *C. parvum*, presentes nas lâminas simultaneamente positivas na MCF e IFD, estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3. Análise semi-quantitativa* de oocistos de *C. parvum* presentes nas 35 amostras simultaneamente positivas pela microscopia com contraste de fase em solução de Sheather (MCF) e imunofluorescência direta (IFD).

		MCF				
		escore 1	escore 2	escore 3	escore 4	Total
IFD	escore 1	8,57 (3)**	-	-	2,86 (1)	11,43 (4)
	escore 2	11,43 (4)	11,43 (4)	-	-	22,86 (8)
	escore 3	8,57 (3)	20 (7)	2,86 (1)	-	31,43 (11)
	escore 4	-	17,14 (6)	11,43 (4)	5,71 (2)	34,28 (12)
	Total	28,57 (10)	48,57 (17)	14,29 (5)	8,57 (3)	100 (35)

* Escore 1: 1 a 10 oocistos por lâmina; escore 2: 1 a 5 oocistos por campo em aumento de 400x; escore 3: 5 a 20 oocistos por campo em aumento de 400x e escore 4: acima de 21 oocistos por campo em aumento de 400x.

** % (número de amostras positivas).

Na comparação dos escores de oocistos, observou-se que a IFD possibilitou a detecção de um maior número de oocistos por campo que a MCF. A análise semi-quantitativa dos oocistos de *C. andersoni* e *C. parvum*, presentes nas lâminas que foram positivas somente pela IFD, está descrita na Tabela 4.

Tabela 4. Análise semi-quantitativa* de oocistos de *C. parvum* e *C. andersoni* presentes nas 24 amostras positivas somente pela imunofluorescência direta (IFD).

Espécies	IFD				Total
	escore 1	escore 2	escore 3	escore 4	
<i>C. andersoni</i>	8.57 (4/7)**	-	28.57 (2/7)	14.28 (1/7)	100 (7/7)
<i>C. parvum</i>	88.23 (15/17)	5.88 (1/17)	5.88 (1/17)	-	100 (17/17)
Total	79.16 (19/24)	4.17 (1/24)	12.50 (3/24)	4.17 (1/24)	100 (24/24)

* Escore 1: 1 a 10 oocistos por lâmina; escore 2: 1 a 5 oocistos por campo em aumento de 400x; escore 3: 5 a 20 oocistos por campo em aumento de 400x e escore 4: acima de 21 oocistos por campo em objetiva de 400x.

** % (número de amostras positivas/número amostras positivas para *C. andersoni* ou *C. parvum*).

Nas amostras de bezerros naturalmente infectados foi obtida, pela MCF, maior positividade naquelas que continham maiores escores de oocistos (Tabela 3), fato que não se repetiu nas lâminas com menores escores, nas quais a IFD apresentou maior positividade (Tabelas 3 e 4).

CONCLUSÕES

A IFD apresentou melhor limiar de detecção que a MCF, tanto em amostras inoculadas com oocistos como em amostras de bezerros naturalmente infectados.

A MCF pode ser utilizada para diagnóstico de criptosporidiose em amostras com grande quantidade de oocistos, por ser de baixo custo, rápida e de fácil visualização do parasito. No entanto, em amostras com pequena quantidade de oocistos é recomendada a utilização da IFD, por apresentar melhor limiar de detecção, evitando assim, a ocorrência de diagnóstico falso-negativo.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – auxílio pesquisa – processo número 2008/57380-1

REFERÊNCIAS

ALLES, A.J., WALDRON, M.A., SIERRA, L.S., MATTIA, A.R. Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1632–1634, 1995.

ARROWOOD, M.J., STERLING, C.R. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. **Journal Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1490-1495, 1989.

ARROWOOD, M.J., STERLING, C.R., HEALEY, M.C. Immunofluorescent microscopical visualization of trails left by gliding *Cryptosporidium parvum* sporozoites. **Journal of Parasitology**, v. 77, p. 315-317, 1991.

CARDOSO, J.M.S., SILVEIRA, F.L., ARAÚJO, A.J.U.S., CARVALHO, J.C.C., KANAMURA, H.Y. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em um rebanho bovino leiteiro no município de Caçapava, estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, supl. 1, p. 239-242, 2008.

CASEMORE, D.P. Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 44, p. 445-451, 1991.

COKLIN, T., UEHLINGER, F.D., FARBER, J.M., BARKEMA, H.W., O'HANDLEY, R.M., DIXON, B.R. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy calves from 11 farms in Prince Edward Island, Canada. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.3-4, p.323-326, 2009.

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

FEITOSA, L.F.F., SHIMAMURA, G.M., ROBERTO, T., MEIRELES, M.V., NUNES, C.M., CIARLINI, P.C., BORGES, A.S. Prevalência da criptosporidiose em bezerros na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, p.189-193, 2004.

FEITOSA, F.L.F., LOMBARDI, A.L., CARVALHO, M.P.P., MENDES, L.C.N., PEIRÓ, J.R., FÉRES, F.C., BOVINO, F., PERRI, S.H.V., MEIRELES, M.V. Importância de *Cryptosporidium* spp. como causa de diarreia em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 452-456, 2008.

FÉRES, F.C., LOMBARDI, A.L., CARVALHO, M.P.P., MENDES, L.C.N., PEIRÓ, J.R., CADIOLI, F.A., MEIRELES, M.V., PERRI, S.H.V., FEITOSA, F.L.F. Ocorrência e caracterização molecular de *Cryptosporidium* em cordeiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.1002-1005, 2009.

GARCIA, A.M E LIMA, J.D. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em rebanhos leiteiros de Pará de Minas (MG) e sua relação com práticas de manejo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3 n.1 p. 23-28, 1994.

GEURDEN, T., GOMA, F.Y., SIWILA, J., PHIRI, I.G.K., MWANZA, A.M., CLAEREBOU, E., VERCROYSE, J. Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. **Veterinary Parasitology**, v.138, n.3-4, p.217-222, 2006.

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

JOHNSTON, S.P., BALLARD, M.M., BEACH, M.J., CAUSER, L., WILKINS, P.P. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium*

organisms in fecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p. 623-626, 2003.

KESHAVERZ, A., HAGHIGHI, A., ATHARI, A., KAZEMI, B., ABADI, A., MOJARAD, E.N. Prevalence and molecular characterization of bovine *Cryptosporidium* in Qazvin province, Iran. **Veterinary Parasitology**, v.160, n.3-4, p.316-318, 2009.

KVÁC, M., KVETONOVÁ, D., PUZOVÁ, G., DITRICH, O. Comparison of selected diagnostic methods for identification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* in routine examination of faeces. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 50, p. 405-411, 2003.

LANGONI, H., LINHARES, A.C., AVILA, F.A., SILVA, A.V., ELIAS, A.O. Contribuição ao estudo da etiologia das diarréias em bezerros de aptidão leiteira no Estado de São Paulo, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 313-319, 2004.

MEIRELES, M.V., FIGUEIREDO, P.C. Isolamento e identificação do *Cryptosporidium baileyi* Current et al, 1986 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em frangos de corte. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1, p. 125-130, 1992.

MEIRELES, M.V., SOARES, R.M., BONELLO, F., GENNARI, S.M. Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.147, p.166-170, 2007.

MELONI, B.P., THOMPSON, R.C.A. Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* in vitro. **Journal of Parasitology**, v. 82, n., p. 757-762, 1996.

O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p.139-95, 1995.

OLIVEIRA-FILHO, J.P., SILVA, D.P.G., PACHECO, M.D., MASCARINI, L.M., RIBEIRO, M.G., ALFIERI, A.A., ALFIERI, A.F., STIPP, D.T., BARROS, B.J.P.,

BORGES, A.S. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 419-424, 2007.

SMITH, H.V., CAMPBELL, B.M., PATON, C.A., NICHOLS, R.A.B. Significance of enhanced morphological detection of *Cryptosporidium* sp. oocysts in water concentrates determined by using 4,6-Diamidino-2-Phenylindole and immunofluorescence microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5198-5201, 2002.

SOUZA, J.C.P., LOPES, C.W.G. Criptosporidiose em bezerros de rebanhos da bacia leiteira Sul- Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, p. 33-36, 1995.

STIBBS, H.H., ONGERTH, J.E. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Fecal Smears. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, p. 517-521, 1986.

WEBER R., BRYAN, R.T., BISHOP, H.S., WAHLQUIST, S.P., SULLIVAN, J.J., JURANEK, D.D. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: Evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 1323-1327, 1991.

WILSON, D.W., ACRES, S.D. A comparison of dichromate solution flotation and fecal smears for diagnosis of cryptosporidiosis in calves. **Canadian Veterinary Journal**, v. 23, p. 240-246, 1982.

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.