UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Padronização e avaliação do método sorológico ELISA, para
detecção de anticorpos IgG anti- *Cryptosporidium* sp

Angélica Maria Casimiro

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientadora:

Prof^a Dr^a Hermínia Yohko Kanamura

São Paulo
2003

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

C339p Casimiro, Angélica Maria
Padronização e avaliação do método sorológico ELISA,
para detecção de anticorpos IgG anti- *Cryptosporidium sp* /
Angélica Maria Casimiro. -- São Paulo, 2003.
60p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Kanamura, Hermínia Yohko

1. Criptosporidiose 2. Parasitologia médica 3. Teste
imunoenzimático : ELISA : Medicina I. T. II. Kanamura,
Hermínia Yohko, orientador.

616.936 CDD

Angelica Maria Casimiro

Padronização e avaliação de métodos sorológicos ELISA, para detecção de anticorpos IgG anti- *Cryptosporidium* sp

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a Dr^a Hermínia Yohko Kanamura
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2003.

Trabalho realizado na Seção de Enteroparasitoses do
Serviço de Parasitologia da Divisão de Biologia
Médica do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, SP.

Apoio Financeiro:
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São
Paulo (FAPESP).
Bolsa Mestrado CAPES

“Por mais sábio que o homem possa ser
ele ainda terá muito que aprender com a
natureza e com os animais.”

(Autor desconhecido)

Dedico este trabalho

Aos meus pais, José e Nailde que foram responsáveis pela
minha formação acadêmica e pelo carinho e incentivo.

Ao Ricardo, meu companheiro e esposo pelo apoio
e compreensão ao longo deste trabalho.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Hermínia Yohko Kanamura, pela orientação.

À Profa. Dra. Solange Maria Genari, e seus funcionários do Laboratório de Parasitologia (VPS), da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da USP, por ter cedido o espaço no biotério para infecção dos bezerros e pelo grande apoio técnico.

Ao Pesquisador Paulo Nakamura, do Laboratório de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz pelo auxílio na execução do ensaio ELISA, meu muito obrigado.

À Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro, do Instituto de Medicina Tropical pelos ensinamentos. Agradeço também aos colegas Elizabeth, Guita, Dr. Ângelo pelo incentivo. E a Dra. Nazaré Fonseca de Souza pela amizade e grande apoio no início do trabalho.

Aos pesquisadores e técnicos da Seção de Enteroparasitoses do Instituto Adolfo Lutz, Domingas Torres, Cybele, Therezinha, Ana Célia, Dra. Vera, Silvia, Maria Trajano, Celma, Yone, Nana, Ivete e Carmen pelo convívio e pelo apoio.

Aos pesquisadores da Seção de Parasitose Sistêmica Áurea e Mário, e a funcionária Rosangela pelo apoio técnico e pela amizade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Pedro Luís da Silva Pinto e Profa. Dra. Adelaide José Vaz pelas sugestões apresentadas no exame de qualificação.

Aos professores suplentes, Dra. Suzana A. Zevallos Lescano e Dr. Pedro Paulo Chieffi do Instituto de Medicina Tropical pela atenção e por suas valiosas sugestões.

Aos amigos, Cláudio, Matheus, Edward, Paulo Henrique, Elenice, Mônica pelo apoio e convívio.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,

Meus sinceros agradecimentos.

Índice

Lista de abreviaturas.....	I
Lista de Quadros, Tabelas e Figuras.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Introdução.....	1
Justificativa.....	14
Objetivos.....	15
Material e Métodos.....	16
Processamento das amostras de sangue.....	17
Processamento das amostras de fezes.....	17
Obtenção de oocistos de <i>Cryptosporidium parvum</i>	17
Recuperação dos oocistos.....	18
Preparo do antígeno.....	21
Dosagem de Proteínas.....	22
Técnicas sorológicas.....	22
Padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos anti- <i>Cryptosporidium</i> sp.....	22
Avaliação da reatividade dos soros com a técnica de ELISA para pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	23
Padronização da absorção de anticorpos anti- <i>Cryptosporidium</i>	24

Resultados	25
Exame parasitológico de fezes	25
Recuperação dos oocistos a partir das fezes de bezerro	25
Padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos anti- <i>Cryptosporidium</i> sp.	25
Titulação do antígeno	25
Avaliação do ELISA com diferentes grupos de soros	26
ELISA para pesquisa de anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	26
Comparação da positividade entre os testes de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Cryptosporidium</i> e anti- <i>Toxoplasma</i>	26
Reprodutibilidade do teste ELISA	27
Padronização da absorção de anticorpos IgG anti- <i>Cryptosporidium</i>	27
Discussão	36
Conclusões	43
Referências bibliográficas	44
Anexos	56

Lista de Abreviaturas

DBS - Doadores do Banco de Sangue

FLP - Funcionários que trabalham no laboratório de Parasitologia

ELISA - Enzyme –linked immunosorbent assay, ensaio imunoenzimático

HIV - Pacientes soropositivos para o vírus HIV

kDa - Kilodalton

mL - Mililitro

nm - Nanômetro

OPD - Ortofenilenodiamina

pH - Concentração hidrogênio-iônica

PPN - Pacientes submetidas ao Pré-Natal

STF - Solução salina tamponada com fosfatos

STF-L - Solução salina tamponada com fosfatos e leite desnatado

STF-T - Solução salina tamponada com fosfatos e Tween 20

Tween - Polioxietileno sorbitol monolairato

µg - Microgramas

µL - Microlitros

Lista de Quadros, Tabelas e Figuras

Quadro 1. Resultados da comparação entre técnicas de purificação utilizando diferentes gradientes para obtenção de oocistos de <i>C. parvum</i> e avaliação do número de oocistos recuperados em cada técnica.....	28
Quadro 2. Leituras de D.O. antes e após absorção com antígeno de <i>Cryptosporidium</i> no teste ELISA com diferentes amostras positivas.....	35
Tabela 1. Titulação do antígeno: Leituras de D.O. no ELISA de acordo com a quantidade de antígeno (proteínas) por orifício e diluição do soro controle positivo (P) e negativo (N).....	29
Tabela 2. Positividade para anticorpos IgG anti- <i>Cryptosporidium</i> obtidos no teste de ELISA em diferentes grupos de soros.....	30
Tabela 3. Positividade para anticorpos IgG anti- <i>Cryptosporidium</i> obtidos no teste de ELISA em amostras soropositivas para outras parasitoses.....	30
Tabela 4. Positividade para anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma</i> obtidos no teste de ELISA em diferentes grupos (LR= 0,143).....	31
Tabela 5. Comparação de resultados entre os testes de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>Cryptosporidium</i> e anti- <i>Toxoplasma</i> em amostras de soro de funcionários do Laboratório de Parasitologia.....	31
Tabela 6. Comparação de resultados entre os testes de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti- <i>Cryptosporidium</i> e anti- <i>Toxoplasma</i> em amostras de soro de pacientes soropositivos para HIV.....	32

Tabela 7. Comparação de resultados entre os testes de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* e anti-*Toxoplasma* em amostras de soro de pacientes que fizeram o Pré-Natal.....32

Tabela 8. Comparação de resultados entre os testes de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* e anti-*Toxoplasma* em amostras de soro de doadores em Banco de sangue.....32

Figura 1. Reprodutibilidade do teste ELISA, com resultados da titulação do soro controle positivo.....33

Figura 2. Padronização das condições para absorção de anticorpos IgG anti-*C. parvum*.....34

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* sp para aplicação em estudos epidemiológicos da criptosporidiose em imunocompetentes. Para obtenção de antígeno, bezerros foram oralmente infectados. Os oocistos foram recuperados das fezes do animal, com a utilização do gradiente de sacarose modificado, técnica de concentração onde se obteve o melhor rendimento. Para preparação do antígeno, os oocistos foram rompidos através de ciclos de congelamento/descongelamento e ultra-som. Soros controle positivo foram escolhidos entre o grupo de funcionários do laboratório de Parasitologia, pois apresentavam anticorpos anti-*Cryptosporidium* e devido as suas atividades no laboratório era um grupo mais exposto; soros controle negativo foram escolhidos entre aqueles com leituras de densidade óptica menores que 0,300 no ELISA para detecção de anticorpos anti-*Cryptosporidium*. Diferentes grupos de soros de indivíduos clinicamente normais (funcionários da parasitologia, doadores de sangue, pacientes que fizeram o Pré-Natal) ou outras infecções parasitárias (cisticercose, toxoplasmose, esquistossomose, Doença de Chagas, leishmaniose), foram avaliados para presença de anticorpos anti-*Cryptosporidium*. A alta frequência foi observada para o grupo de pacientes com Doença de Chagas (66,6%) e baixa frequência para o grupo de pacientes com esquistossomose e toxoplasmose (20,0%). A especificidade do teste ELISA para *Cryptosporidium* foi demonstrada com significativa redução nas leituras de D.O. observada em alguns soros após absorção dos anticorpos anti-*Cryptosporidium*. Além disso, no grupo de pacientes Pré-Natal 14,6%, quando comparada a alta frequência de anticorpos anti-*Cryptosporidium* 52,0%, indica provável ausência de reações cruzadas entre os dois antígenos. Enfim, os resultados obtidos sugerem que a técnica de ELISA pode ser uma importante metodologia para aplicação em estudos soroepidemiológicos da criptosporidiose.

Abstract

The aim of the present study was to standardize an immunoenzymatic assay, ELISA, for detection of IgG antibodies to *Cryptosporidium* sp for use in epidemiologic studies on cryptosporidiosis. For antigen preparation, oocysts were obtained from fecal samples of orally infected calves. A modified sucrose gradient, concentration technique was used for recovery and purification of oocysts, which were ruptured by using freeze-thaw cycles and ultra-sonication. Positive control sera were chosen among the Parasitology workers, who presented anti-*Cryptosporidium* antibodies and had been exposed to this parasite, because of their activities in the laboratory; and negative control sera were chosen among the ones with optical density (O.D.) readings lower than 0,300 at ELISA for anti- *Cryptosporidium* antibodies. Different groups of sera from clinically normal individuals (parasitology workers, blood donors, pregnant patients) or with other parasite infection (cysticercosis, toxoplasmosis, schistosomiasis, Chagas disease, leishmaniasis) were evaluated for the presence of *Cryptosporidium* antibodies. The higher frequency was observed for the group of patients with Chagas disease (66.6%) and the lower frequency for the group patients with schistosomiasis and toxoplasmosis (20.0%). The specificity of the *Cryptosporidium*-ELISA test was demonstrated when significant reduction of the O.D. readings was observed for some serum samples after absorption of the anti-*Cryptosporidium* antibodies. Also, in the group of pregnant patients, the high frequency of 52.0% for anti-*Cryptosporidium* antibodies when compared to the low frequency of 14.6% for anti-*Toxoplasma* antibodies might suggest possible absence of cross reactions between these two closely related parasite antigens. The ELISA for detection of anti-*Cryptosporidium* antibodies, as standardized in the present work, can constitute a good tool for epidemiological studies of cryptosporidiosis.

Introdução

Cryptosporidium parvum é um protozoário intestinal pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa e Subclasse Coccidia. Foi descrito pela primeira vez por Tyzzer em 1907, que observou a presença deste organismo na mucosa gástrica de camundongos assintomáticos. Em 1955, relatou-se uma doença diarréica grave em perus, sendo encontrado *Cryptosporidium* em suas fezes. Outros animais incluindo aves, répteis e mamíferos também podem adquirir a infecção (NAVIN e JURANEK, 1984).

Os dois primeiros casos humanos de criptosporidiose foram descritos separadamente, nos Estados Unidos da América do Norte (EUA) em 1976 por Meisel, que constatou na mucosa intestinal de um fazendeiro medicado com imunossupressor, e por Nime, que a encontrou em uma menina de três anos de idade com severa gastroenterite (de CARLI e SARAIVA, 1991). O potencial patogênico do parasito foi somente reconhecido por volta de 1982, com o surgimento da epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids), sendo considerado como um dos agentes causadores de diarréia persistente e de difícil tratamento, nos indivíduos imunocomprometidos (GUIZELINI e AMATO NETO, 1992).

O número exato de espécies do gênero *Cryptosporidium* não é conhecido. Das 21 espécies originalmente listadas, O'DONOGHUE, 1995, lista apenas seis espécies *C. parvum*, *C. muris*, *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. serpentis* e *C. nasorum*. Outros autores listam outras espécies como o *C. wrairi* e o *C. felis* (PIENIAZEK *et al.*, 1999). Estudos de genotipagem de isolados bovino e humano levaram ao reconhecimento de dois genótipos de *C. parvum*, um antroponótico (genótipo1) infectando somente humanos, e outro zoonótico (genótipo 2) encontrado em humanos e outros animais (PIENIAZEK *et al.*, 1999). Recentemente foi proposta uma nova espécie, *C. hominis*, infectando intestino de humanos (MORGAN-RYAN *et al.*, 2002).

Ciclo biológico

O ciclo biológico completa-se em um único hospedeiro, tendo como forma infectante o oocisto que mede 2 a 6 μm . Quando ingerido através da água e alimentos contaminados, a parede do oocisto é rompida no trato intestinal pelas enzimas proteolíticas e sais biliares. Assim, quatro esporozoítas são liberados; estes se transformam em trofozoítas que invadem a superfície do epitélio, sofrem divisões e formam esquizontes contendo merozoítas, os quais são liberados invadindo outras células epiteliais e sofrendo novas divisões. Os merozoítas de segunda geração desenvolvem-se em macro e microgametócitos, depois macro e microgametas. Estes se juntam para formar um zigoto, desenvolvendo um oocisto de parede espessa ou parede fina. Oocistos de parede espessa são eliminados infectantes juntamente com as fezes, garantindo a continuidade do ciclo em outros hospedeiros; já os oocistos de parede delgada são responsáveis pela manutenção da infecção interna. As fases sexuada e assexuada do ciclo ocorrem nas células do epitélio intestinal abaixo da membrana celular, mas extracitoplasmaticamente (NAVIN e JURANEK, 1984; CURRENT e HAYNES, 1984).

Transmissão

A criptosporidiose pode ser transmitida de um hospedeiro infectado, eliminando oocistos nas fezes para um hospedeiro susceptível pela via fecal-oral. A transmissão por esta via pode ser de pessoa para pessoa, através de contato direto, podendo ser incluída atividade sexual; pode também ocorrer de animal para animal, animal para humano, e de forma indireta através da água de beber ou pela água em atividades recreacionais, ou ainda veiculação por alimento (TZIPORI, 1988; DU PONT *et al.*, 1995; OKHUYSEN *et al.*, 1999).

Os oocistos de *C. parvum* podem permanecer viáveis por muitos meses no meio ambiente. Eles podem resistir até seis meses à temperatura de 20° C. Altas temperaturas resultam na perda rápida da viabilidade (FAYER *et al.*, 1998). Procedimentos utilizados no tratamento de água como floculação, cloração e ozonização não inviabilizam esse parasita (FRICKER e CRABB, 1998). A quantidade de oocistos viáveis, suficiente para causar infecção parece ser muito

baixa. Em um estudo realizado com voluntários sadios DUPONT *et al.*, 1995, calcularam a dose infectante média como sendo de 132 oocistos.

Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da infecção dependem da espécie ou genótipo do parasito, e da idade, estado imunológico e carga parasitária do hospedeiro; a intensidade da infecção pode variar desde uma forma assintomática a uma sintomática grave (DUBEY *et al.*, 1990).

Os pacientes geralmente desenvolvem volumosa diarreia aquosa, sem muco ou sangue, podendo apresentar pequena dor epigástrica espasmódica, anorexia, náuseas e vômitos, às vezes febre baixa. Em pacientes imunocompetentes, a diarreia é autolimitada, com duração de uma a duas semanas. Já nos imunodeprimidos ocorre diarreia crônica, perda de peso, dor abdominal, má-absorção e perda hídrica avaliada em três litros por dia, mas podendo atingir até 17 litros em um dia (CDC, 1982; NAVIN e JURANEK, 1984). Em pacientes com Aids pode ocorrer a criptosporidiose respiratória, que é marcada por tosse persistente e dispnéia (BREA HERNANDO *et al.*, 1993). Em um trabalho em Copenhague, oito de 86 broncoscopias diagnosticadas em pacientes com Aids foram positivas para *Cryptosporidium* (JENSEN *et al.*, 1990).

Pacientes com criptosporidiose persistente podem desenvolver infecção hepatobiliar ou pancreatite. A criptosporidiose biliar está associada com o estado avançado de imunocomprometimento (TZIPORI *et al.*, 1994).

Em crianças com idade de 0 a 5 anos é comum a ocorrência de enteroinfecção causada pelo *C. parvum*, principalmente em casos de crianças que vivem em condições precárias de saneamento e nutrição; a infecção pode ocasionar perda das microvilosidades e interferir na absorção de nutrientes, levando à desnutrição (MODIGLIANI *et al.*, 1985; SMITH *et al.*, 1992).

Resposta imunológica

Em estudos de cultura de tecidos, pesquisadores observaram que em estágios iniciais da ligação dos esporozoítas às células hospedeiras, o parasita é envolvido pela membrana da célula formando um vacúolo parasitóforo. Inicialmente o parasita está livre dentro do vacúolo e posteriormente, a membrana externa se funde com a membrana da célula hospedeira. A seguir, ocorre uma ligação direta entre o interior do esporozoíta e o citoplasma da célula parasitada. Entre essa ligação forma-se a membrana vacuolar que é precursora da organela de alimentação. Esta organela é a única barreira entre o citoplasma do esporozoíta e o da célula parasitada (LUMB *et al.*, 1988).

Para controlar a infecção causada pelo *Cryptosporidium* sp, os dois setores do sistema imunológico (humoral e celular) são importantes na resposta imune.

Pacientes com Aids apresentam defeitos celulares como depleção de células T. Estudos feitos em camundongos atímicos sugerem que a ausência de funções dos linfócitos T levam à criptosporidiose persistente (UNGAR *et al.*, 1990). As células T auxiliares atuam na ativação da produção de anticorpos e como efectoras, estimulando outras células na liberação de citocinas tóxicas aos coccídios (McDONALD *et al.*, 1992). Indivíduos com alteração de função da célula T, embora produzam anticorpos, não são capazes de controlar totalmente a infecção causada pelo *C. parvum* (CAMPELL e CURRENT, 1983; HEINE *et al.* 1984; BENHAMOU *et al.*, 1995; PERRYMAN *et al.*, 1994).

Na superfície do oocisto do *C. parvum* foi encontrada uma estrutura de polissacarídeos formada por carboidratos de alto peso molecular. Esta estrutura polissacarídica demonstrou antigenicidade quando submetida ao contato com anticorpos IgA do soro de pacientes infectados com *C. parvum* (NANDURI *et al.*, 1999). Antígenos que apresentam massa molecular que podem variar de 14 até 270 kDa ou maiores foram descritos como capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (ORTEGA- MOURA *et al.*, 1994; RIGGS *et al.*, 1994).

Anticorpos IgM, IgG e IgA anti-*C. parvum* no soro são detectados em pacientes com HIV e criptosporidiose persistente através dos testes de ELISA, Imunofluorescência indireta ou Western blot (BENHAMOU *et al.*, 1995).

Em pessoas imunocompetentes, a resposta primária à infecção pelo *C. parvum* é marcada por elevadas concentrações de anticorpos IgA e IgM, que vão diminuindo lentamente. Estas classes de imunoglobulinas estão freqüentemente presentes em amostras de soros de pessoas que vivem em regiões urbanas. De modo oposto, a IgG está presente nos soros de pessoas especialmente assintomáticas com ausência de oocistos em suas fezes, mas sorologicamente positivas para anticorpos de contato e que vivem em regiões semi-rural e rural. A maior freqüência de anticorpos IgG encontrada no grupo rural, quando comparada com grupos urbanos, pode resultar da maior freqüência de exposição ao parasito, e conseqüentemente conferindo maior grau de imunidade. A infecção em crianças menores que 2 anos de idade, que vivem em fazendas, é menos severa do que naquelas que vivem em regiões urbanas. Uma importante imunoglobulina, IgA, é recebida através do leite, sendo responsável pela imunidade intestinal (CASEMORE, 1987).

Para tentar estudar os mecanismos imunológicos da infecção pelo *C. parvum*, foram utilizados vários modelos animais, principalmente camundongos. Experimentos em camundongos adultos BALB/c e SCID, infectados com *C. parvum*, revelaram que a depleção de interferon gama (IFN- γ) aumenta a eliminação de oocistos (UNGAR *et al.*, 1991).

Em modelo experimental murino os linfócitos CD4 Th1 produzem IFN- γ , interleucina -2 (IL-2) e o fator de necrose tumoral - β (TNF- β). Linfócitos CD4 Th2 produzem a IL-4 e IL-5. A IL-4 tem uma importante função na redução do número de oocistos nas fezes e na diminuição do tempo de eliminação dos mesmos (McDONALD *et al.*, 1992). Em camundongos com depleção de IL-12 a infecção torna-se prolongada e aumentada a sua gravidade (URBAN *et al.*, 1996).

Camundongos recém-nascidos e adultos com deficiência de células $\alpha\beta$, apresentaram infecção intestinal crônica após terem sido infectados experimentalmente com *Cryptosporidium* sp. Por outro lado, animais adultos com

deficiência de células $\gamma\delta$ apresentaram resistência ou desenvolveram uma forma mais branda da infecção. Camundongos recém-nascidos com a mesma deficiência desenvolveram infecção grave com maior duração que seus controles, mas evoluíram para cura. Com estes resultados os autores concluíram que entre as células $T\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, as que melhor desempenham sua função de controle da infecção são as células $T\alpha\beta$ (EICHELBERGER *et al.*, 2000).

A infecção causada pelo *C. parvum* leva ao aumento da expressão de quimiocinas que mediam o recrutamento de leucócitos, macrófagos e neutrófilos. A indução do fator nuclear (NF- κ B) protege células infectadas da apoptose, enquanto a ativação de linfócitos leva à produção de citocinas das células Th1 e Th2, incluindo IFN- γ e IL-4 respectivamente. Embora estas duas citocinas regulem a ação uma da outra (downregulation) elas podem também agir juntas para induzir a mudança fenotípica no enterócito, capacitando o enterócito a inibir o desenvolvimento do *C. parvum*. O fator β de transformação do crescimento (TGF- β), produzidos pelos enterócitos, ativa linfócitos, sendo um importante imunoregulador e atua na restituição epitelial (LEAN *et al.*, 2002).

Em um hospital universitário do Haiti, foi feito um estudo de acompanhamento de crianças menores de dezoito meses de idade, classificadas em três grupos: crianças com criptosporidiose, crianças com diarreia, mas sem *Cryptosporidium* sp e crianças saudáveis como controle. Crianças com criptosporidiose aguda apresentavam-se mais desnutridas, geralmente por deficiência de vitamina A. Naquela população os marcadores de resposta imune pró-inflamatória como IL-8 e TNF- α estavam significativamente elevados, bem como as citocinas Th2, IL-13 e principalmente IL-10 com seu importante papel de resposta anti-inflamatória presente em mucosa do trato gastrointestinal, determinando o equilíbrio entre a patologia e a proteção através de sua ampla função imunoreguladora e imunossupressiva, incluindo a inibição de Th1, TNF- α e ativação de macrófagos (KIRKPATRICH *et al.*, 2002).

Diagnóstico Laboratorial

Inicialmente os casos de criptosporidiose humana eram diagnosticados através de biópsia de intestino delgado. O parasito era observado na superfície do epitélio intestinal em cortes histológicos pela microscopia eletrônica ou coloração do tecido com hematoxilina e eosina, Giemsa, ácido periódico de Schiff, ou azul de Toluidina (JANOFF e RELLER, 1987). Atualmente a biópsia é pouco utilizada, pois é um método de diagnóstico invasivo. O diagnóstico definitivo é feito pela demonstração do parasito (oocistos) nas fezes, indicando a existência da infecção pelo *Cryptosporidium* sp.

Para aumentar a sensibilidade na detecção dos oocistos, são empregados métodos de concentração como as técnicas de flutuação que utilizam gradiente de sacarose (técnica de Sheather), de sulfato de zinco (técnica de Faust), cloreto de sódio ou Percoll; ou ainda métodos de centrífugo-sedimentação com formol-éter, água-éter ou formol-acetato de etila, e tratamento das fezes utilizando solução de hidróxido de potássio a 10%.

Para visualização dos oocistos, são utilizadas algumas técnicas de coloração como: Ziehl-Neelsen, Kinyoun, Safranina, azul de metileno e outras (de CARLI e SARAIVA, 1991; GARCIA e SHIMIZU, 1997). Modificações feitas na técnica de coloração de Kinyoun, diminuindo o tempo de exposição à fucsina-carbólica e substituindo a solução de descoloração álcool-ácido sulfúrico por álcool-ácido clorídrico, aumentaram a eficiência da técnica, otimizando o contraste na coloração e agilizando o diagnóstico (MARTINEZ e BELDA NETO, 2001).

Embora ainda não utilizados rotineiramente na maioria dos laboratórios brasileiros, devido à necessidade de equipamentos sofisticados e seu alto custo, as técnicas de detecção de antígenos de *Cryptosporidium parvum* nas fezes vêm sendo utilizadas em alguns laboratórios, tendo em vista a eficiência diagnóstica, com bons índices de sensibilidade e especificidade. Estes métodos se baseiam na detecção de coproantígenos através de anticorpos policlonais ou monoclonais anti-*C. parvum*, como a Imunofluorescência direta para pesquisa de oocistos nas

fezes e ELISA para pesquisa de antígeno solúvel de secreção e excreção (IGNATIUS *et al.*, 1997; GRACZYK *et al.*, 1996).

Métodos moleculares de detecção e diferenciação de espécies e genótipos de *C. parvum* estão sendo desenvolvidos através de técnicas baseadas na Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) e outras (WEBSTER *et al.*, 1993; SULAIMAN *et al.*, 1999). Estes métodos contribuem para estudos epidemiológicos do *Cryptosporidium* sp, caracterizando espécies e genótipos que circulam em determinado meio ambiente e em que hospedeiros, pois, dependendo de sua heterogeneidade genotípica, podem ser observados diferentes graus no potencial de infectividade e manifestações clínicas.

Anticorpos IgM, IgG, e IgA específicos para o *Cryptosporidium* sp têm sido detectados nos soros tanto de pacientes imunodeprimidos como de indivíduos imunocompetentes, pelas técnicas de Imunofluorescência indireta, ELISA e Western blot (ZU *et al.*, 1994; BRAZ *et al.*, 1996; FROST *et al.*, 1998b; PRIEST *et al.*, 1999). Com estes métodos pode-se monitorar a resposta imune no decorrer da infecção ou realizar estudos epidemiológicos, utilizando-se os dados de frequência de anticorpos circulantes na população como indicador de exposição ao parasita (FROST *et al.*, 1998a; MOSS *et al.*, 1998; OKHUYSEN *et al.*, 1998; ISAAC-RENTON *et al.*, 1997).

Altas taxas de positividade sorológica podem refletir as precárias condições sanitárias e nutricionais, ou mesmo deficiência no tratamento da água de abastecimento, e neste caso podendo atingir populações pobres ou ricas.

Tratamento

Em indivíduos imunocompetentes, geralmente ocorre a cura espontânea da criptosporidiose, não havendo necessidade de tratamento específico com drogas antiparasitárias. Assim recomenda-se apenas a hidratação e manutenção do estado nutricional. O objetivo do tratamento é tentar diminuir a morbidade e o tempo de eliminação dos oocistos e a desidratação que ocorre em indivíduos com a infecção (SOAVE e ARMSTRONG, 1986; FRAZEN e MULLER, 1999).

Até o momento nenhuma droga testada apresentou eficácia comprovada contra o parasita. A espiromicina apesar de ser a droga mais recomendada para o tratamento da doença ainda não apresenta um resultado satisfatório. Outras drogas, como eflortina e eritromicina, têm sido utilizadas no tratamento de pacientes com Aids que apresentavam criptosporidiose gastrointestinal ou bronquial (LIMA, 2002).

Em condições experimentais, utilizando modelos animais, drogas como azitromicina têm apresentado bons resultados no tratamento da criptosporidiose.

O soro hiperimune bovino (colostró) empregado em pacientes com Aids apresentou bons resultados, sendo sugerido como uma alternativa terapêutica (FAYER *et al.*, 1989; RUMP *et al.*, 1992).

Epidemiologia

Cryptosporidium sp é considerado um protozoário cosmopolita que infecta os humanos, animais silvestres e domésticos. Oocistos excretados no ambiente contaminam a água de beber e também água para atividades recreacionais, servindo como uma das principais fontes de infecção para o homem (ANGUSH e GHORSE, 1997; ZU *et al.*, 1994). A transmissão através de alimentos ocorre devido ao consumo de alimentos crus como leite, frutas frescas, verduras e sucos. Pessoas que trabalham e moram em fazendas estão mais expostas ao risco de adquirir a infecção.

Em áreas urbanas, locais com aglomeração de pessoas, como creches e hospitais, são considerados fatores de risco, podendo ocorrer a transmissão pessoa a pessoa através da disseminação fecal-oral. A tabela 1 apresenta alguns dos fatores de risco que favorecem a ocorrência de criptosporidiose em humanos.

Tabela 1. Fatores de risco para ocorrência de criptosporidiose em humanos:

Indivíduos Imunocompetentes	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Moradores de países em vias de desenvolvimento e desenvolvidos ➤ Natação em piscinas públicas ➤ Pessoas que trabalham com animais ➤ Homossexuais masculinos e femininos ➤ Viajantes para regiões endêmicas ➤ Funcionários de hospitais ➤ Funcionários de creches ➤ Crianças que freqüentam creches ➤ Desnutrição ➤ Ingestão de água de abastecimento ➤ Ingestão de alimentos crus
Indivíduos Imunocomprometidos	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Imunodeficiência congênita ➤ Terapia imunossupressora ➤ Síndrome de imunodeficiência adquirida

O *Cryptosporidium parvum* tem sido uma ameaça ao abastecimento de água nos Estados Unidos da América (EUA). O primeiro relato de surto de criptosporidiose relacionado à veiculação hídrica foi em 1984, no subúrbio Braun Station, próximo ao Texas, atingindo aproximadamente 5.900 pessoas (D'ANTONIO *et al.*, 1985). Em 1993, aproximadamente 403.000 pessoas em Milwaukee, nos EUA, foram contaminadas através da ingestão de água tratada do reservatório da cidade (MACKENZIE *et al.*, 1994; FRICKER e CRABB, 1998).

Oocistos têm sido encontrados em vegetais dos mercados na Costa Rica e Peru. Estes vegetais são contaminados com a utilização de fertilizantes contendo fezes de animais e humanas, e/ou pela água utilizada para irrigação. Outros alimentos como ostras e mexilhões servem como fonte de infecção quando ingeridos crus, pois estes animais filtram grande quantidade de água retendo oocistos em seu organismo (ORTEGA *et al.*, 1991).

Um estudo epidemiológico foi realizado com um grupo de crianças com diarreia, admitidas em um hospital próximo a Jerusalém. A maioria destas crianças era de família pobre, residindo em áreas rurais e mantendo contato com gado e outros animais. Através do exame parasitológico de fezes foram encontrados oocistos nas fezes de 13,5% de 221 crianças. Para entender a associação entre a desnutrição severa e a infecção pelo *Cryptosporidium*, os autores subdividiram as crianças em grupos de acordo com o peso. Crianças com amostras de fezes positivas para *Cryptosporidium* eram significativamente mais desnutridas comparadas às crianças sem oocistos em suas fezes. Algumas crianças com severa desnutrição apresentavam peso menor que 50% do esperado de acordo com sua idade. Estas crianças apresentavam diarreia de longa duração. Os autores concluíram que a alta prevalência de infecção por *Cryptosporidium* entre crianças com diarreia em países em desenvolvimento ocorre devido à desnutrição crônica (SALLON *et al.*, 1988).

Possíveis fontes ambientais de *Cryptosporidium* sp foram investigadas através de um estudo realizado em Fortaleza, Ceará, Brasil, escolhendo-se para tal uma comunidade de baixa renda com alta frequência de criptosporidiose. Fontes de água para o abastecimento local e animais domésticos foram pesquisados quanto à existência ou não de oocistos. Foram detectados *Cryptosporidium* sp em 13 (10,2%) de 127 amostras fecais dos animais. E das 64 amostras de água coletadas no período de estação seca, 4 (6,3%) foram positivas; das 63 amostras coletadas em período de chuvas, 9 (14,3%) estavam positivas para *Cryptosporidium*. Com estes resultados os autores concluíram que os animais domésticos podem ser considerados como reservatórios do *Cryptosporidium*, e podem servir como fonte de infecção diretamente às pessoas da casa, assim como também contaminar a água de beber (NEWMAN *et al.*, 1993).

UNGAR *et al.*, 1988, realizaram um levantamento soroepidemiológico utilizando a técnica de enzima imunoensaio (ELISA) para identificar a extensão da infecção pelo *Cryptosporidium*. Foram selecionadas aleatoriamente amostras de soro de 389 crianças e adultos em Lima, no Peru, e de 84 crianças em Macaibo e Caracas, na Venezuela, para pesquisa de IgM e IgG anti-

Cryptosporidium. A pesquisa foi feita em uma área com precárias condições sanitárias, onde a água era estocada em tanques, e apresentando alta frequência de doença diarréica e mortalidade infantil. Para os autores, índices de positividade de 19,8% e 15,5%, encontrados respectivamente, no Peru e na Venezuela, para as duas classes de anticorpos, IgM e IgG, representariam indicação consistente de infecção ativa ou recente nessas populações. Nesses países, 64% das pessoas apresentavam níveis detectáveis de IgG específicas para o *Cryptosporidium*, indicando contato com o parasita e eventual ocorrência de infecção em algum momento de suas vidas. A detecção de níveis aumentados de IgG específica na faixa etária de dois a três anos sugere que é comum a infecção nesta idade. Os autores concluem que a infecção pelo *Cryptosporidium* sp é endêmica nestas comunidades e que os residentes estão sendo constantemente expostos ao parasito.

ZU *et al.*, 1994, realizaram um estudo soroepidemiológico para detectar a prevalência da infecção por *Cryptosporidium* em crianças de três comunidades rurais em Anhui (China) e compararam os resultados com dados da literatura obtidos do Brasil e Estados Unidos. Foram realizados exames para pesquisa de oocistos nas fezes e teste imunoenzimático (ELISA) para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* no soro. Taxas de soroprevalência de 49,5% (302 de 610 crianças) em jovens menores de 16 anos de idade em Anhui e de 75,0% (30 de 40) para crianças de 4 anos ou menores em uma favela de área urbana na periferia de Fortaleza, CE, Brasil, demonstrando alta prevalência da infecção, sugerem ser a criptosporidiose endêmica nestas duas comunidades. As diferenças na prevalência de anticorpos entre China (Anhui), Brasil (Fortaleza) e Estados Unidos (Virgínia), respectivamente 49,5%, 75,0% 16,9%, podem estar refletindo as respectivas condições sanitárias, com precárias práticas de higiene e aglomeração de moradias nas primeiras.

MOSS *et al.*, 1994, utilizaram a técnica de Western blot para avaliação da resposta de anticorpos em pessoas expostas ao *Cryptosporidium* durante um surto de infecção. Amostras do soro destas pessoas com infecção confirmada apresentaram reatividade para anticorpos IgG contra as frações antigênicas de 27, 17 e 15 kDa do antígeno, preparado a partir de oocistos. Anticorpos IgM

mostraram-se reativos para a fração 27 kDa , e IgA para 17 kDa. Com base nestas observações os autores sugerem que as respostas de anticorpos contra estes antígenos podem ter valor diagnóstico em estudos epidemiológicos. Anticorpos monoclonais que reconhecem as frações 15, 17 e 27 kDa também reagem com a superfície dos esporozoítos do *C. parvum*, sugerindo que estes antígenos possam ser os principais marcadores da resposta anticórpica ao parasito.

Com o objetivo de investigar a dinâmica da resposta sorológica, após um surto, para duas frações antigênicas específicas do *C. parvum*, FROST *et al.*, 1998a, utilizaram a técnica de Western blot para detectar anticorpos no soro de 124 residentes das cidades de Jackson e Oregon, acompanhados durante dois anos. Encontrou-se uma resposta sorológica elevada ao antígeno de 27 kDa entre os indivíduos testados seis meses após o surto. Os anticorpos contra a fração antigênica de 15/17 kDa apresentavam-se em níveis mais baixos enquanto a resposta ao antígeno de 27 kDa permaneceu alta e estendeu-se por mais tempo após o surto. Houve declínio após dois anos. Os autores concluíram que comunidades com exposição recorrente aos oocistos estão sujeitas a um risco mínimo de desenvolverem a doença pela reinfecção e que os níveis de anticorpos na população aumentam com o avanço da idade.

Justificativa

Embora sejam inúmeros na literatura os trabalhos destacando a importância do *C. parvum* como agente causal de diarreia severa e prolongada nos indivíduos com imunodeficiência, como nos casos de infecção pelo vírus HIV ou em pacientes transplantados, é pouco conhecida a frequência desta protozoose no nosso meio, entre adultos e crianças imunocompetentes. Tal acontece principalmente por se tratar de parasita de dimensões muito pequenas, de difícil detecção pelos métodos de exame parasitológico de fezes rotineiramente empregados. Os métodos especiais de coloração que permitem sua visualização e identificação nem sempre são solicitados pelo clínico diante de um caso de diarreia em crianças e mesmo em adultos, considerados normais, deixando assim sem diagnóstico possíveis casos de infecção pelo *C. parvum*, e prováveis fontes de infecção para os pacientes com imunocomprometimento. Além disso, esses métodos parasitológicos são de difícil aplicação em grande escala. Assim, os testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*Cryptosporidium* sp podem ser considerados como uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos.

II - Objetivo do estudo

Padronizar a técnica sorológica ELISA, para detecção de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* sp.

Objetivos específicos

- Estabelecer as condições adequadas para a obtenção e rompimento dos oocistos de *Cryptosporidium* e preparo do antígeno.
- Definir a concentração adequada do antígeno para a sensibilização das placas de ELISA.
- Estudar as freqüências de anticorpos em soros de diferentes grupos.
- Avaliar a especificidade da reação em imunoenzimática, ELISA, através da absorção de anticorpos anti-*Cryptosporidium*.

Material e Métodos

Amostras

Amostras de sangue venoso (n=20) foram coletadas, após assinatura do termo de consentimento (anexo 1), de indivíduos clinicamente normais, entre eles funcionários e aprimorandos do Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz (grupo FLP). Alguns destes indivíduos trabalham diretamente com o *Cryptosporidium*, sendo uma população exposta ao risco de adquirir a infecção. Durante a padronização dos testes sorológicos, as amostras séricas em que foram detectados anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* sp foram utilizadas como controle positivo e as demais como controle negativo. Amostras de fezes destes indivíduos também foram coletadas para pesquisa do *Cryptosporidium* sp.

Foram avaliadas quanto à frequência de anticorpos anti-*Cryptosporidium* sp, amostras de soro de outros grupos:

- a) Amostras cedidas como produto de descarte pelo setor de sorologia do Hospital do Servidor Público Estadual “Francisco Morato de Oliveira”, sendo 13 de Doadores de Banco de Sangue (grupo DBS) e 48 de pacientes submetidas ao Pré-Natal (grupo PPN).
- b) Amostras doadas pelo setor de Sorologia do Hospital Universitário de Taubaté, de 11 de pacientes soropositivos para HIV (grupo HIV). É um grupo de indivíduos suscetível a freqüentes infecções pelo *Cryptosporidium*.
- c) Amostras de soroteca cedidas por alguns laboratórios do Instituto Adolfo Lutz, com soropositividade para outras parasitoses (n=72), como Toxoplasmose, Doença de Chagas, Leishmaniose, Esquistossomose e Cisticercose. Estas amostras foram utilizadas para verificar a presença ou não de reações cruzadas com outros antígenos parasitários, avaliando-se a especificidade do teste.

Todas as amostras foram analisadas de maneira global, sem identificação individual.

O projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião de 24 de fevereiro de 2003 (anexo 2).

Processamento das amostras de sangue

Os soros, separados por centrifugação das respectivas amostras de sangue coletadas por punção venosa, foram aliquotados e armazenados a -20°C , sendo posteriormente utilizados para a padronização dos testes sorológicos (grupo FLP). Amostras séricas dos outros grupos foram também armazenadas a -20°C até o momento de uso.

Processamento das amostras de fezes humanas

As amostras de fezes foram concentradas através da técnica de Ritchie, por centrifugação com formol-éter, e coradas pela técnica de Kinyoun. As lâminas foram examinadas em microscopia óptica em aumento de 400 e 1000 vezes.

Obtenção de oocistos de *Cryptosporidium parvum*

Infecção do bezerro

Para obtenção dos oocistos, três bezerros machos de raça holandesa foram infectados por via oral, com oocistos de *C. parvum*. Durante todo o período pré e pós-infecção, os animais foram alimentados diariamente com dois litros de leite desnatado e água. Após o início do processo diarréico, as fezes do bezerro foram coletadas com auxílio de um saco coletor (saco plástico preso a um aro de metal amarrado com barbantes) e examinadas ao microscópio óptico para verificar a presença ou não de oocistos. Este procedimento persistiu até o final do quadro diarréico, e constatação de ausência de oocistos nas fezes.

O primeiro bezerro foi comprado da fazenda Agrindus Empresa Agrícola Pastoril, localizada no município de Descalvados, São Paulo. O animal foi mantido no biotério do Departamento de Veterinária Preventiva de Saúde Animal da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da USP. A infecção foi feita no quinto dia de

vida do animal com uma suspensão aquosa, contendo $3-5 \times 10^6$ oocistos de *C. parvum*, que vinha sendo preservados em solução de dicromato de potássio a uma concentração de 2,5% há aproximadamente dez meses. No terceiro dia após inoculação, iniciou-se o processo diarréico com a eliminação de oocistos nas fezes.

Um segundo bezerro, doado pela fazenda experimental da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da USP, localizada no município de Pirassununga, São Paulo, foi infectado por volta do seu décimo dia de vida, com uma suspensão aquosa contendo 8×10^6 oocistos de *C. parvum* preservados durante cerca de seis meses em solução de dicromato de potássio a uma concentração de 2,5%, obtidos da infecção do primeiro bezerro.

O terceiro bezerro foi recebido, em doação, de uma fazenda do município de Caçapava, no Vale do Paraíba, São Paulo. O animal foi infectado no seu 5º dia de vida, com uma suspensão aquosa contendo 5×10^6 oocistos purificados a partir de fezes de bezerro naturalmente infectado, preservados durante cerca de quatro meses em solução de dicromato de potássio a 2,5%. Depois de infectado, o animal permaneceu no biotério para animais infectados do Laboratório de Parasitologia da Universidade de Taubaté (UNITAU), por duas semanas, recebendo cuidados diários quanto à alimentação e higienização do local. Após início dos sintomas, no sexto dia após infecção, fezes diarréicas foram diariamente coletadas em recipientes apropriados, misturadas em solução de dicromato de potássio a 2,5%, e armazenadas a 4°C até o momento do processamento.

Recuperação dos oocistos

As fezes dos bezerros contendo oocistos de *C. parvum* foram inicialmente tamizadas em peneira de malha grossa (poros de cerca de 850µm), com água destilada para remoção de grumos e estocada a 4°C em solução de dicromato de potássio a 2,5%.

A primeira etapa para recuperação de oocistos consistiu em realizar lavagens do material fecal para remover o dicromato de potássio. Em um tubo de centrífuga com capacidade para 50mL foram adicionados 20mL do material fecal previamente

lavado e tamizado e 30mL de água destilada. Em seguida foi homogeneizado e centrifugado a 2000 x g, por 15 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi desprezado e com o sedimento repetiu-se o procedimento por mais três vezes.

O sedimento da última lavagem foi submetido a diferentes técnicas de concentração, para recuperação de oocistos como descritas a seguir:

a) Técnica de concentração utilizando o gradiente de NaCl (UNGAR *et al.*, 1986; BUKHARI *et al.*, 1995).

Em um tubo de centrífuga com capacidade para 15mL foram adicionados 5 mL do sedimento do material fecal previamente lavado e 10mL de solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), densidade 1,2g/mL. Em seguida foi homogeneizado e centrifugado a 1000 x g, por 10 minutos a 4°C.

Todo sobrenadante foi recuperado e imediatamente transferido para um tubo de centrífuga com capacidade para 50mL, diluído na proporção de 1:4 com água destilada e centrifugado por 10 minutos a 2000 x g, a 4°C. O sedimento foi suspenso em água destilada e lavado por centrifugação por mais duas vezes para retirar toda solução de NaCl. Após lavagem, o material foi reconstituído a um volume de 1mL com água destilada e feita a contagem dos oocistos em câmara de Neubauer, sendo os resultados expressos em oocistos/mL.

b) Técnica de concentração utilizando o gradiente de sacarose (CURRENT, 1990).

Em um tubo de centrífuga com capacidade para 50mL adicionou-se 5mL do sedimento previamente lavado, e 30mL de uma solução saturada de sacarose com densidade de 1,2g/mL.

Em seguida, foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 400 x g. Cuidadosamente, adicionou-se à solução 5mL de água destilada e com auxílio de uma pipeta Pasteur, foram feitos movimentos circulares rápidos para suspender os oocistos. A seguir esta suspensão foi transferida para outro tubo com capacidade

para 50mL, diluída na proporção de 1:3 com água destilada, distribuída em tubos com capacidade para 50mL e centrifugada a 2000 x g por 10 minutos. Este processo de lavagem foi repetido duas vezes. O sedimento foi ressuspensão em solução salina tamponada com fosfatos (STF) e o número de oocistos estimado através de contagem em câmara de Neubauer sendo os resultados expressos em oocistos/mL.

c) Técnica de concentração utilizando o gradiente descontínuo de Percoll (ARROWOOD e STERLING, 1987; WALDMAN *et al.*, 1986).

Foram preparadas duas soluções contendo Percoll com densidades diferentes: 1,08 g/mL (solução A) e 1,04 g/mL (solução B).

Em um tubo cônico com capacidade para 15mL, foi pipetado 3mL da solução A e cuidadosamente adicionado 3mL da solução B. A seguir, delicadamente foi adicionado 0,5mL da solução contendo os oocistos recuperados pelas técnicas anteriormente descritas.

Após centrifugação a 400 x g por 10 minutos, distintas bandas estavam formadas. A primeira localizava-se 2cm abaixo da superfície da solução B. A outra formava um anel entre os dois gradientes. As duas bandas foram recolhidas, lavadas separadamente e examinadas ao microscópio óptico. A primeira apresentou pouca quantidade de oocistos e pouca sujeira, já a outra apresentou grande quantidade de oocistos e muita sujeira.

O sedimento obtido da banda que apresentou maior número de oocistos foi ressuspensão em uma solução de hipoclorito de sódio a 5% (KASSA *et al.*, 1991) homogeneizado e centrifugado a 4000 x g por 2 minutos em tubos com capacidade para 1,5mL. Foram realizadas cinco lavagens com solução salina tamponada com fosfatos pH 7,2 (STF), na mesma rotação, e feita a contagem dos oocistos em câmara de Neubauer, sendo os resultados expressos em oocistos/mL.

d) Técnica de centrífugo-flutuação em gradiente de sacarose (técnica de Sheather modificada)

A suspensão de oocistos em dicromato de potássio, previamente submetida à etapa de tamização, foi concentrada por flutuação, utilizando-se gradiente de sacarose com densidade 1,2 g/mL de acordo com a técnica de Sheather, descrita por de CARLI e SARAIVA, 1991 e com alguma modificação, como detalhada a seguir:

Em um tubo cônico com capacidade para 15mL adicionou-se 2mL da suspensão de oocistos e em seguida 10mL da solução de sacarose. Após homogeneização e centrifugação a 400 x g por 10 minutos o anel formado na superfície do sobrenadante foi recolhido com auxílio de uma pipeta Pasteur. Os oocistos foram ressuspensos em STF e lavados por centrifugação a 450 x g por 10 minutos até remover toda sacarose. A seguir foram reconstituídos em solução de hipoclorito de sódio a 5% (o hipoclorito de sódio retira bactérias e alguns fungos da amostra), homogeneizados e centrifugados a 4000 x g por 2 minutos em tubos com capacidade para 1,5mL. Para retirar o hipoclorito de sódio, foram realizadas cinco lavagens com STF através de centrifugações, seguindo o mesmo procedimento anteriormente descrito. Os oocistos foram contados em câmara de Neubauer e os resultados foram expressos em oocistos/mL.

A purificação da amostra contendo oocistos com a utilização de hipoclorito de sódio comercial a 5% foi a mesma utilizada por UNGAR *et al.*(1986). Com a sua utilização, bactérias e poucas leveduras foram eliminadas da amostra tornando-a mais limpa facilitando a contagem dos oocistos e melhorando a qualidade do antígeno.

Preparo do antígeno

Para o teste sorológico ELISA, um extrato total bruto foi preparado a partir de oocistos purificados com a técnica de Sheather, lavados e suspensos em solução tamponada em fosfatos (STF), de modo a obter $2,5 \times 10^6$ oocistos/mL. Estes foram submetidos a rompimento por processo de congelamento e descongelamento (7 ciclos) e ultra-sônico (20 ciclos de 15 segundos a 60 KHz cada). O procedimento foi

realizado em banho de gelo como descrito por MOSS e LAMMIE, 1993. Após centrifugação a 4000 x g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante contendo o antígeno solúvel foi aliquotado e armazenado a -20°C, para posterior utilização nos testes.

Dosagem de proteínas

A quantidade de proteínas contida no antígeno solúvel, obtida a partir de oocistos de *C. parvum*, foi determinada pelo método de Lowry, 1956 (anexo 4).

Técnica sorológica

Padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Cryptosporidium* sp

As microplacas de poliestireno, de fundo chato (Alamar Tecnocientif LTDA), contendo 96 orifícios, foram sensibilizadas com 50µL do antígeno solúvel de *C. parvum* obtido como descrito acima, a partir de uma solução contendo 590 µg/mL, de modo a contemplar aproximadamente 3 µg de proteína de *C. parvum* por orifício, diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9,6, de acordo com metodologia inicialmente descrita por UNGAR *et al.*, 1986, com algumas modificações. Como solução de bloqueio foi utilizada solução salina tamponada com fosfatos (STF), contendo leite desnatado (Molico) a 1% (STF-L), e para as lavagens, STF contendo Tween 20 a 0,05% (STF-T). Os soros controle positivo e negativo (do grupo FLP) e dos outros grupos (DBS, PPN, HIV, e soros positivos para outras parasitoses como Doença de Chagas, Leishmaniose, Esquistossomose e Cisticercose) foram utilizados diluídos a 1:100 em STF-L e incubados a 37°C por 50 minutos. Anticorpos anti-IgG humana conjugados à peroxidase (SIGMA) foram utilizados em seus títulos ótimos, previamente determinados para outros antígenos parasitários (título de 1:10.000 determinado para antígeno de *Schistosoma mansoni*) e posteriormente confirmados no sistema antigênico em estudo. Após incubação a 37°C por 50 minutos e lavagens três vezes por 5 minutos cada, foram submetidos à incubação com a mistura cromógena, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Orto-fenileno diamina (OPD) em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 15 minutos. Em seguida foi adicionada solução ácida (H₂SO₄ 1N), 50µL por orifício, para interromper a reação

enzimática e a leitura da absorbância feita em leitora de microplaca (Labsystems Multiskan MS), em comprimento de onda de 492 nm.

Para definição do Limiar de reatividade (L.R.), foram escolhidos soros do grupo FLP, cujas leituras de densidade óptica (D.O.) apresentavam-se iguais ou abaixo de 0,30, os quais foram classificados como soros controle negativos. O limiar de reatividade (Cut off) diário da reação foi calculado pela média das leituras de D.O. de oito soros controles negativos adicionado de dois desvios padrões.

Avaliação da reatividade dos soros com a técnica de ELISA, para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii*

As microplacas de poliestireno escavadas em fundo plano, com 96 orifícios, foram sensibilizadas com 50µL de antígeno solúvel total contendo 330µg/mL de proteína de *Toxoplasma gondii* (20µg de proteínas por orifício). A placa foi bloqueada com 100µL em cada orifício de solução STF-L a 5% em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida a solução foi retirada da placa e as amostras séricas dos diferentes grupos, previamente examinadas para pesquisa de anticorpos anti-*Cryptosporidium* sp foram adicionadas. Estes soros foram diluídos a 1:500 em STF-L a 5%, adicionados 50µL em cada orifício da placa e incubados durante 45 minutos à 37°C. Em seguida foram feitas cinco lavagens da placa com STF-T a 0,05%. Anticorpos anti-IgG humana conjugados à peroxidase (SIGMA) foram utilizados em seus títulos ótimos (1:2000), onde foi adicionado 50µL em cada orifício da placa e deixado por 45 minutos à 37°C. A placa foi lavada cinco vezes com STF-T a 0,05% e submetida à incubação com a mistura cromógena (H₂O₂ + OPD) em temperatura ambiente em câmara escura. Em seguida, a reação foi interrompida acrescentando 20µL de HCl – 4 N em cada orifício e a leitura da absorbância foi feita em leitora de microplaca, em comprimento de onda de 492 nm. O limiar de reatividade (cut off), de 0,143 foi estabelecido de acordo com a técnica de rotina como padronizada na Seção de Parasitoses Sistêmicas do Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz.

Padronização da absorção de anticorpos anti-*Cryptosporidium* em soros positivos, para avaliação de reatividade cruzada

Para absorção dos soros, o próprio antígeno de *Cryptosporidium* sp contendo 590µg/mL foi utilizado como absorvente. Para definir o título do absorvente foram testadas as seguintes diluições: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 em STF-L 1% e com diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4 e 18 horas), a 37°C. Foi escolhido um soro controle positivo reagente para *Cryptosporidium* sp na diluição 1:100 para estabelecer as condições de absorção. A reação de ELISA foi feita antes e após absorção dos anticorpos. Em seguida, soros dos diferentes grupos foram testados.

Análise estatística

Os resultados obtidos no teste ELISA foram analisados através do programa Epi-Info versão 6.04 da Organização Mundial de Saúde (DEAN *et al.*, 1995). Através do programa, foram calculados o intervalo de confiança e a porcentagem de positividade para cada grupo de amostras analisadas.

Resultados

Exame parasitológico de fezes humanas

No exame parasitológico de fezes para pesquisa de *Cryptosporidium* sp, todas as amostras do grupo FLP (n=20) apresentaram-se negativas.

Recuperação dos oocistos a partir das fezes de bezerro

No Quadro 1 (pág.28) estão apresentados os resultados obtidos das diferentes técnicas de concentração e recuperação dos oocistos após contagem na câmara de Neubauer.

A técnica de recuperação dos oocistos que melhor resultado apresentou, com menor perda de oocistos e, portanto maior rendimento, foi a de centrífugo-flutuação em gradiente de sacarose, de acordo com técnica descrita por de CARLI e SARAIVA, 1991. E a purificação foi feita por centrifugação com hipoclorito de sódio.

Na técnica utilizando o gradiente descontínuo Percoll, não conseguimos resultados satisfatórios, pois em nenhum momento ocorreu a separação entre a sujeira e os oocistos.

Padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Cryptosporidium*

Titulação do antígeno no ELISA

A partir do antígeno contendo 590µg/mL de proteínas, dosado pela técnica de LOWRY *et al.*, 1956, foram preparadas algumas diluições. A Tabela 1 apresenta as leituras de D.O. da titulação do antígeno empregando-se soros positivo e negativo. Foi determinada como quantidade ótima para sensibilização da placa de ELISA 3µg do antígeno em 50µL de tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 em cada cavidade. A quantidade de 3µg foi a menor quantidade de antígeno utilizada para que ocorresse a reação com os anticorpos dos soros positivo e negativo, de forma que a leitura de densidade óptica obtida no soro negativo fosse inferior ao limiar de reatividade.

Avaliação do ELISA com diferentes grupos de soros

Na Tabela 2 (pág.30) estão apresentados os resultados do teste ELISA para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* sp nos diferentes grupos. A frequência mais elevada foi observada nas pacientes submetidas ao Pré-Natal (52,0%) e a menor frequência no grupo do Laboratório de Parasitologia (30,0%).

Entre as amostras séricas provenientes de pacientes com outras parasitoses, maior frequência (66,6%) foi observada para aqueles com Doença de Chagas e menor frequência (20,0%), para aqueles com Toxoplasmose e Esquistossomose (Tabela 3) pág.30.

ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii*.

Na tabela 4 (pág.31) estão apresentados os resultados da positividade de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* nos diferentes grupos de amostras. A frequência mais elevada foi observada no grupo HIV (45,4%) e a mais baixa no grupo de pacientes submetidas ao Pré-Natal (14,6%).

Comparação da positividade entre os testes de ELISA feitos para detecção de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* sp e anti-*Toxoplasma gondii*.

Para esta comparação, amostras dos diferentes grupos foram avaliados quanto à presença de anticorpos para os dois tipos de coccídios, *Cryptosporidium* sp e *Toxoplasma gondii*, e os resultados estão apresentados nas tabelas 5, 6, 7 e 8. No grupo do FLP, nenhuma amostra apresentou simultaneamente anticorpos anti-*Cryptosporidium* sp e anti-*Toxoplasma gondii*. A positividade para ambos anticorpos foi observada em dois soros do grupo HIV, um soro do grupo PPN e um do grupo DBS.

Reprodutibilidade do teste ELISA

Para avaliação da reprodutibilidade do ELISA, o soro controle positivo foi avaliado em dias diferentes em função do Limiar de Reatividade (L.R.), que foi determinado a cada dia de reação. Na figura 1 (pág.33) está representado o resultado desta avaliação, onde se observou que os títulos do soro positivo variaram de 1:200 a 1:400.

Padronização da absorção de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* sp

As condições para absorção dos anticorpos anti-*Cryptosporidium* sp foram padronizadas utilizando um soro positivo. O soro foi absorvido a 37°C com antígeno de *Cryptosporidium* sp contendo 590 µg/mL em várias diluições (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800) e diferentes tempos de incubação (1, 2, 3, 4 e 18 horas). O melhor resultado foi observado com antígeno diluído a 1:25 e tempo de incubação de 4 horas, sendo o suficiente para a leitura de D.O. do soro positivo ficar abaixo do Limiar de reatividade do dia (Figura 2) pág.34.

No Quadro 2 (pág.35) estão os resultados do ELISA após absorção de anticorpos IgG anti- *Cryptosporidium* sp em soros dos diferentes grupos. A absorção foi feita, utilizando a diluição 1:25 do absorvente e 4 horas de incubação a 37°C. Estão apresentadas as leituras de D.O. dos soros antes e após absorção. As leituras de D.O. dos soros após absorção foram inferiores ao limiar de reatividade do dia. Alguns soros do grupo de pacientes com Doença de Chagas, que apresentaram elevada frequência de anticorpos anti-*Cryptosporidium*, foram absorvidos com antígeno de *Cryptosporidium* sp e submetidos à reação de imunofluorescência (RIF) para anticorpos anti-*T.cruzi*, paralelamente à detecção de anticorpos anti-*Cryptosporidium* por ELISA. Os resultados demonstraram queda nas leituras de D.O. para anticorpos anti-*Cryptosporidium* (Quadro 2), sem alteração na positividade sorológica na RIF para doença de Chagas.

Quadro 1. Resultados da comparação entre técnicas de purificação utilizando diferentes gradientes para obtenção de oocistos de *C. parvum* e avaliação do número de oocistos recuperados em cada técnica.

Gradientes utilizados nas técnicas de concentração	Volume Inicial	Nº estimado de oocistos na amostra inicial	Volume Final	No de oocistos recuperados	Recuperação (%)
Cloreto de sódio (UNGAR <i>et al.</i> , 1986)	10mL	9×10^7	1mL	1×10^7	11,1%
Sacarose (CURRENT, 1990)	10mL	9×10^7	1mL	1×10^7	11,1%
Sacarose (de CARLI e SARAIVA, 1991)	10mL	9×10^7	1mL	$2,5 \times 10^7$	27,7%

* Com o gradiente de Percoll não foi possível separar os oocistos das fezes.

Tabela 1. Titulação do antígeno de *C. parvum*: Leituras de D.O. no ELISA de acordo com a quantidade de antígeno (proteínas) por orifício e diluição do soro controle positivo (P) e negativo (N)

Diluição do soro	Quantidade de Antígeno									
	2µg		3µg*		4µg		5µg		6µg	
	P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
1:100	0,521	0,166	0,538	0,200	0,700	0,259	0,853	0,332	0,832	0,405
1:200	0,341	0,086	0,353	0,102	0,438	0,134	0,540	0,178	0,573	0,209
1:400	0,219	0,037	0,227	0,068	0,263	0,066	0,327	0,081	0,334	0,110
1:800	0,108	0,018	0,132	0,042	0,149	0,045	0,183	0,053	0,199	0,063
1:1600	0,086	0,013	0,051	0,030	0,058	0,032	0,079	0,036	0,081	0,047
1:3200	0,045	0,011	0,020	0,017	0,014	0,020	0,043	0,025	0,041	0,032
1:6400	0,039	0,006	0,014	0,010	0,009	0,012	0,027	0,018	0,023	0,021

*Menor quantidade de antígeno utilizada para ocorrência de reação com Ac dos soros, de forma que a leitura de Densidade Óptica (D.O.) do soro negativo, fosse inferior ao Limiar de Reatividade (L.R.).

Tabela 2. Positividade para anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium*, obtidos no teste de ELISA em diferentes grupos de soros.

Grupos	Nº de amostras	Positivos		
		Nº	%	(IC)
FLP	20	6	30,0%	(12,8 – 54,3)
DBS	13	5	38,5%	(15,1 – 67,7)
PPN	48	25	52,0%	(37,4 – 66,5)
HIV	11	5	45,4%	(18,1 – 75,4)

FLP- Funcionários do Laboratório de Parasitologia; DBS- Doadores do Banco de Sangue; PPN- Pacientes submetidas ao Pré-Natal; HIV- Pacientes soropositivos para HIV; IC- Intervalo com 95% de confiança

Tabela 3. Positividade para anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium*, obtidos no teste de ELISA em amostras soropositivas para outras parasitoses

Parasitose	Nº de amostras	Positivos		
		Nº	%	(IC)
Cisticercose	16	7	43,7%	(20,7 – 69,4)
Toxoplasmose	15	3	20,0%	(5,3 – 48,6)
Esquistossomose	10	2	20,0%	(3,5 – 55,8)
Doença de Chagas	21	14	66,6%	(43,1 – 84,5)
Leishmaniose	10	4	40,0%	(13,7 – 72,6)

IC- Intervalo com 95% de confiança.

Tabela 4. Positividade para anticorpos IgG anti- *Toxoplasma gondii* obtidos no teste de ELISA no diferentes grupos (L.R.= 0,143)

Grupo	Nº de amostras	Positivos		
		Nº	%	(IC)
FLP	20	3	15,0%	(3,9 – 38,9)
DBS	13	5	38,4%	(15,1 – 67,7)
PPN	48	7	14,6%	(6,5 – 28,4)
HIV	11	5	45,4%	(18,1 – 75,4)

FLP- Funcionários do Laboratório de Parasitologia; DBS- Doadores do Banco de Sangue; PPN- Pacientes submetidos ao Pré-Natal; HIV- pacientes soropositivos para HIV. IC- Intervalo de confiança

Tabela 5. Comparação de resultados entre os testes de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* e anti-*Toxoplasma gondii* em amostras de soro de funcionários do Laboratório de Parasitologia

		anti- <i>Cryptosporidium</i>		Nº de amostras(%)
		+	-	
anti- <i>Toxoplasma</i>	+	0	3	3 (15%)
	-	6	11	17 (85%)
Nº de amostras(%)		6 (30,0%)	14 (70,0%)	20

Tabela 6. Comparação de resultados entre os testes de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* e anti-*Toxoplasma gondii* em amostras de soro de pacientes soropositivos para HIV

		anti- <i>Cryptosporidium</i>		Nº de amostras(%)
		+	-	
anti- <i>Toxoplasma</i>	+	2	3	5 (45,4%)
	-	3	3	6 (54,5%)
Nº de amostras(%)		5 (45,4%)	6 (54,5%)	11

Tabela 7. Comparação de resultados entre os testes de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* e anti-*Toxoplasma gondii* em amostras de soro de pacientes que fizeram o Pré-Natal

		anti- <i>Cryptosporidium</i>		Nº de amostras(%)
		+	-	
anti- <i>Toxoplasma</i>	+	1	6	7 (14,6%)
	-	24	17	41 (85,4%)
Nº de amostras(%)		25 (52,1%)	23 (47,9%)	48

Tabela 8. Comparação de resultados entre os testes de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* e anti-*Toxoplasma gondii* em amostras de soro de doadores em Banco de Sangue

		anti- <i>Cryptosporidium</i>		Nº de amostras(%)
		+	-	
anti- <i>Toxoplasma</i>	+	1	4	5 (38,5%)
	-	4	4	8 (61,5%)
Nº de amostras(%)		5 (38,5%)	8 (61,5%)	13

Figura 1. Reprodutibilidade do teste ELISA, com resultados da titulação do Soro Controle Positivo. ▲ e ■ = Indicação dos títulos do Soro Controle Positivo, respectivamente 1/200 e 1/400, em dias diferente

Figura 2. Padronização das condições para absorção de anticorpos IgG anti-*C. parvum*. ▲ Diluição de 1:25 e temperatura de incubação de 4 horas. Condições escolhidas com leituras de Densidade Óptica (D.O.) do soro positivo abaixo do Limiar de Reatividade (L.R.).

Quadro 2. Leituras de D.O. antes e após absorção com antígeno de *Cryptosporidium* no teste ELISA com diferentes amostras positivas

Grupo	Soro	s/abs*	c/abs*	(%)abs	Grupo	Soro	s/abs	c/abs	(%)abs
FLP	1	0,590	0,230	39,0%	ES	1	0,257	0,190	73,9%
	2	0,853	0,280	33,6%		2	0,363	0,155	42,6%
	3	0,453	0,230	50,7%					
	4	0,570	0,248	43,5%	CI	1	0,288	0,201	69,7%
						2	0,279	0,209	74,4%
HIV	1	0,575	0,283	49,2%		3	0,345	0,205	59,4%
	2	0,411	0,188	45,7%		4	0,560	0,233	43,7%
PPN	1	0,275	0,152	55,2%	TO	1	0,342	0,135	39,4%
	2	0,680	0,254	32,9%		2	0,533	0,171	32,0%
	3	0,523	0,268	51,2%		3	0,284	0,176	61,9%
	4	0,738	0,287	38,9%					
DBS	1	0,386	0,185	47,9%	DC	1	0,909	0,367	41,3%
	2	0,302	0,215	71,1%		2	0,446	0,232	52,0%
	3	0,509	0,243	58,9%		3	0,393	0,160	40,7%
	4	0,538	0,251	46,6%		4	0,567	0,234	41,2%

Grupo: **FLP**- Funcionários do Laboratório de Parasitologia, **HIV**- pacientes soropositivos para HIV, **PPN**- pacientes que fizeram o Pré-Natal, **DBS**- Doadores do Banco de Sangue; Pacientes sororeagentes para Esquistossomose (**ES**), Cisticercose (**CI**), Toxoplasmose (**TO**) e Doença de Chagas (**DC**)

*Soro antes (s/abs) e após absorção (c/abs) dos anticorpos anti-*Cryptosporidium*

Discussão

O *Cryptosporidium* sp é um protozoário oportunista que passou a ter importância como patógeno para os humanos nos anos 80, com o surgimento da epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) (GUIZELINI e AMATO NETO, 1992). Pessoas com imunodeficiência causada pelo vírus HIV representavam um grande grupo de risco para ocorrência da criptosporidiose. Estes desenvolviam quadros graves de diarreia que muitas vezes os levavam à morte (TZIPORI *et al.*, 1986). A introdução da terapia antiretroviral tem diminuído a incidência da criptosporidiose entre os pacientes soropositivos para HIV (KIM *et al.*, 1998).

Para detecção dos oocistos de *Cryptosporidium*, técnicas não invasivas, através de exames de amostras fecais após coloração do esfregaço por técnicas como: Giemsa, Ziehl-Neelsen, Kinyoun e suas modificações têm sido preconizadas (Garcia *et al.*, 1983; de CARLI e SARAIVA, 1991). Essas técnicas se baseiam na concentração de oocistos por centrifugo-sedimentação (técnica de Ritchie modificada) ou flutuação. Neste último caso utilizando-se gradientes de alta densidade preparados com diferentes tipos de soluções: de sacarose (método de Sheather), de cloreto de sódio, de sulfato de zinco (método de Faust) e outros. Métodos que se baseiam na detecção de coproantígenos através do uso de anticorpos policlonais ou monoclonais anti-*C. parvum* como imunofluorescência e ELISA vêm sendo utilizados em alguns laboratórios com bons índices de sensibilidade e especificidade (IGNATIUS *et al.*, 1997; GRACZYK *et al.*, 1996). Técnicas de Imunofluorescência indireta, ELISA e Western blot têm sido utilizadas na detecção de anticorpos IgM, IgG e IgA específicos para o *Cryptosporidium* para monitorar a resposta imune no decorrer da infecção ou realizar estudos epidemiológicos (BRAZ *et al.*, 1996; PRIEST *et al.*, 1999; ZU *et al.*, 1994).

A frequência da criptosporidiose é pouco conhecida em nosso meio, principalmente entre adultos e crianças imunocompetentes, uma vez que a maioria dos trabalhos está relacionada à ocorrência desta protozoose entre os indivíduos imunocomprometidos, principalmente HIV positivos. A técnica sorológica, ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium*, padronizadas no presente trabalho, poderão se constituir em importante ferramenta para aplicação em estudos

epidemiológicos, permitindo identificar melhor, no nosso meio, as áreas e respectivas populações expostas ao risco de contaminação por este agente.

Obtenção de oocistos de *Cryptosporidium parvum*

Infecção do bezerro

O bezerro é o modelo experimental mais utilizado para obtenção de grande quantidade de oocistos, de acordo com a literatura pertinente (BUKHARI e SMITH, 1995; UNGAR *et al.*, 1986). No presente trabalho, foram infectados três bezerros, dois dos quais resultaram em infecções bem sucedidas, com grande quantidade de oocistos eliminados através das fezes. Estes bezerros foram submetidos à infecção com oocistos de *Cryptosporidium* em idade bastante precoce, com menos de 6 dias de vida. A ausência de infecção observada em um dos bezerros pode estar relacionada às condições em que este animal chegou ao laboratório: após ingestão de colostro imune e com mais de dez dias de vida, o que o tornou menos susceptível à infecção pelo *Cryptosporidium*. Jovens bezerros são bastante acometidos pela criptosporidiose e eliminam grande quantidade de oocistos nas fezes. Em um estudo foi demonstrado que o colostro imune bovino, induzido pela imunização de vacas com gestação avançada com proteína recombinante rC7 de *C. parvum*, fornecia proteção aos bezerros infectados com oocistos de *C. parvum*. Esta proteção foi evidenciada pela ausência de diarreia e redução significativa de oocistos nas fezes (PERRYMAN *et al.*, 1999). O desenvolvimento da infecção pelo *C. parvum* vai depender da idade do bezerro. Bezerros com 20 dias de vida podem apresentar ou não sinais de diarreia, com 30 dias de vida estes animais permanecem saudáveis, eliminando oocistos nas fezes apenas de um a dois dias. De acordo com os experimentos dos autores, a idade adequada para o desenvolvimento de infecções experimentais é com bezerros de apenas cinco dias de vida (TZIPORI *et al.*, 1981). A escolha do bezerro como modelo experimental para obtenção de massa de parasitas levou à necessidade de um espaço adequado para a permanência do animal e cuidados especiais antes e principalmente após o início dos sintomas, para evitar contaminação do ambiente com os oocistos eliminados através das fezes diarréicas, que foram armazenadas para posterior processamento e purificação dos oocistos.

Recuperação dos oocistos

Técnicas para concentração e purificação de oocistos foram descritas por alguns autores (UNGAR *et al.*, 1986; BUKHARI e SMITH, 1995; CURRENT, 1990; ARROWOOD e STERLING, 1987; WALDMAN *et al.*, 1986). Entre as técnicas de concentração avaliadas no presente trabalho, utilizando-se diferentes tipos de gradientes (Quadro1, pág 28), a que apresentou resultados melhores nas nossas condições de trabalho, com menor perda de oocistos, foi a técnica que utiliza gradiente de sacarose (de CARLI e SARAIVA, 1991), tendo sido esta a técnica escolhida por nós para a recuperação dos oocistos utilizados no preparo de antígenos para os testes sorológicos.

Entre as dificuldades encontradas nesta etapa do trabalho podem ser citados: perda de oocistos nas diferentes etapas de lavagens durante processamento da amostra fecal e uso de centrífugas com rotores fixos que prejudicam a separação dos oocistos por não formar as camadas de forma nítidas nos gradientes.

A utilização do gradiente de Percoll, embora muito citado na literatura como uma metodologia útil para purificação dos oocistos (ARROWOOD e STERLING, 1987; WALDMAN *et al.*, 1986), em nossas condições laboratoriais os resultados foram pouco satisfatórios. Além do seu alto custo, na película formada entre os dois gradientes onde deveriam estar presentes oocistos limpos em grande quantidade, encontravam-se poucos oocistos e muita sujeira. Na técnica utilizada por UNGAR *et al.*, 1986, com o gradiente de NaCl, ocorreu grande perda de oocistos e deformações na parede dos mesmos devido a alta concentração de NaCl. Embora, bastante utilizada para o diagnóstico clínico, a técnica de concentração utilizando a centrífugo-sedimentação com formol-éter altera a antigenicidade dos oocistos, não sendo adequada para obtenção de antígeno e posterior utilização em reações sorológicas (GARCIA *et al.*, 1983).

Preparo do antígeno

Para o teste sorológico, ELISA e análise do perfil eletroforético do antígeno, o extrato total bruto foi preparado a partir de oocistos purificados com a técnica do

gradiente de sacarose (de CARLI e SARAIVA, 1991), submetidos a rompimento por processo de congelamento e descongelamento (7 ciclos) e ultra-sônico (20 ciclos de 15 segundos a 60 KHz cada), de acordo com procedimento descrito por MOSS e LAMMIE, 1993, com algumas modificações. Entre as modificações introduzidas no procedimento, vale comentar o aumento do número de ciclos do processo ultra-sônico que foi necessário devido às dificuldades para romper a parede dos oocistos. Entretanto, este procedimento precisa ser mais bem avaliado, já que as dificuldades no rompimento da parede dependeram do tempo e forma de armazenamento dos oocistos, tendo sido mais fácil o rompimento daqueles oocistos armazenados por pouco tempo (até dois meses).

Técnica sorológica

Na fase de padronização dos testes sorológicos, soros de indivíduos clinicamente normais, entre eles funcionários e aprimorandos do Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, foram inicialmente avaliados quanto à presença ou não de anticorpos anti-*Cryptosporidium*. Amostras sem anticorpos foram utilizadas como soros controle negativos. Foram selecionadas para serem empregadas como soros controle positivos, amostras que continham anticorpos e eram provenientes de funcionários com história de provável exposição ao *Cryptosporidium*, em função do tipo de trabalho desenvolvido pelo mesmo no Serviço. Oito amostras séricas, com leituras de densidade óptica (D.O.) abaixo de 0,30 no ELISA para *Cryptosporidium*, foram selecionadas para determinação do limiar de reatividade diário (*cut off*), através do cálculo da média das leituras de D.O. das oito amostras acrescidos de dois desvios padrões.

Para sensibilização da placa de ELISA, o antígeno foi titulado utilizando-se concentrações protéicas variando de 2 a 6µg por orifício, tendo sido definida como a quantidade ótima de proteína para sensibilização da placa 3µg/orifício (Tabela 1, pág. 29). Tal escolha se baseou nas leituras de densidades ópticas, de modo que a leitura de D.O. do soro negativo apresentasse um valor abaixo do Limiar de Reatividade (L.R.) e o positivo acima deste valor, utilizando a menor quantidade de antígeno por orifício da placa. Quanto ao conjugado de peroxidase anti-IgG humana, foi inicialmente adotado como título ótimo diluição previamente determinada para

outro sistema parasitário (título de 1:10.000 para antígeno de *Schistosoma mansoni*) e posteriormente confirmado no sistema antigênico de *C. parvum*.

Os resultados de ELISA quanto à frequência de anticorpos anti-*Cryptosporidium*, nos diferentes grupos avaliados (Tabela 2. pág. 30), mostram diferentes níveis de positividade, tendo sido mais elevada nas pacientes que fizeram o Pré-Natal (52,0%), e mais baixa no grupo de funcionários do laboratório de Parasitologia (30%), que teoricamente é o grupo mais exposto, pois alguns deles trabalham com o parasito. A presença destes anticorpos não indicaria infecção ativa e sim possível contato anterior com o parasito, pois pelo menos neste último grupo, submetido a exame parasitológico de fezes, não se demonstrou presença de oocistos de *Cryptosporidium* em nenhuma amostra fecal do grupo FLP.

Na tentativa de se verificar possível ocorrência de reações cruzadas interferindo no teste de ELISA para anticorpos anti-*Cryptosporidium*, foram analisados soros de pacientes com reatividade sorológica para outras parasitoses. Elevadas positivities, 66,6% e 40%, foram observadas entre os pacientes respectivamente com doença de Chagas e Leishmaniose, sendo menor (20%), entre os pacientes com toxoplasmose (Tabela 3. pág. 30). Entretanto, é difícil saber se estes índices de positividade refletem reações cruzadas ou exposição simultânea aos dois parasitas, já que as taxas de positividade sorológica para criptosporidiose variam muito, sendo mais elevadas nas comunidades mais carentes, onde as condições de higiene são mais precárias.

Um estudo feito no Peru e Venezuela, incluindo pessoas com infecção assintomática e que excretam baixo número de oocistos nas fezes, sugere que a criptosporidiose é endêmica nestes países. A prevalência de anticorpos IgG para *Cryptosporidium* foi de 64% para comunidades no Peru e Venezuela. A presença de anticorpos IgG não necessariamente indica infecção, mas implica que o indivíduo foi infectado em algum momento de sua vida e sugere que os indivíduos nestas comunidades têm sido frequentemente expostos (UNGAR *et al.*, 1986). Em outras investigações têm sido observado alta frequência de anticorpos IgG para *Cryptosporidium* sendo: 17% em um hospital nos Estados Unidos e 26% das

amostras de soros aleatoriamente selecionadas de dois laboratórios na Inglaterra (TZIPORI *et al.*, 1981; KOCH *et al.*, 1984; CASEMORE *et al.*, 1987).

Em estudo feito em San Antonio, numa comunidade localizada entre o Texas e o México, a freqüência de anticorpos para *Cryptosporidium* em crianças aumenta com a idade. Crianças com idade de zero a 4 anos apresentavam freqüência de anticorpos de 82%, de 5 a 8 anos 85% e 9 a 13 anos 97%. Estas crianças vivem entre famílias de baixa renda, em condições sanitárias precárias e consomem água municipal (LEACH *et al.*, 2000).

Toxoplasma gondii é o protozoário causador de infecção oportunista mais freqüente em pessoas com imunocomprometimento. Aproximadamente 50% da população mundial é infectada com *T. gondii*. Tendo em vista a proximidade filogenética entre os gêneros *Cryptosporidium* e *Toxoplasma*, pertencendo ambos ao grupo de coccídios, com ciclos biológicos muito semelhantes, foi feito um estudo para verificar possíveis reações cruzadas entre as duas espécies de coccídios. No caso do *Toxoplasma gondii*, a fase intestinal ocorre no gato, enquanto o *Cryptosporidium* atinge diferentes espécies de animais mamíferos e aves (CESBRON-DELAUW, 1994). Neste estudo, os mesmos soros avaliados para presença de anticorpos anti-*Cryptosporidium* foram submetidos ao teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma* (Tabela 4. pág. 31). A baixa freqüência de anticorpos anti-*Toxoplasma* entre as pacientes que fizeram o Pré-Natal (14,6%), quando comparada à alta freqüência para anticorpos anti-*Cryptosporidium* (52,0%), sinalizam para uma provável ausência de reações cruzadas entre os dois antígenos. Entre as diferentes amostras séricas avaliadas, apenas quatro foram positivas para ambos os testes, sendo duas amostras provenientes de pacientes HIV positivos (Tabela 6. pág. 32), uma de paciente Pré-Natal (Tabela 7 pág. 32) e uma do Banco de Sangue (Tabela 8 pág. 32), o que indicaria provável ausência de reações cruzadas. De acordo com a bibliografia consultada, não há reações cruzadas com outras parasitoses (UNGAR *et al.*, 1986; BRAZ *et al.*, 1996; MOSS *et al.*, 1998).

Foram feitos também estudos para definir as condições ideais para absorção de anticorpos IgG anti-*Cryptosporidium* e avaliadas algumas amostras séricas antes

e após absorção, para confirmar a especificidade dos anticorpos detectados pelo teste de ELISA-*Cryptosporidium*. (Quadro 2. pág. 35). As leituras de densidade óptica (D.O.) no ELISA -*Cryptosporidium*, obtidas após absorção, encontravam-se abaixo do limiar de reatividade do dia, indicando provável reação específica para o *Cryptosporidium*. Por outro lado, a absorção de anticorpos anti-*Cryptosporidium* não interferiu na reatividade obtida no ELISA para *Toxoplasma*, ou mesmo na RIF para doença de Chagas.

Quanto à reprodutibilidade do teste ELISA, esta foi avaliada verificando-se o título do soro controle positivo e as variações nas leituras de D.O. em dias diferentes, determinando-se o limiar de reatividade a cada dia de reação, através do cálculo da média das leituras de D.O. das oito amostras selecionadas como soros controle negativos (figura 1. pág. 34). A variação no título do soro controle positivo foi de 1:200 a 1:400.

O ELISA para detecção de anticorpos anti-*Cryptosporidium*, como padronizado no presente trabalho, pode constituir uma ferramenta importante para estudos epidemiológicos da criptosporidiose.

Em estudos soroepidemiológicos, pode-se utilizar o teste ELISA para verificar a frequência de anticorpos anti-*Cryptosporidium* e o grau de exposição ao parasito em uma população. Com estes dados pode-se investigar fontes de infecção de *Cryptosporidium* as quais a população está sendo exposta e determinar medidas de combate aos focos de infecção como, melhoria do sistema de tratamento de água e das condições sanitárias em que vive esta população.

Conclusões

- Na obtenção de oocistos, as infecções bem sucedidas com grande quantidade de oocistos nas fezes ocorreram em bezerros com menos de seis dias de vida.
- Entre as técnicas de concentração avaliadas no presente trabalho, a que apresentou maior rendimento de oocistos, foi a técnica que utiliza gradiente de sacarose como descrita por de CARLI e SARAIVA (1991).
- Os resultados do ELISA quanto à frequência de anticorpos anti-*Cryptosporidium*, nos diferentes grupos de soros avaliados, mostram diferentes níveis de positividade, variando de 20,0% a 66,0%.
- Na padronização da absorção de anticorpos anti-*Cryptosporidium*, as leituras de D.O. no ELISA obtidas após absorção de anticorpos nos soros positivos, reagentes para parasitoses heterólogas, encontravam-se abaixo do Limiar de Reatividade do dia, indicando reação específica.

Referências bibliográficas¹

- ARROWOOD, M.J.; STERLING, C.R. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. **J. Parasitol.**, Lawrence, v.73, n.2, p.314-319, 1987.
- ANGUISH, L.J.; GHIORSE, W.C. Computer assisted scanning and video microscopy for analysis of *Cryptosporidium* oocysts in soil, sediment, and feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.63, p.724-733, 1997.
- BENHAMOU, Y.; KAPEL, N.; HOANG, C.; MATTA, H.; MEILLET, D.; MAGNE, D.; RAPHAEL, M.; GENTILINI, M.; OPOLON, P.; GORBERT, J. Inefficacy of intestinal secretory immune response to *Cryptosporidium* in Acquired Immunodeficiency Syndrome. **Gastroenterology**, Orlando, v.108, p.627-635, 1995.
- BRAZ, L.M.A.; AMATO, N.V.; FERRARI, C.I.L.; PALHARES, M.C.A.; AMATO, V.S.; SANTOS, M.T.F.; MARQUES, H.H.S.; VALLADA, M.; NAKANISHI, L.S.S.; ANDRADE Jr., H.F. Human cryptosporidiosis: detection of specific antibodies in the serum by an indirect Immunofluorescence. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.30, n.5, p.395-402, 1996.
- BREA HERNANDO, A.J.; BANDRES, F.E.; MOSQUERA, L.J.D.; LANTERO, B.M.; EZQUERRA, L.M. Cryptosporidiosis pulmonary SIDA. Presentación de um caso y revisión de la literatura. **Ann. Inter. Med.**, Philadelphia, v.10, p.232-236, 1993.

¹ De acordo com a norma NBR 6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviações dos títulos dos periódicos seguem CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 2002.

- BUKHARI, Z.; SMITH, H.V. Effect of three concentration, techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts, recovered from bovine feces. **J. Clin. Microbiol.**, Wiesbaden, v.33, n.10, p.2592-2595, 1995.
- CAMPBELL, P.; CURRENT, W. Demonstration of serum antibodies to *Cryptosporidium* sp in normal and immunodeficient humans with confirmed infections. **J. Clin. Microbiol.**, Wiesbaden, v.18, p.165-169, 1983.
- CASEMORE, D.P. The antibody response to *Cryptosporidium* development of a serological test and its use in a study of immunologically normal persons. **J. Infect.**, United Kingdom, v.14, p.125-134, 1987.
- CESBRON-DELAUW, M.F. Dense granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. **Parasitol. Today**, v.10, p.296, 1994.
- CDC. Cryptosporidiosis: assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **M.M.W.R.** v.31, p.589-592, 1982.
- CURRENT, W.L.; HAYNES, T.B. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. **Science**, Washington, v.224, p.603-605, 1984.
- CURRENT, W.L. Tecniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: DUBEY, J.P.; SPEER, C.A.; FAYER, R. **Cryptosporidiosis of man and animals**. Boca Raton: CRC Press, 1990. cap. 2, p.31-49.
- D'ANTONIO, R.G.; WINN, R.E.; TAYLOR, J.P. A waterborne outbreak of Cryptosporidiosis in normal hosts. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.103, p.886-888, 1985.
- de CARLI, G.; SARAIVA, P.J. Diagnóstico de laboratório da Criptosporidiose humana. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, Rio de Janeiro, v.23, n.2, p.26-30, 1991.

DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COULOMBIER, D.; BRENDEN, K.A.; SMITH, D.C.; BURTON, H.; DICKER, R.C.; SULLIVAN, K.M.; FARGAN, R.F.; ARNER, T.G. Epi Info, version 6: a word processing, database, and statistics programa for public health on IBM-compatible microcomputers. C.D.C., Atlanta, Georgia, U.S.A., 1995.

DUBEY, J.P.; SPEER, C.A; FAYER R. **Cryptosporidiosis os man and animals**. Boston: CRC Press, 1990. p.199.

DUPONT, H.; CHAPPELL, C.; STERLING, C.; OKHUYSEN, P.; ROSE, J.; JAKUBOWSKI, W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.332, p.855-859, 1995.

EICHELBERGER, M.; SURESH, P.; REHG, J. Protection from *Cryptosporidium parvum* infection by $\gamma\delta$ T cell in mice that lack $\alpha\beta$ T cells. **Comp. Med.**, Memphis, v.50, p.270-276, 2000.

FAYER, R.; PERRYMAN, L.; RIGGS, M. Hyperimmune bovine colostrum neutralizes *Cryptosporidium* sporozoites and protects mice against oocysts challenge. **J. Parasitol.**, Lawrence, v.75, p.151-153, 1989a.

FAYER, R.; ANDREWS, C.; UNGAR, B.; BLAGBURN, B. Efficacy of hyperimmune bovine colostrums for prophylaxis of cryptosporidiosis. **J. Parasitol.**, Lawrence, v.75, p.393-397, 1989.

FAYER, R.; TROUT, J.M.; JENKINS, M.C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. **J. Parasitol.**, Lawrence, v.84, p.1165-1169, 1998.

FRANCO, R.M.B.; EBERHARDT, R.R.; CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.43, n.2, p.109-111, 2001.

- FRAZEN, C.; MULLER, A. Cryptosporidia and microsporidia: waterborne diseases in the immunocompromised host. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.34, p.245-62, 1999.
- FRICKER, C.R.; CRABB, J.H. Water-borne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options. In: TZIPORI, S., ed. Opportunistic protozoa in humans. **Advances in Parasitology**. Academic Press, 1998. p.241-278 (Advances in Parasitology, v.40).
- FROST, F.J.; CALDERON, R.L.; MULLER, T.B.; CURRY, M.; RODMAN, J.S.; MOSS, D.M.; DE LA CRUZ, A.A. A two-year follow-up survey of antibody to *Cryptosporidium* in Jackson County, Oregon following an outbreak of waterborne disease. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.121, n.1, p.213-217, 1998a.
- FROST, F.J.; DE LA CRUZ, A.A.; MOSS, D.M.; CURRY, M.; CALDERON, R.L. Comparisons of ELISA and Western blot assays for detection of *Cryptosporidium* antibody. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v.121, p.205-211, 1998b.
- GARCIA, L.S.; BRUCKNER, D.A.; BREWER, T.C.; SHIMIZU, R.Y. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Wiesbaden, v.18, p.185-190, 1983.
- GARCIA, L.S.; SHIMIZU, R.Y. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Wiesbaden, v.35, n.6, p.1526-1529, 1997.
- 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*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.54, p.274-279, 1996.

- GUIZELINI, E.; AMATO, N.V. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium sp* nas fezes diarreicas de aidéticos e adultos imunocompetentes, em São Paulo. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med.** São Paulo., v.47, n.3, p.150-152, 1992.
- HEINE, J.; MOON, H.; WOODMANSEE, D. Persistent *Cryptosporidium* infection in congenitally athymic (nude) mice. **Infect. Immun.**, Washington, v.43, p.856- 859, 1984.
- HOJLYNG, N.; MOLBALK, K.; JEPSEN, S. Cryptosporidiosis in Liberian children. **Lancet**, London, v.1, p.734, 1984.
- IGNATIUS, R.; EISENBLÄTTER, M.; REGNATH, T.; MANSMANN, V.; FITH, V.; HAHN, H.; WAGNER, J. Efficacy of different methods for detection of low *Cryptosporidium parvum* oocysts numbers or antigen concentration in stool specimens. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Berlin, v.16, p.732-736, 1997.
- ISAAC-RENTON, J.; BLATHERWICK, J.; BOWIE, W.R.; FYFE, M.; KHAN, M.; LI, A.; KING, A.; McLEAN, M.; MEDD, L.; MOOREHEAD, W.; ONG, C.S.; ROBERTSON, W. Epidemic and endemic seroprevalence of antibodies to *Cryptosporidium* and *Giardia* in residents of three communities with different drinking water supplies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.4, p.578-83, 1999.
- JANOFF, E.N.; RELLER, L.B. *Cryptosporidium* species, a protean protozoan. **J. Clin. Microbiol.**, Wiesbaden, v.25, p.967-975, 1987.
- JENSEN, B.N.A.; GERSTOFT, J.; HOJLYNG, N.; BACKER, V.; PAASKE, M.; GOMME, G.; SKINHOJ, P. Pulmonary pathogens in HIV- infect patients. **Scand. J. Infect. Dis.**, Basingstoke, v.22, p.413-420, 1990.
- KIM, L.S.; HADLEY, W.K.; STANSELL, J.; CELLO, J.P.; KOCH, J. Declining prevalence of cryptosporidiosis in San Francisco. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.27, p.655-656, 1998.

- KIRKPATRICK, B.D.; DANIELS, M.M.; JEAN, S.S.; PAPE, J.W.; KARP, C.; LITTENBERG, B.; FITZGERALD, D.W.; LEDERMAN, H.M.; NATARO, J.P.; SEARS, C.L. Cryptosporidiosis stimulates an inflammatory intestinal response in malnourished Haitian children. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.186, p.94- 101, 2002.
- KOCH, K.L.; PHILLIPS, D.J.; ABER, R.C.; CURRENT, W.L. Cryptosporidiosis in hospital personnel: evidence for person-to-person transmission. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.102, p.593-596, 1984.
- LEAN, I.S.; MADONALD, V.; POLLOK, R.C.G. The role of cytokines in the pathogenesis of *Cryptosporidium* infection. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, London, v.15, p.229- 234, 2002.
- LEACH, C.T.; KOO, F.C.; KUHLS, T.L.; HILSENEECK, S.G.; JENSON, H.B. Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in children along the Texas-Mexico border and associated risk factors. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.62, n.5, p.656-661, 2000.
- LIMA, J.D. *Sarcocystis, Isospora e Cryptosporidium* In: NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. São Paulo: Atheneu, 2002. p.157- 163.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1956.
- LUMB, R.; SMITH, K.; O'DONOGHUE, P.J.; LANSER, J. Ultrastructure of the attachment of *Cryptosporidium* sporozoites to tissue culture cells. **Parasitol Res.**, Berlin, v.74, p.531- 536, 1988.
- MACDONALD, V.; DEER, R.; UNI, S.; ISEKI, M.; BANCROFT, G. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (Nude and SCID) mice. **Infect. Immun.**, Washington, v.60, p.3325-3331, 1992.

- MACKENZIE, W.; HOXIE, N.; PROCTOR, M.; GRADUS, S.; BLAIR, K.; PETERSON, D.; KAZMIERCZAR, J.; ADDIS, D.; FOX, K.; ROSE, J.; DAVIS, J. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.331, p.161-167, 1994.
- MARTINEZ, I.; BELDA NETO, F.M. Contribution to the laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo., v.43, n.2, p.79-82, 2001.
- MODIGLIANI, R.; BORIS C.; CHARPENTIER, J.; SALMERON, M.; MISSING, B.; GALIAN, A.; RAMBAUD, J.; LAVERGNE, A.; COCHAND, B.; DESPORTES, I. Diarrhea and malabsorption in acquired immune deficiency syndrome: a study of four cases with special emphasis on opportunistic protozoan infestation. **Gut**, London, v.26, p.179-187, 1985.
- MORGAN-RYAN, U.M.; FALL, A.; WARD, A.; HIJJAWI, N.; SULAIMAN, I.; FAYER, R.; THOMPSON, A.R.C.; OLSON, M.; LAL, A.; XIAO, L. *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.49, n.6, p.433-440, 2002.
- MOSS, D.M.; BENNETT, S.N.; ARROWOOD, M.J. Kinetic and isotypic analysis of specific immunoglobulins from crew members with Cryptosporidiosis on a Us Coast Guard cutter. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v.41, p.52S-55S, 1994.
- MOSS, D.M.; CHAPPEL, 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 infection in humans. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.178, n.3, p.827-833, 1998.
- MOSS, D.M.; LAMMIE, P.J. Proliferative responsiveness of lymphocytes from *Cryptosporidium parvum*-exposed mice to two separate antigen fractions from oocysts. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.49, p.393, 1993.

- MULLER, A. **Detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. em águas de abastecimento superficiais e tratadas da região metropolitana de São Paulo.** São Paulo, 1999. 117p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo.
- NANDURI, J.; WILLIAMS, S.; AJI, T.; FLANIGAN, T. Characterization of an immunogenic glycocalyx on the surfaces of *Cryptosporidium parvum* oocysts and sorozoites. **Infect. Immun.**, Washington, v.67, p.2022-2024, 1999.
- NAVIN, T.R.; JURANEK, D.D. Cryptosporidiosis clinical, epidemiologic and parasitologic review. **Rev. Infect. Dis.**, Armonk, v.6, p.313-327, 1984.
- NEWMAN, R.D.; WUHIB, T.; LIMA, A.A.M.; GUERRANT, R.L.; SEARS, C.L. Enviromental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brasil. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.49, n.2, p.270- 275, 1993.
- O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. **Int. J. Parasitol.**, Kidlington, v.25, p.139-195, 1995.
- O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. In: TZIPORI, S. e GRIFFITHS, J.K., eds. London: Academic Press, 1998. p.6-29 (Advances in Parasitology Opportunistic Protozoa in humans, v.40).
- OKHUYSEN, P.C.; CHAPPEL, C.L.; STERLING, C.R.; JAKUBOWSKI, W.; DuPONT H.L. Susceptibility and serologic response of health adults to reinfection with *Cryptosporidium parvum*. **Infect. Immun.**, Washington, v.66, n.2, p.441-443, 1998.
- OKHUYSEN, P.C.; CHAPPEL, C.L.; CRABB, J.H.; STERLING, C.R.; DUPONT, H.L. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for heathy adults. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.180, p.1275-1281, 1999.

- ORTEGA, Y.R.; SHEEHY, R.R.; CAMA, V.A; OISHI, K.K.; STERLING, C.R. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates of bovine and human origin. **J. Protozool.**, v.38, p.40S-41S, 1991.
- ORTEGA-MORA, L.; TRONCOSO, J.; ROJO-VAZQUEZ, P. Identification of *Cryptosporidium parvum* oocysts/sporozoites antigens recognized by infected and hyperimmune lambs. **Veter. Parasitol.**, v.53, p.159-166, 1994.
- PERRYMAN, L.E.; MASON, P.; CHRISP, P. Effect of spleen cell population on resolution of *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice. **Infect. Immun.**, Washington, v. 62, p.1474-1477, 1994.
- 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.**, Kidlington, v.17, p.2142-2149, 1999.
- PIENIAZEK, N. J.; BORNAY-LLINARES, F.J.; SLEMENDA, S.B.; SILVA, A.J.; MOURA, I.N.S.; ARROWOOD, M.J.; DITRICH, O.; ADDISS, G. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV-infected persons. **Rep. Emerg. Infect. Dis.**, v.5, n.3, p.444-449, 1999.
- PRIEST, J.W.; KWON, J.P.; MOSS, D.M.; ROBERTS, J.M.; ARROWOOD, M.J.; DWORKIN, M.S.; JURANEK, D.D.; LAMMIE, P.J. Detection by enzyme immunoassay of serum immunoglobulin G antibodies that recognize specific *Cryptosporidium parvum* antigens. **J. Clin. Microbiol.**, Wiesbaden, v.37, n.5, p.1385-1392, 1999.
- RIGGS, M.; CAMA, V.; LEARY, J.R.; STERLING, C. Bovine antibody against *Cryptosporidium parvum* elicits a circumsporozoite precipitate like reaction and has immunotherapeutic effect against persistent cryptosporidiosis in SCID mice. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, p.1927-1939, 1994.

- RUMP, J.A.; ARNDT, R.; ARNOLD, A.; BENDICK, C.; DICHTELMÜLLER, H.; FRANKE, M.; HELM, E.B.; JÄGER, H.; KAMPMANN, B.; KOLB, P.; KREUZ, W.; LISSNER, R.; MEIGEL, W.; OSTENDORF, P.; PETER, H.H.; PLETTENBERG, A.; SCHEDEL, L.; STELLBRINK, H.W.; STEPHAN, W. Treatment of diarrhoea in human immunodeficiency virus – infected patients with immunoglobulins from bovine colostrum. **Clin. Invest.**, v.70, p.588-594, 1992.
- SALLON, S.; DECKELBAUM, R.J.; SCHMID, I.I.; HARLAP, S.; BARAS, M.; SPIRA, D.T. *Cryptosporidium*, malnutrition, and chronic diarrhea in children. **A.J.D.C.**, v.142, p.312-315, 1988.
- SMITH, P.D.; QUINN, T.C.; STROBER, W.; JANOFF, E.N.; MASUR, R. Gastrointestinal infections in AIDS. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.116, p.63-77, 1992.
- SOAVE, R.; ARMSTRONG, D. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. **Rev. Infect. Dis.**, v.8, p.1012-1023, 1986.
- SULAIMAN, I.; XIAO, L.; LAL, A. Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.65, p.4431-4435, 1999.
- TYZZER, E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Maywood, v.5, p.12-13, 1907.
- TZIPORI, S.; ANGUS, K.W.; GRAY, E.W.; CAMPBELL, I. Diarrhea in lambs experimentally infected with *Cryptosporidium* isolated from calves. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v.42, n.8, p.1400-1403, 1981.
- TZIPORI, S.; SMITH, M.; BIRCH, C. *Cryptosporidium* in hospital patients with gastroenteritis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.32, p.931-934, 1983.
- TZIPORI, S.; ROBERTON, D.; CHAPMAN, C. Remission of diarrhoea due to cryptosporidiosis in an immunodeficient child treated with hyperimmune bovine colostrum. **Br. Med. J.**, v.293, p.1276-1277, 1986.

TZIPORI, S. Cryptosporidiosis in perspective. **Adv. Parasitol.**, London, v.27, p.63-129, 1988.

TZIPORI, S.; RAND, W.; GRIFFITHS, J.; WIDMER, G.; CRABB, J. Evaluation of an animal model system for cryptosporidiosis, therapeutic efficacy of paromomycin and hyperimmune bovine colostrum-immunoglobulin. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v.1, p.450-463, 1994.

TZIPORI, S.; GRIFFITHS, J.K. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum* In: TZIPORI, S., ed. London: Academic Press, 1998. p.6-29. (Advances in Parasitology Opportunistic protozoa in humans, v.40).

URBAN, J.; FAYER, R.; CHEN, S.; GAUSE, W.; GATELY, M.; FINKELMAN, F. IL-12 protects immunocompetent and immunodeficient neonatal mice against infection with *Cryptosporidium parvum* . **J. Immunol.**, Bethesda, v.156, p.263- 268, 1996.

UNGAR, B.L.P.; SOAVE, R.; NASH, T.E. Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.153, n.3, p.570-578, 1986.

UNGAR, B.L.P.; GILMAN, R.H.; LANATA, C.F.; SCHAEEL, I.P. Seroepidemiology of *Cryptosporidium* infection in two Latin American populations. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.157, n.3, p.551-556, 1988.

UNGAR, B.; BURRIS, J.; QUINN, C.; FINKELMAN, F. New mouse models for chronic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts. **Infect. Immun.**, Washington, v.58, p.961-969, 1990.

UNGAR, B.; KAO, T.; BURRIS, J.; FINKELMAN, F. *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model independent roles for IFN- γ and CD₄⁺ lymphocytes in protective immunity. **J. Immunol.**, Bethesda, v.147, p.1014-1022, 1991.

- WALDMAN, E.; TZIPORI, S.; FORSYTH, J.R.L. Separation of *Cryptosporidium* species oocysts from feces by using a Percoll Descontinuous Density Gradient. **J. Clin. Microbiol.**, Wiesbaden, v.23, p.199-200, 1986.
- WEBSTER, K.A.; POW, J.D.E.; GILES, M.; CATCHPOLE, J.; WOODWARD, M.J. Detection of *Cryptosporidium parvum* using specific polymerase chain reaction. **Vet. Parasitol.**, v.50, p.35-44, 1993.
- WOLFSON, J.; RICHTER, J.; WALDRON, M.; WEBER, D.; MCCARTHY, D.; HOPKINS, C. Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.312, p.1278-1282, 1985.
- ZU, S.X.; LI, J.F.; BARRETT, L.J. Seroepidemiologic study of *Cryptosporidium* infection in children from rural communities of Anhui China and Fortaleza, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.51, p.1-10, 1994.

Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO APÓS-INFORMAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Padronização e avaliação de método sorológico ELISA para detecção de anticorpos anti-*Cryptosporidium* sp.

Pesquisadores Responsáveis pelo Projeto: Aluna de Mestrado Angélica Maria Casimiro e Profa. Dra. Herminia Yohko Kanamura (Orientadora)

Este projeto tem como objetivo estudar técnicas de laboratório para diagnóstico da criptosporidiose e verificar seu valor para estudos epidemiológicos.

Serão colhidas amostras de sangue venoso para obtenção de soros a serem utilizados como controles positivos e negativos para os testes de detecção de anticorpos contra o parasita *Cryptosporidium parvum*, agente da criptosporidiose.

Não há risco envolvido em qualquer das coletas mencionadas, apenas um pequeno desconforto na hora da picada. Todo o material utilizado na coleta das amostras será descartável, não havendo risco de adquirir outras doenças. Se você achar que não deve dar este consentimento, não haverá nenhum prejuízo para você. Os resultados dos exames lhes serão fornecidos, quando prontos e solicitados por você ou seu médico, e asseguramos que eles serão mantidos em sigilo.

Nome do paciente:.....

Registro:.....

Declaro que, após convenientemente esclarecido e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente estudo.

São Paulo,..... de..... de 200...

Assinatura do participante ou responsável legal

Nome R.G.:

Endereço:.....

Assinatura do responsável pela coleta do sangue

Nome legível e R.G.:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião de 24 de fevereiro de 2003, **aprovou** o projeto “Padronização e avaliação de métodos sorológicos (ELISA e Western blot) para detecção de anticorpos anti-*Cryptosporidium*, para aplicação em estudos epidemiológicos”, apresentado pela pesquisa **Angélica Maria Casimiro**.

Informamos que, após a execução de 50% do cronograma do projeto, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97, a pesquisadora deverá apresentar um relatório parcial.

São Paulo, 10 de junho de 2003.

Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

Anexo 3

Preparo de soluções:**Tampão Carbonato – bicarbonato 0,05M pH 9,6**

Carbonato	1,59g
Bicarbonato	2,93g
Azida sódica	0,2g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000mL

Tampão Citrato – Fosfato

Ácido cítrico 0,1 M	24,3g
Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O 0,2 M	25,7g
H ₂ O destilada q.s.p.	100mL

Solução cromógena

Tampão Citrato – Fosfato	50 mL
Orto fenileno diamino (OPD)	0,02g

Solução tamponada com fosfatos (STF pH 7,4)

NaCl	8,0g
KH ₂ HPO ₄	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,14g
KCl	0,2g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000mL

Tampão de lavagem (STF-T)

STF pH 7,4	1000mL
Tween 20	0,5mL

Tampão de bloqueio (STF-L)

STF pH 7,4	100mL
Leite desnatado em pó	1,0g

Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 2N

H_2SO_4	56,11mL
H_2O destilada q.s.p.	1000mL

Solução HCl - 4N

HCl	170mL
H_2O destilada q.s.p.	330mL

Anexo 4

Protocolo para determinação de Proteínas – Método de Lowry (1956)

Preparar:

5mg de BSA + 5mL de água bi-destilada

1 parte de solução de sulfato de cobre + 9 partes de reagente alcalino

Tubos	Água bi-destilada	BSA	Amostra	Reagente alcalino + Sulfato de cobre
Padrão	0,95mL	0,05mL	-	1,25mL
Amostra	0,95mL	-	0,05	1,25mL
Branco	1,0mL	-	-	1,25mL

Esperar 15 minutos em temperatura ambiente

Reagente de Folin (reativo para fenol) Folin Ciocalteu

1mL de Reagente de Folin + 2mL de água bi-destilada

Adicionar 0,25mL em cada tubo.

Esperar 15 minutos em Temperatura ambiente.

Efetuar a leitura em espectrofotômetro a 700 nm

Aplicar a seguinte fórmula:

Concentração da amostra (mg %) = concentração padrão (mg %) x D.O. amostra /
D.O. padrão.