

Criptosporidiose em camundongos imunodeficientes

Dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp em linhagens de camundongos imunodeficientes

Delma Pegolo Alves

Doutoranda do Depto de Parasitologia
IB - Unicamp
Diretora Associada do CEMIB
Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
delma@cemib.unicamp.br

Maria Helena Seabra Soares de Britto

Mestre em Imunologia - Unicamp
Doutoranda do Depto de Parasitologia
IB - Unicamp
Professora do Depto de Farmácia da
Universidade Federal do Maranhão
mbssb@elo.com.br

Ana Maria Aparecida Guaraldo

Profª Drª do Instituto de Biologia
Departamento de Parasitologia - Unicamp
Diretora do CEMIB - Centro Multidisciplinar para
Investigação Biológica
guaraldo@cemib.unicamp.br

Fotos cedidas pelos autores

1. Introdução

Em 1907, TYZZER descreveu *Cryptosporidium muris* para designar um pequeno protozoário coccídeo, encontrado nas glândulas gástricas de camundongo. Posteriormente, em 1912, TYZZER descreveu uma nova espécie *Cryptosporidium parvum*. Por meio de infecção experimental em camundongos, ele demonstrou que *C. parvum* desenvolvia somente no intestino delgado, e os oocistos eram menores em relação aos oocistos do *C. muris*. (FAYER et al, 1997).

Somente em 1976 foram relatados os dois primeiros casos de criptosporidiose humana, sugerindo um comportamento oportunista do parasito em indivíduos imunocomprometidos (NIME et al, 1976).

Em indivíduos imunocompetentes e com sistema imunológico comprometido, a criptosporidiose é reconhecida como uma importante doença diarreica. Geralmente a infecção pode ser assintomática em indivíduos imunocompetentes, enquanto nos indivíduos portadores de HIV ou outras desordens imunológicas, freqüentemente a infecção se torna crônica (TZIPORI et al, 1986).

As características clínicas da criptosporidiose são bem descritas. A doença pode apresentar quatro formas: assintomática, importante por causar a transmissão endêmica, transitória ocorrendo em indivíduos imunocompetentes, com período de incubação de 6 dias e uma duração de 2 a 30 dias. Na forma sintomática são freqüentes a anorexia, diarreia aquosa, desconforto abdominal e febre. A forma crônica é comum nos pacientes

HIV positivos, levando à desidratação e agravamento clínico em indivíduos desnutridos. A forma fulminante é exclusiva de pacientes HIV positivos ou imunossuprimidos devido à terapêutica, apresentando-se como uma doença semelhante ao cólera (GRIF-FITHS, 1998).

Morgan-Ryan et al, 2002, descreveram uma nova espécie de *Cryptosporidium*, designando a de genótipo humano de *C. parvum*, genótipo 1 ou genótipo H. Considerando as diferenças biológicas e moleculares, esta nova espécie foi denominada: *Cryptosporidium hominis*.

Alguns estudos consideram que esta nova espécie não infecta camundongos, ratos, cães e bezerros. Porém, a infecção com o *C. hominis* foi reportada em mamífero marinho *Dugong dugon* e ovelhas, experimentalmente foi demonstrada em ovelhas, gado e leitões (XIAO et al., 2004).

Os surtos de criptosporidiose têm ocorrido devido a transmissão do *C. parvum* pela água, pois os oocistos não são retidos pelos sistemas de filtros no tratamento da água e são resistentes aos produtos desinfetantes (SMITH & ROSE, 1998).

Um dos maiores surtos de criptosporidiose já registrado ocorreu em abril de 1993, nos Estados Unidos, na cidade de Milwaukee, onde aproximadamente 400.000 pessoas foram infectadas com oocistos de *Cryptosporidium parvum* veiculados pela água (MCKENZIE et al, 1994).

Franco et al, 2001, realizaram uma investigação sobre a ocorrência de oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*, na Região Sudeste do Bra-

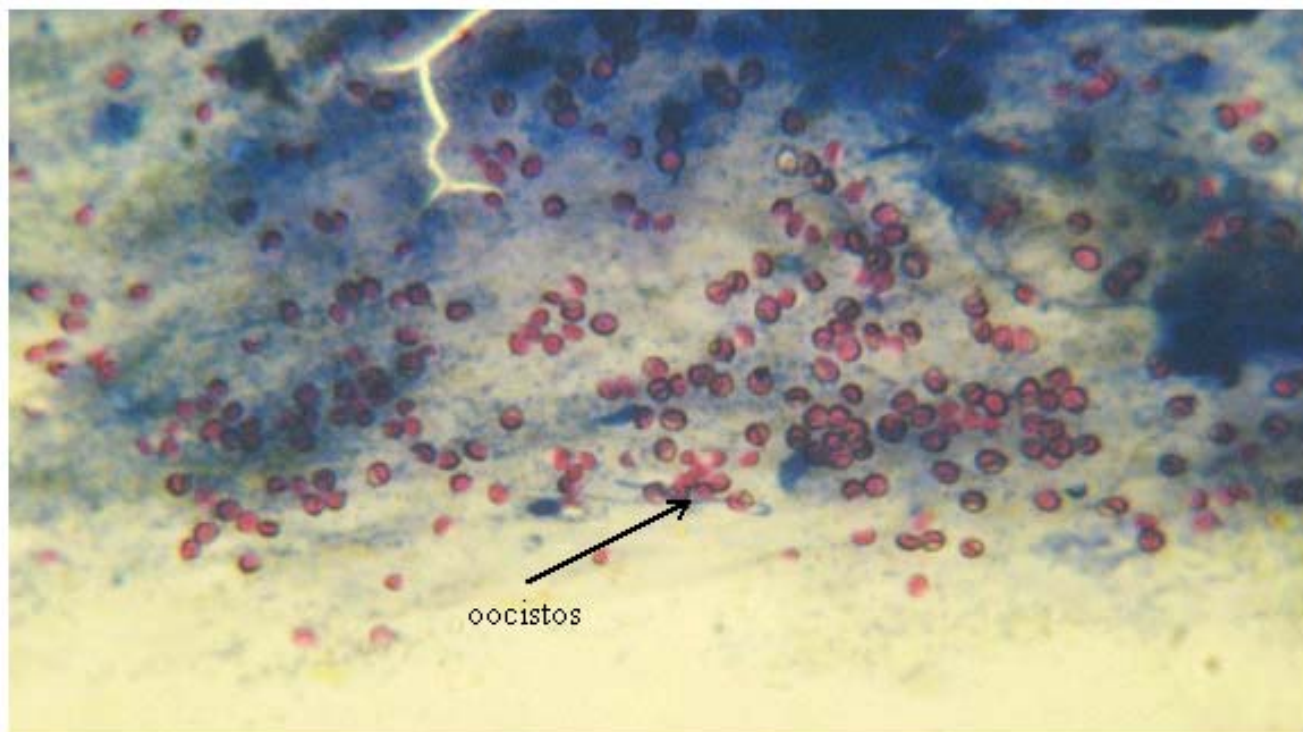


Figura 1: Oocistos da linhagem humana MMC de *Cryptosporidium* sp em esfregaço de suspensão fecal de camundongos neonatos da linhagem BALB/c/Uni. Coloração Ziehl-Neelsen. Aumento 40X

sil, em água superficial do rio Atibaia. Os autores relataram que todas as amostras examinadas foram positivas para ambos os protozoários.

Experimentalmente a criptosporidiose ocorre em animais de laboratório que são imunologicamente imaturos, ratos tratados com drogas imunossupressoras, camundongos atímicos, camundongos tratados com anticorpos anti-CD4, camundongos NIH-III (bg/nu/xid) e camundongos bg (TZIPORI & GRIFFITHS, 1998).

Um problema associado com o estudo experimental da criptosporidiose em mamíferos é que muitas espécies de hospedeiros são suscetíveis à infecção com *C. parvum* durante as três primeiras semanas de vida (UNGAR et al, 1990). Os camundongos imunocompetentes das linhagens BALB/c e C57BL/6 infectados ao nascer, apresentam resolução da infecção no decorrer da maturação do sistema imunológico e da colonização da microbiota associada (HARP et al, 1988).

ENRIQUEZ & STERLING (1991) se propuseram a identificar um modelo animal com potencial de uso para o estudo da infecção pelo *C. parvum*. Para tanto, avaliaram 19 linhagens diferentes de camundongos adultos e

uma de gerbil (*Meriones unguiculatus*). Os resultados mostraram que somente os camundongos bege (C57BL/6J-bg^l), apresentaram números significantes de oocistos no 7º dia após a infecção.

O modelo *scid* torna-se importante por se infectar cronicamente com *C. parvum* e desenvolver sintomas similares aos apresentados por pacientes com imunodeficiência (MEAD, et al, 1991). Camundongos *scid* tratados com anti-interferon-gama são usados para o estudo da infecção pelo *C. parvum*, na fase aguda durante os vinte primeiros dias após o desafio com o *C. parvum*, quando a infecção é limitada ao trato gastrointestinal. Na fase crônica da doença, do 32º ao 47º dias após a infecção pelo *C. parvum*, ocorre comprometimento hepatobiliar e dos ductos pancreáticos (TZIPORI et al, 1995).

Os camundongos knockout (KO) para IFN- γ (interferon-gama), são utilizados para o estudo da criptosporidiose, devido ao desenvolvimento de sinais clínicos e perda de peso. Estes animais se infectam com baixas doses de oocistos de *C. parvum*, com apenas 10 oocistos o animal desenvolve a infecção, tornando-se um modelo

importante para avaliação de drogas terapêuticas (GRIFFITHS et al, 1998).

Com base nas diferenças imunológicas entre as linhagens de camundongos C57BL/6 KO para IFN- γ , C.B-17 *scid*, C57BL/6 *bg* e C3H *nu*, o presente estudo tem como objetivo a avaliação da dinâmica da eliminação de oocistos da linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp em animais adultos.

2. Material e métodos

O protocolo experimental nº428/1 referente a esta pesquisa foi aprovado pela CEEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal) do Instituto de Biologia da UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas.

2.1 Manutenção “in vivo” da linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp

Conforme relatado por Britto et al, 2000, a linhagem MMC foi isolada a partir de fezes humanas de um único paciente HIV positivo com criptosporidiose, do Hospital das Clínicas da Unicamp. A manutenção desta linhagem foi realizada em camundongos neonatos S.P.F. (Specific

Tabela I – Mortalidade de camundongos imunodeficientes e imunocompetentes infectados com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp.

Linhagens de Camundongos	Mortalidade (%)
C.B-17/Uni scid	0
BALB/c/Uni	0
C57BL/6 KO para IFN-γ	40
C57BL/6/Uni bg	20
C3H/Uni nu	40
C57BL/6/Uni	0

Pathogen Free), imunocompetentes isogênicos das linhagens BALB/c/Uni, C57BL/6/Uni, CBA/Uni, C.B-17/Uni e heterogênico da linhagem Swiss/Uni no período de dezembro/1999 a julho/2002. A partir de novembro/2002 a fevereiro/2004, a linhagem MMC foi mantida em camundongos de 04 a 06 semanas de idade da linhagem C57BL/6 KO para IFN- γ . A manutenção “in vivo” do *Cryptosporidium* sp foi realizada em ambiente controlado, no isolador, com manejo preconizado por Passos & Alves (1996). Os oocistos foram obtidos do intestino dos animais sacrificados no 7º dia após a infecção. Foi realizada a maceração do intestino em homogeneizador de Biozzi, com solução salina tamponada 0,01M pH 7.2. Em seguida foi realizada a filtração em malhas de nylon e centrifugação 2 a 3 vezes a 1500g, por 10 minutos a 4°C. A camada superior do precipitado foi recolhida para determinação do número de oocistos (PEETERS & VILLACORTA, 1995). Foi feita a diluição da suspensão dos oocistos (20 μ L) em solução de verde de malaquita (80 mL), contendo SDS. O nº de oocistos foi determinado em câmara de Neubauer, com microscopia de contraste de fase, utilizando objetiva de 40X.

2.2 Infecção de camundongos imunodeficientes com oocistos de *Cryptosporidium* sp

Fêmeas SPF com 4 a 6 semanas de vida, provenientes do CEMIB, foram infectadas com 10^5 oocistos de *Cryptosporidium* sp por tubagem esofágica. Foram utilizados 10 animais de cada uma das seguintes linhagens imunodeficientes:

- C.B-17/Uni *scid*; linhagem imunocompetente controle BALB/c/Uni
- C57BL/6 KO para IFN- γ , C3H/Uni *nu*, C57BL/6/Uni *bg*; linhagem imunocompetente controle C57BL/6/Uni.

A colônia das linhagens citadas foram monitorizadas pela Seção de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB, com metodologia descritas por Gilioli et al, 1996 e Gilioli et al, 2000).

Os ensaios experimentais foram realizados no Departamento de Parasitologia da UNICAMP, em unidade isoladora de PVC flexível tipo Trexler. Após os experimentos, os materiais retirados do isolador foram tratados antes do descarte, como padrão de biossegurança. Para a descontaminação, os materiais de laboratório foram submetidos a fervura durante 15 minutos, antes da lavagem. Os dejetos retirados do equipamento foram enviados para inativação em equipamento para tratamento de resíduo de serviço de saúde mediante ondas eletromagnéticas.

Foram considerados resistentes os animais que apresentaram liberação de oocistos de *Cryptosporidium* sp na fase aguda da doença e não apresentaram mortalidade no período de 15 dias.

2.3 Análise morfométrica de oocistos de *Cryptosporidium* sp

Para a análise morfométrica dos oocistos da linhagem MMC, foi utilizado o material obtido do intestino e fezes dos animais sacrificados no 7º dia após a infecção, conforme metodologia descrita (item 2.1). Foram feitos esfregaços durante as primei-

ras 28 passagens da infecção, no período de dezembro/1999 a julho/2000. Os esfregaços foram corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada (HENRIKSEN & POHLENZ, 1981). As medidas de 35 oocistos foram realizadas com auxílio de ocular micrométrica, em microscópio Zeiss acoplado à câmara clara, com aumento de 1000X. Os resultados foram expressos como índice de forma, conforme XIAO et al, (2004).

2.4 Dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp

As fezes dos animais adultos infectados foram colhidas diariamente, durante 15 dias, individualmente e armazenadas em dicromato de potássio na concentração final de 2,5%, mantidas a 4°C. Posteriormente, as amostras de fezes foram centrifugadas a 1500 g durante 15 minutos. Em seguida, retirou-se a camada superior, para a contagem dos oocistos adicionando-se solução de verde de malaquita a 0,16%, contendo 0,1% de SDS. O número de oocistos foi determinado em câmara de Neubauer, sob microscopia de contraste de fase (PEETERS & VILLACORTA, 1995). O peso corporal individual dos camundongos, devidamente identificados por marcação auricular, foi registrado em balança semi-analítica, no início e ao final do experimento.

2.5 Metodologia estatística

O estudo estatístico da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp. foi realizado mediante a comparação das médias obtidas em cada uma das amostras, referente aos 6º, 9º, 12º e 15º dias após a infecção. Este período está associado com a mortalidade dos animais e eliminação dos oocistos nas fezes. Foi utilizado o procedimento de Análise de Variância (ANOVA) e comparações pareadas pelo método de Tukey, com nível de confiança de 95%. As análises foram realizadas no software estatístico *Minitab* – Versão 13.

3. Resultados

A dimensão de 35 oocistos de *Cryptosporidium* sp (média e desvio

padrão), foram as seguintes: comprimento $4,91 \pm 0,44 \mu\text{m}$ e largura $5,85 \pm 0,35 \mu\text{m}$. O índice de forma (C/L) obtido foi 0,84.

Foi possível estabelecer a manutenção do cultivo "in vivo" da linhagem humana MMC de *Cryptosporidium* sp em camundongos neonatos imunocompetentes, e camundongos adultos C57BL/6 KO para IFN- γ . Esta linhagem de *Cryptosporidium* sp encontra-se na 67ª passagem da infecção e mantém alta infectividade.

Para a implantação e manutenção do cultivo "in vivo" do *Cryptosporidium* sp, correspondente ao período de Dezembro/1999 a fevereiro/2004, foram utilizados 1265 animais, entre camundongos neonatos das linhagens BALB/c/Uni, C57BL/6/Uni, CBA/Uni, C.B-17 /Uni, Swiss/Uni, e camundongos adultos C57BL/6 KO para IFN- γ , em ambiente controlado (Fig.1).

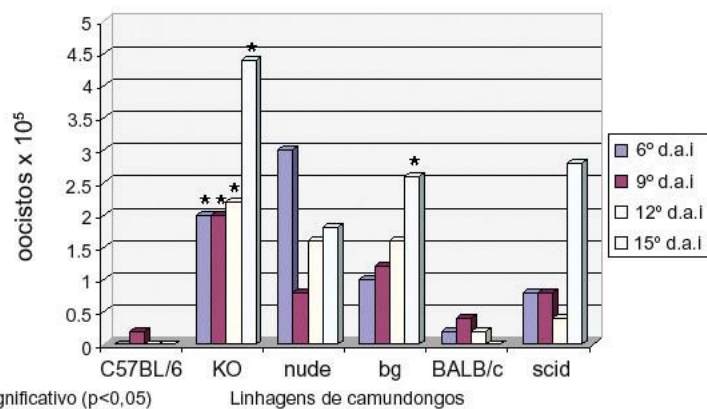
Considerando a taxa de mortalidade nos animais imunodeficientes e imunocompetentes (Tabela I), não houve morte na linhagem scid, assim como no controle. Os camundongos nude, KO e *bg* apresentaram mortalidade no 11º dia após infecção.

O comportamento das linhagens imunodeficientes e imunocompetentes, quanto a liberação de oocistos nas fezes, foi avaliado a partir do 6º dia até o 15º dia após a infecção (Figura 2).

4. Discussão

A manutenção da linhagem de origem humana de *Cryptosporidium* sp em camundongos SPF ainda não foi descrita no Brasil e tornou-se uma fonte de antígeno para diagnóstico da criptosporidiose.

Um dos fatores limitantes para entender a biologia do *C. parvum* é a dificuldade de obtenção de amostras purificadas de vários estágios de desenvolvimento intracelular do parasito. Conseqüentemente, muitas



* Significativo ($p < 0,05$)

Figura 2 - Dinâmica da eliminação de oocistos de *Cryptosporidium* sp em camundongos imunodeficientes: KO, nude, scid, *bg* e imunocompetentes BALB/c/Uni e C57BL/6/Uni no 6º, 9º, 12º e 15º dia após a infecção (d.a.i.) com 10^5 oocistos.

pesquisas com o parasito procuram caracterizar e identificar os antígenos expressos na superfície das formas invasivas, tais como esporozoítos e merozoítos (WIDMER et al, 2002).

O isolamento da linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp em camundongo propicia a padronização de um genótipo, possivelmente humano como fonte de antígenos para diagnóstico e infecção de cultura de células.

Atualmente são reconhecidas treze espécies de *Cryptosporidium* (XIAO et al, 2004). As medidas obtidas dos oocistos da linhagem MMC, comprimento $4,91 \pm 0,44 \mu\text{m}$ e largura $5,85 \pm 0,35 \mu\text{m}$ sugerem que a linhagem MMC, de origem humana se enquadra dentro da espécie *Cryptosporidium hominis*, conforme CAREY et al, 2004. No entanto, o índice de forma (C/L) obtido foi de 0,84, divergindo das observações de XIAO et al, 2004, que indica para *C. hominis* índice de forma 1,15. Porém, a análise morfológica não pode ser usada como ferramenta para classificação das espécies de *Cryptosporidium*, pois além dos parâmetros biológicos, deve-se considerar principalmente as diferenças genéticas (MORGAN-RYAN et al, 2002; FALL et al, 2003).

A hipótese de se tratar de *Cryptosporidium hominis*, pode ser sustentada pelos resultados de Mclauchlin et al, 1999, quando comparado com *C. parvum*.

Outra diferença entre *C. hominis* e *C. parvum* é quanto a liberação

de oocistos. O estudo conduzido por Mclauchlin et al, 1999, em 218 pacientes, com diagnóstico de diarreia, demonstrou que os pacientes que apresentaram infecção pelo *C. hominis* liberaram maior quantidade de oocistos, em relação aos pacientes que se infectaram pelo *C. parvum*.

Todos os camundongos utilizados neste estudo foram classificados na categoria VAF (Virus Antibody Free), pe-

los resultados de monitorização sanitária. Desta forma foi assegurada a infecção "in vivo" sem a interferência de outros patógenos murinos. Poucos são os relatos de interferência do *Cryptosporidium* na pesquisa experimental associado a outros patógenos em camundongos. Há autores que relataram o efeito sinérgico do *Cryptosporidium parvum*, isolado CPB-0, com rotavírus em leitões SPF (Enemark et al, 2003).

Dentre as linhagens de camundongos imunodeficientes estudadas, a linhagem *scid* apresentou resistência à infecção pelo *Cryptosporidium* sp, quando comparada com as outras linhagens imunodeficientes. Os nossos resultados corroboram com Hayard et al, 2000, que comprovaram a importância do IFN- γ para a sobrevivência do *scid*.

Mead & You, 1998, investigaram a susceptibilidade frente a infecção pelo *C. parvum* entre duas linhagens diferentes de camundongos, ambas KO para interferon-gama (BALB/c-Ifg^(m) e C57BL/6J-Ifg^(m)). Os camundongos BALB/c-Ifg^(m) desenvolveram infecção moderada com média de eliminação de oocistos 100 vezes menor em relação ao camundongo C57BL/6J-Ifg^(m).

O estudo da ação de citocinas durante a infecção pelo *Cryptosporidium parvum* em camundongos knockout (KO) para IL-4, IL-10, IL12 e CCR5, com background de BALB/c, evidenciou as diferenças entre as linhagens, pois os animais KO mostraram-se resistentes

(CAMPBELL et al, 2002). Os autores também observaram que o KO para IL-12, com "background" de C57BL/6, quando infectado com 100 oocistos, apresentou alta susceptibilidade, liberando grandes quantidades de oocistos, em relação às outras linhagens knockout. Após duas semanas o KO para IL-12 foi capaz de controlar a infecção, sugerindo que a IL-12 é um importante indutor de IFN- γ .

Os camundongos nude mostraram controle parcial da infecção. Nossos resultados encontram respaldo nos trabalhos de Rasmussen & Healey, 1992, foi demonstrado que a ausência de linfócitos T em modelos animais estabelece a infecção pelo *Cryptosporidium parvum*. Conforme descrito pelos autores, os camundongos CD4⁻ apresentam perfil de infecção semelhante aos camundongos nude.

Ungar et al, 1991, avaliaram o papel de INF- γ , células CD4 e CD8 em camundongos adultos BALB/c nude submetidos a tratamento com anticorpo monoclonal. Os autores demonstraram que o controle da infecção requer a produção de IFN- γ e contribuição do linfócito CD4. Na defesa do hospedeiro contra a infecção pelo *Cryptosporidium* sp, também é acionado um mecanismo independente de linfócitos T, no qual os macrófagos ativados induzem a secreção de IFN- γ , pelas células NK (BANCROFT & KELLY, 1994).

A análise estatística da eliminação de oocistos no decorrer da infecção evidenciou que a linhagem KO para IFN- γ apresentou significativamente maior liberação de oocistos em todos os períodos. A linhagem nude superou a linhagem controle apenas no 6º dia após infecção, apresentando diferenças significativas em relação à linhagem *scid*. No 15º dia após infecção, houve diferença significativa entre as linhagens de camundongos *bg* e *scid* comparada aos respectivos controles. É importante destacar que a linhagem imunocompetente mais refratária à infecção foi C57BL/6/Uni, que apresentou oocistos apenas no 9º dia, enquanto a linhagem BALB/c/Uni apresentou oocistos no 6º, 9º e 12º dias após a infecção.

A literatura relata que as linhagens de *Cryptosporidium* sp estudadas até o momento, mesmo as de origem humana, são mantidas em bezerros, por vários anos. No estudo de Griffiths et al, 1998, utilizando o camundongo KO para IFN- γ com "background" C57BL/6, o pico de eliminação de oocistos aconteceu no 9º dia após a infecção. Em nossos resultados, a linhagem MMC de *Cryptosporidium* sp, no mesmo modelo evidenciou maior eliminação de oocistos no 6º dia após a infecção, uma característica que sugere tratar-se genótipo humano.

Foi possível constatar que não houve controle da infecção pela linhagem KO, enquanto a linhagem *bg* apresentou uma resposta tardia quanto à eliminação dos oocistos associada a significativa perda de peso no 15º dia após a infecção (dados não mostrados).

A análise conjunta da mortalidade dos camundongos imunodeficientes infectados pelo *Cryptosporidium* sp e da eliminação de oocistos (Fig.2) indica que o perfil de resistência à infecção nas linhagens estudadas obedece o seguinte padrão: C57BL/6/Uni > BALB/c/Uni > *scid* > *bg* > nude > KO.

Os resultados indicam a importância do interferon-gama, linfócitos T e células NK na resistência à infecção pelo *Cryptosporidium* sp.

5. Referências Bibliográficas

- BANCROFT, G.J. & KELLY, J.P. Macrophage activation and innate resistance to infection in SCID mice. **Immunobiology**, v.191, p.424-31, 1994.
- BRITTO, M.H.S, ALVES, D.P. FREITAS, F.F.T. & GUARALDO, A.M.A. Isolamento de *Cryptosporidium parvum* de fezes de paciente HIV positivo e manutenção do isolado humano em camundongos. IN: Congresso Brasileiro da Ciência de Animais de Laboratório, VII, 3-6/12/2000, Campinas.
- CAMPBELL, L.D., STEWART, J.N. & MEAD, J.R. Susceptibility to *Cryptosporidium parvum* infections in cytokine and chemokine-receptor knockout mice. **The Journal of Parasitology**, v.88, p.1014-16, 2002.
- CAREY, C.M., LEE, H. & TREVORS, J.T. Biology persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. **Water Research**. v.38, p.818-862, 2004.
- ENEMARK, H.L., BILLE-HANSEN, V., LIND P., HEEGAARD P.M., VIGRE, H., AHRENS, P. & THAMSBORG, S.M. Pathogenicity of *Cryptosporidium parvum*- evaluation of an animal infection model. **Veterinary Parasitology**, v. 113 p.35-37, 2003.
- ENRIQUEZ, F.J., & STERLING, C.R. *Cryptosporidium* Infections in inbred strains of mice. **Journal Protozoology**, v.38, p.100-02, 1991.
- FALL, A., THOMPSON, R.C., HOBBS, R.P., MORGAN-RYAN, U. Morphology is not a reliable tool for delimiting species within *Cryptosporidium*. **The Journal of Parasitology**, vol.89, p.399-402, 2003.
- FAYER, R., SPEER, C. & DUBEY, J. The general biology of *Cryptosporidium*, p.1-41. IN: R. Fayer (ed), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. CRC Press, Inc., Boca Taton, Fla. 1997.
- FRANCO, R.B., ROCHA-EBERHARDT, R. & CANTUSIO NETO, R. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw water from the Atibaia River, Campinas, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical do Estado de São Paulo**, v.43, p.109-111, 2001.
- GILIOI, R., SAKURADA, J.K., ANDRADE, L. A.G., KRAFT, V., MEYER, B. & RANGEL, H.A. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. **Laboratory Animal Science**, v.46, p.582-84, 1996.
- GILIOI, R., ANDRADE, L.A.G., PASSOS, L.A.C., SILVA, F.A., RODRI-

- GUES, D.M., GUARALDO, A.M.A. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.33-37, 2000.
- GRIFFITHS, J.K. Human Cryptosporidiosis: epidemiology, transmission, clinical disease, treatment and diagnosis. **Advances in Parasitology**, v.40, p. 37-85, 1998.
- GRIFFITHS, J.K., THEODOS, C., PARRIS, M., & TZIPORI, S. The gamma interferon gene Knockout mouse: a highly sensitive model for evaluation of therapeutic agents against *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p. 2503-2508, 1998.
- HARP, J.A., WANNEMUEHLER, M.W., WOODMANSEE, D.B. & MOON, H.W. Susceptibility of germ-free or antibiotic-treated adult mice to *Cryptosporidium parvum*. **Infection And Immunity**, v.56, p. 2006-2010, 1988.
- HENRIKSEN, S.A., POHLENZ, J.F.L. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. **Acta Veterinaria Scandinaviana**, v.22, p.594-596, 1981.
- MACKENZIE, W.R., N.J. HOXIE, M.E. PROCTOR, M.S. GRADUS, K.A. BLAIR, D.E. PETERSON, J.J. KAZMIERCZAK, D.G. ADDISS, K.R. FOX, J. B. ROSE, ET AL. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. **The New England Journal of Medicine**, v.331, p.161-167, 1994.
- McLAUHLIN, J., S. PEDRAZA-DIAZ, C. AMAR-HOETZENEDER & G.L. NICHOLS. Genetic characterization of *Cryptosporidium* strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.3153-3158, 1999.
- MEAD, J.R., ARROWOOD, M.J., SIDWELL, R.W. & HEALEY, M.C. Chronic *Cryptosporidium parvum* infections in congenitally immunodeficient SCID and nude mice. **The Journal Of Infectious Diseases**, v.163, p.1297-1304, 1991.
- MEAD, J.R. & YOU, X. Susceptibility differences to *Cryptosporidium parvum* infection in two strains of gamma interferon knockout mice. **The Journal Of Parasitology**, v.84, p.1045-1048, 1998.
- MORGAN-RYAN, U.M., FALL, A., WARD, L.A., HIJJAWI, N., SULAIMAN, I., FAYER, R., THOMPSON, R.C., OLSON, M., LAL, A., XIAO L., *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from Homo sapiens **Journal Eukaryotic Microbiology**, v.49, p. 433-440, 2002.
- NIME, F., BUREK, J., PAGE, D., HOLSCHER, M. & YARDLEY, J. Acute enterocolitis in a human infected with the protozoan *Cryptosporidium*. **Gastroenterology**, v.70, p.592-598, 1976.
- PASSOS, L.A.C. & ALVES, D.P. Isoladores. **IN: Manual para Técnicos em Bioterismo**. De Luca, RR., Alexandre, SR., Marques, T., Souza, NL., Merusse, JLB. e Neves, S. P. (eds) 2ª ed. São Paulo, p.27-34, 1996.
- PEETERS, J. & VILLACORTA, I. *Cryptosporidium*. **IN: EUR 16602 – Guidelines on Techniques in coccidiosis research**. J.Eckert, R. Braun, M.W. Shirley, P. Coudert Ed. Luxembourg. p. 202-240, 1995.
- RASMUSSEN, K. & HEALEY, M. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. **Infection And Immunity**, v.60, p. 1648-1652, 1992.
- SMITH, H.V. & ROSE, J.B. Waterborne Cryptosporidiosis: Current status. **Parasitology Today**, v.14, p.14-22, 1998.
- TZIPORI, S., ROBERTON, D., CHAPMAN, C., - Remission of diarrhoea due to cryptosporidiosis in an immunodeficient child treated with hyperimmune bovine colostrum. **British Medical Journal**, v.293, p.1276, 1986.
- TZIPORI, S., RAND, W. & THEODOS, C. Evaluation of a two-phase scid mouse model preconditioned with anti-interferon-gamma monoclonal antibody for drug testing against *Cryptosporidium parvum*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.172, p. 1160-1164, 1995.
- TZIPORI, S. & GRIFFITHS, J. Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*. **IN: Advances in Parasitology – Opportunistic Protozoa in Humans**. Baker, J.R., Mullrt, R., Rollinson, D. & Tzipori, S. eds. Academic Press Ltd. London, v.40, p.6-36, 1998.
- UNGAR, B.L, BURRIS, J., QUINN, C. & FINKELMAN, F. New mouse models for chronic *Cryptosporidium* infection in immunodeficient hosts. **Infection and Immunity**, v.58, p. 961-969, 1990.
- UNGAR, B.L., KAO, T.C., BURRIS, J.A. & FINKELMAN, F.D. Cryptosporidium infection in an adult mouse model. Independent roles for IFN-gamma and CD4+ T lymphocytes in protective immunity. **The Journal of Immunology**, v.3, p.1014-1022, 1991.
- WIDMER, G., LIN, L., KAPUR, V., FENG, X. & ABRAHAMSEN, M. S. Genomics and genetics of *Cryptosporidium parvum*: the key to understanding cryptosporidiosis. **Microbes and Infections** v4, p. 1081-1090, 2002.
- XIAO, L., FAYER, R., RYAN, U. & UPTON, S. J. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, p.72-97, 2004.