

## DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA CRIPTOSPORIDIOSE HUMANA

José Roberto Carneiro<sup>\*</sup>, Osvaldira Seabra Guimarães<sup>\*\*</sup>, Flávia Cotrim Cury<sup>\*\*\*</sup>,  
Nicanor Rodrigues<sup>\*\*\*\*</sup>, José Divino Lima<sup>\*\*\*\*\*</sup>

---

### RESUMO

Para verificar a prevalência de *Cryptosporidium* em indivíduos humanos, através da Reação de Imunofluorescência Indireta, foram examinados 74 soros de imunodeficientes com um percentual de ocorrência de 55,40% de IgG. Em 210 soros de crianças examinados verificou-se uma prevalência global estimada de 9,05%. O antígeno utilizado foi obtido da porção distal do terço posterior do fêto de bezerros inoculados experimentalmente com *C. parvum*. A sensibilidade da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) tomando como padrão os esfregaços fecais, foi 79,27%. Em 44 soros de vaqueiros examinados foram encontrados 3 casos (6,81%) positivos em uma diluição de 1:40.

---

**UNITERMOS:** *Cryptosporidium parvum*, Reação de Imunofluorescência indireta, Seres humanos.

### INTRODUÇÃO

O gênero *Cryptosporidium* foi descrito pela primeira vez por TYZZER (1907), nos Estados Unidos, examinando glândulas pépticas de camundongos e denominando-o de *Cryptosporidium muris*. Uma segunda espécie, o *Cryptosporidium parvum* foi identificada em 1912, pelo mesmo autor, parasitando o intestino delgado de camundongos. São protozoários que medem de 3 a 4µm de diâmetro e se localizam freqüentemente nas bordas das vilosidades intestinais.O

---

<sup>\*</sup> Prof. Titular do Depto. de Parasitologia do IPTSP/UFG  
<sup>\*\*</sup> Prof. Adjunto III do Depto. de Medicina Tropical IPTSP/UFG  
<sup>\*\*\*</sup> Estagiária do Depto. de Parasitologia do IPTSP/UFG  
<sup>\*\*\*\*</sup> Médico Veterinário IPTSP/UFG  
<sup>\*\*\*\*\*</sup> Bolsista do CNPq.

parasito possui um ciclo que é característico de outros coccídios, envolvendo freqüentemente uma transmissão fecal-oral nos hospedeiros infectados. Os parasitos proliferam assexuadamente, segundo a seqüência: trofozoítas, merontes e merozoítas e sexuadamente, com os micro e macrogamontes (POHLENZ et al. 1978). Segundo CURRENT (1985), o *Cryptosporidium* é um importante agente responsável por gastroenterites em várias espécies de animais, especialmente em bovinos, ovinos e seres humanos.

As técnicas utilizadas para detecção de *Cryptosporidium* são baseadas principalmente na observação de oocistos em esfregaços corados e, segundo BOUFASSA OUZROUT et al. (1986), citado por ORTOLANI (1988), são utilizadas cinco técnicas para o diagnóstico do *Cryptosporidium* em pesquisas experimentais e epidemiológicas: exames histológicos; exames coprológicos; decalque de mucosas; xenodiagnósticos e exames sorológicos.

Na maior parte das infecções de seres humanos e animais com *Cryptosporidium*, o diagnóstico é feito ou por esfregaços fecais corados ou por observações microscópicas dos estágios endógenos do parasito em tecidos intestinais obtidos por biópsias ou exames post-mortem. (NIME et al., 1976; LASSER et al. 1979).

Em razão da maior sensibilidade, particularmente esfregaços fecais com baixa concentração de oocistos, a técnica de imunofluorescência parece ser a eletiva nos estudos de prevalência do *Cryptosporidium* em populações humanas e em animais (STIBBS & ONGERTH, 1986).

Para detectar anticorpos circulantes, várias técnicas sorológicas têm sido descritas. Elas incluem imunofluorescência indireta (TZIPORI & CAMPBELL, 1981; CAMPBELL & CURRENT, 1983) e, mais recentemente, a técnica imunoenzimática de ELISA. (UNGAR et al., 1988).

Segmentos intestinais infectados com *Cryptosporidium* como fonte de antígenos para RIFI foram utilizados por TZIPORI & CAMPBELL, (1981). O teste foi suficientemente sensível para detectar anticorpos específicos nos soros de 10 espécies de animais domésticos e em humanos em 80% e 100% dos soros testados.

O objetivo do trabalho é verificar a prevalência da criptosporidiose humana através da pesquisa de anticorpos específicos pela Reação de Imunofluorescência Indireta.

## MATERIAL E MÉTODOS

A população estudada era composta de indivíduos imunodeficientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) crianças procedentes

de creche e de laboratórios credenciados pelo SUS e vaqueiros de propriedades rurais.

Foram colhidos 5 ml de sangue de cada indivíduo por punção venosa, com tubo vacutainer com anticoagulante. Os soros foram separados em alíquotas, distribuídos em pequenos tubos e congelados a -20° C. As amostras de sangue dos indivíduos com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida foram colhidas por técnico do Hospital de Doenças Tropicais e encaminhadas ao IPTSP-UFG, devidamente identificadas. As amostras de sangue das crianças e vaqueiros foram colhidas e os soros separados por técnicos do IPTSP-UFG.

### Exame sorológico para *Toxoplasma gondii*

Quarenta e quatro soros de indivíduos imunodeficientes (SIDA), 19 crianças e 3 vaqueiros com anticorpos anti *Cryptosporidium* foram separados para pesquisa de anticorpos anti *Toxoplasma gondii*.

As lâminas com antígeno para realização da reação de imunofluorescência indireta foram preparadas a partir do exsudato peritoneal de camundongos infectados com *Toxoplasma gondii*. Após se processar às lavagens do exsudato e do sedimento, ajustou-se o número de parasitos a uma concentração ideal em torno de 20 a 30 por campo. O antígeno contendo os parasitos foi distribuído em lâminas para microscopia de imunofluorescência, acondicionado em recipientes fechados, envolvidos por papel alumínio e mantidos a -20° C. O critério adotado para o desenvolvimento da parte técnica da reação foi o mesmo de CAMARGO (1966).

Foram utilizados cortes por congelação (COUDERT et al. 1968) da porção distal do terço posterior do íleo de bezerras inoculados experimentalmente com *C. parvum* de acordo com a seguinte seqüência: No quinto dia após inoculação, com o aparecimento de diarreia e perda de apetite, os animais foram sacrificados e necropsiados. O intestino delgado era, então dividido em duodeno, jejuno e íleo. O íleo foi dividido em três segmentos de 100 cm cada um, medidos a partir da junção íleo cecal e denominados, respectivamente, terço posterior, médio e anterior. Cada terço foi dividido também por sua vez em três partes, aproximadamente do mesmo comprimento cada uma e denominadas de porção proximal, média e distal. Este procedimento foi utilizado procurando-se detectar o histotropismo do parasito. De cada porção, foi usado um fragmento de 1 cm, que era acondicionado em recipiente com formol a 10% e posteriormente processado para exame microscópico. O processamento consistia de inclusão em parafina, microtomia e coloração com hematoxilina e eosina, segundo MAIA (1979). As lâminas coradas foram examinadas em objetiva de imersão (1000 X). O material estudado foi fotografado

utilizando-se o equipamento para fotomicrografia modelo Automatic (model mf AKS 24/36 ZEISS).

Através de um micrótomo de congelação (Cryostato de MILES), foram seccionados fragmentos de quatro µm de espessura que, após fixação nas lâminas de vidro para microscopia de imunofluorescência, foram utilizados como antígeno para Reação de Imunofluorescência Indireta.

Para realizar a pesquisa de anticorpos anti *C. parvum* as lâminas com cortes por congelação foram retiradas do freezer e a Reação de Imunofluorescência Indireta foi processada obedecendo a seguinte seqüência:

- fixação com acetona durante 30 minutos.(As lâminas foram secadas ao ar );
- diluição dos soros em salina tamponada (pH 7,2) nas diluições: 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640 e 1:1280. (Cada diluição foi colocada sobre um corte de tecido);
- incubação das lâminas em estufa a 37° C, durante 30 minutos em atmosfera úmida;
- lavagens das lâminas duas vezes, em banhos diferentes de tampão fosfato (pH 7,2),durante 5 minutos cada vez;
- secagem em meio ambiente;
- colocar sobre o corte o conjugado IgG na diluição 1:100, previamente titulado. (Conjugado BIOLAB - FLUORINE, anti γ Globulina de carneiro anti IgG humana marcado com fluoresceína).
- incubação e lavagem das lâminas, seguindo o mesmo critério do item d;
- montagem das lâminas em glicerina tamponada ( pH 8,6 ) com lamínula;
- observação das lâminas em microscópio de imunofluorescência.(Objetiva X40).

Para IgM, o critério foi o mesmo adotado anteriormente, mas os soros foram diluídos 1/5, 1/10, 1/20 e o conjugado utilizado foi FLUOLINE M (anti µ) BIOLAB, globulina de carneiro anti IgM humanas marcadas pelo isotiocianato de fluoresceína em diluição 1/100. Em todas as reações foram utilizados concomitantemente os controles positivos e negativos.

Três grupos de indivíduos foram utilizados para estabelecer o critério de positividade:

- Vaqueiros, pela exposição aos oocistos de *Cryptosporidium* eliminados nas fezes dos bezerros;
- Crianças com diarreia - sintoma sugestivo de criptosporidiose;
- Indivíduos imunodeficientes ( SIDA ), por se tratar o *Cryptosporidium* de um parasito oportunista.

Os critérios de positividade para os controles apresentavam uma fluorescência de coloração esverdeada em torno do corpo parasitário e o controle negativo apresentava o corpo parasitário sem fluorescência, com coloração avermelhada e pouca luminosidade.

Para o cálculo da sensibilidade, os resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta (pesquisa de anticorpos anti *Cryptosporidium* em crianças) foram comparados aos resultados obtidos nos esfregaços fecais de crianças, de acordo com a seguinte fórmula utilizada por MONCAYO & LUQUETTI (1990):

$$S = \frac{p}{p + fn} \times 100$$

onde: p (positivo); fn (falso-negativo) e S (sensibilidade).

As lâminas da Reação de Imunofluorescência Indireta foram fotografadas utilizando-se o microscópio de Epifluorescência Jenaluminar ZEISS.

## RESULTADOS

Na TAB. 1, e FIG. 1 estão os resultados da reação de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti *Cryptosporidium*, em imunodeficientes portadores de SIDA, crianças e vaqueiros procedentes da região metropolitana de Goiânia.

Os soros foram considerados positivos a partir de uma diluição 1:40.

### Imunodeficientes (SIDA)

De 74 indivíduos examinados, 41 (55,40%), foram considerados positivos, sendo 37 (50,00%) para IgG e 4 para IgG e IgM (5,40%).

A prevalência de IgM encontrada nas amostras de soro de imunodeficientes foram: 1:5 em cinco amostras (6,75%); 1:10 em uma amostra (1,35%) e 1:20 em uma amostra (1,35%).

### Crianças

Foram examinados 210 soros de crianças, com 19 positivos (9,05%). Entre as amostras positivas os títulos de IgG encontrados foram os seguintes: 1:40 em quinze amostras (78,95%); 1:80 em duas amostras (10,53%) e 1:160 em duas amostras (10,53%).

Os resultados para IgM foram todos negativos.

Os resultados obtidos em esfregaços fecais e os obtidos através da Reação de Imunofluorescência Indireta, em 210 crianças foram comparados. Duas crianças

foram positivas para o *C. parvum* pela Reação de Imunofluorescência Indireta nas diluições 1:40 e 1:80, e pelos esfregaços fecais corados.

Cálculo da sensibilidade:

$$S = \frac{p}{p + fn} \times 100$$

onde: p (positivo) = 19; fn (falso-negativo) = 5; assim temos:

$$S = \frac{1900}{24} = 79,17\%$$

#### Vaqueiros

Dos 44 soros de vaqueiros três (6,81%) apresentaram reações sorológicas positivas (IgG) na diluição 1:40 (6,66%).

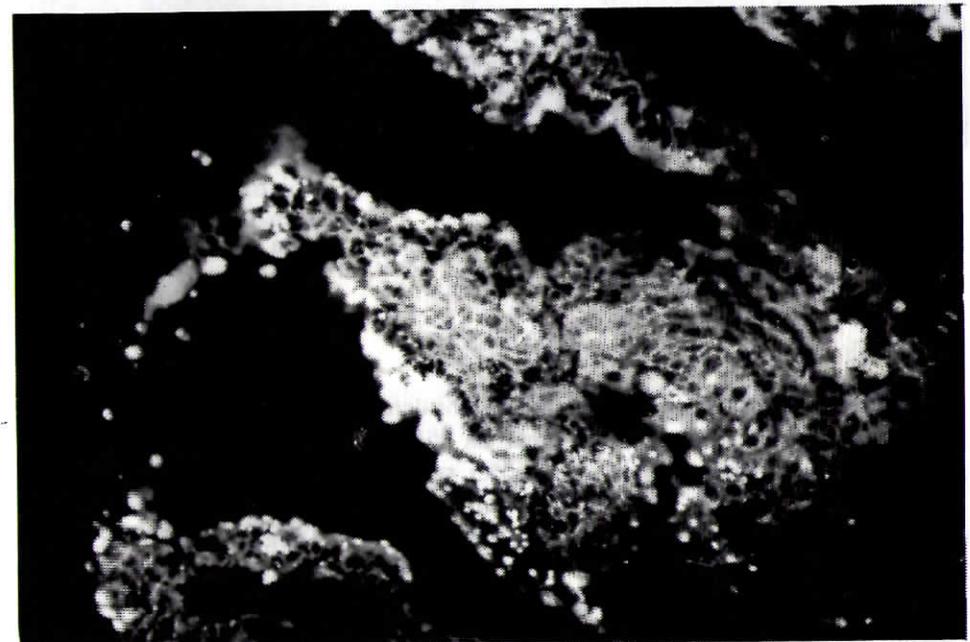
#### Anticorpos anti *Toxoplasma gondii* em soros examinados procedentes da região metropolitana de Goiânia

Anticorpos anti *T. gondii* observados em três grupos de indivíduos:

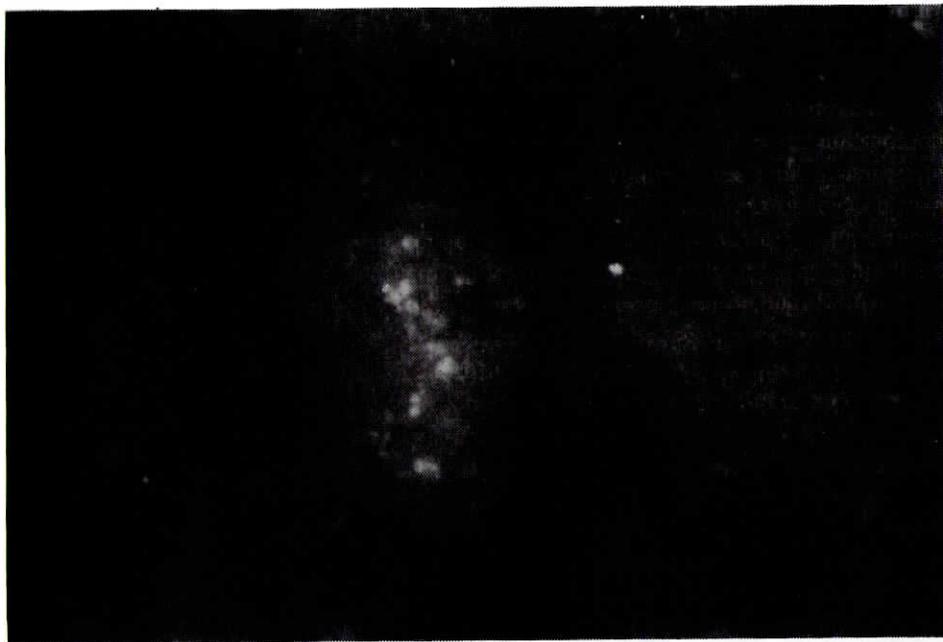
- Imunodeficientes (SIDA): em 41 amostras de soros positivos para anticorpos anti *Cryptosporidium*, 20 (48,78%) estavam positivos para anticorpos anti *Toxoplasma*, com os títulos 1: 64 em 8 amostras (19,51 %); em 1: 256 em 8 amostras (19,51%) e 1: 1000 em 4 amostras (9,76%).
- Crianças: em 19 amostras de soros positivas para *Cryptosporidium* só uma acusou anticorpos anti *T. gondii* ( título, 1:64), as demais foram negativas.
- Vaqueiros: nas três amostras positivas para *Cryptosporidium*, título 1:40, foram detectados também anticorpos anti *T. gondii* com título 1:64.

**Tabela 1.** Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos anti *C. parvum* em imunodeficientes portadores de SIDA, crianças e vaqueiros procedentes da região metropolitana de Goiânia - Go. 1993/1994.

GRUPOS	INDIVÍDUOS EXAMINADOS	POSITIVOS		TÍTULOS DE IgG					
		n	%	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
Imunodeficientes	74	41	55,40	15	14	8	2	2	0
Crianças	210	19	9,05	15	2	2	0	0	0
Vaqueiros	44	3	6,81	3	0	0	0	0	0



**Figura.1 A.** Reação de Imunofluorescência Indireta positiva para *C. parvum* em soro de imunodeficiente. (X 1000)



(B)

Figura.1 B. Reação de Imunofluorescência Indireta negativa para *C. parvum* em soro de imunodeficiente. (X 1000)

## DISCUSSÃO

Nos exames sorológicos, foram considerados positivos os resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta na diluição de 1:40. Observou-se, no presente trabalho, fluorescência nas reações sorológicas das diluições a partir de 1:10. Mas a escolha da diluição 1:40 como positiva deve-se às observações de CAMPBELL & CURRENT(1983) e MANN et al.(1987). Segundo DE CARLI & SARAIVA (1991) a utilização de diluições mais elevadas evita a ocorrência de reações cruzadas do *Cryptosporidium* com outros parasitos apicomplexos como *Toxoplasma*, *Sarcocystis* e *Isospora*.

A Reação de Imunofluorescência Indireta, para pesquisa de anticorpos anti *Cryptosporidium*, utilizando secções do intestino dos animais como antígenos, foi

realizada por TZIPORI & CAMPBELL (1981), que utilizaram um carneiro inoculado com oocistos de *Cryptosporidium* isolado de bezerras com diarreia. CAMPBELL & CURRENT (1983) que examinaram soros de três indivíduos através da Reação de Imunofluorescência Indireta, utilizando fragmentos de intestino de camundongos como antígenos. Outras técnicas da Reação de Imunofluorescência Indireta foram desenvolvidas por GARCIA et al. (1987) que empregaram anticorpos monoclonais e um anticorpo secundário conjugado ao isotiocianato de fluoresceína para detecção de antígeno em material fecal, mostrando 100% de sensibilidade e especificidade. UNGAR et al. (1986) utilizaram a técnica de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG e IgM em pacientes imunocompetentes e imunodeficientes. O teste permite avaliação quantitativa de anticorpos circulantes, com sensibilidade em torno de 95%.

A técnica da Reação de Imunofluorescência Indireta utilizada no trabalho foi eficaz, não apresentou reações cruzadas e mostrou boa visualização das formas endógenas do *C. parvum*. No entanto, a técnica apresentou algumas dificuldades na produção de antígenos: a) autólise do tecido, quando não preparado de imediato, e fragmentos tissulares não parasitados confirmando as observações de POHLENZ et al. (1978) e de BERGER (1984) segundo as quais as formas endógenas do *Cryptosporidium* desaparecem do intestino delgado em torno de 6 horas após a morte do animal; b) não houve uniformidade na distribuição dos parasitos nos cortes sequenciais. Observou-se, no terço distal da porção posterior, uma melhor distribuição do parasito, com as formas parasitárias acompanhando as vilosidades intestinais e uma maior concentração do antígeno. Porém, tal fato não ocorreu nas porções média e proximal, onde a distribuição foi mais irregular e com menor concentração de antígeno.

## Imunodeficientes (SIDA)

A TAB. 1 revela uma maior prevalência de anticorpos anti *Cryptosporidium* em indivíduos imunodeficientes (SIDA).

A prevalência de 55,40% de anticorpos anti *C. parvum* no grupo de indivíduos imunodeficientes, (TAB. XII) (tabela 1) se aproxima ao resultado verificado por TSHAIHONG & MA (1990), que examinaram soros de 70 indivíduos imunodeficientes (SIDA) com gastroenterite através da técnica IFA e verificaram um percentual de 50% de indivíduos com *Cryptosporidium*. CAMPBELL & CURRENT (1983), também examinaram soros de imunodeficientes (SIDA), para pesquisa de anticorpos anti *Cryptosporidium*. De 10 amostras de soro examinadas três estavam positivas, com diluições variando de 1:40 e 1:160, enquanto sete soros restantes não tinham níveis de anticorpos detectáveis.

Os estudos sorológicos mostraram, segundo UNGAR (1990), que a criptosporidiose em imunodeficientes tem aumentado em países menos desenvolvidos, embora na Europa e nos Estados Unidos tenham sido encontrados percentuais de 25% e 35%, respectivamente, resultados bem superiores aos encontrados nos exames de fezes.

A maioria dos trabalhos com imunodeficientes realizados para pesquisa de *Cryptosporidium* foi realizada através de exames de fezes. Os percentuais estimados de *Cryptosporidium* nesses indivíduos são variáveis e, de acordo com CHACIN-BONILLA et al. (1992), são de 3 a 4% nos Estados Unidos. Em pacientes sintomáticos, o percentual é maior e de acordo com WHITESIDE et al. (1984) atinge a 23,3%. No Brasil, estes percentuais atingem 12,1% e 21,2%, de acordo com DIAS et al. (1988) e GUIZELINI & AMATO NETO (1992), respectivamente.

#### Crianças e vaqueiros

A prevalência de *Cryptosporidium* obtida através da Reação de Imunofluorescência Indireta (TAB. 1) foi superior à verificada através dos exames de fezes. Esse resultado já era esperado em razão da maior probabilidade de serem detectados anticorpos anti *Cryptosporidium* nos soros dos indivíduos examinados. Esta observação foi coincidente à verificada por CASEMORE (1990).

O cálculo da sensibilidade apresenta dificuldades inerentes à natureza da amostra (seres humanos). Tais dificuldades acabam determinando um certo grau de incerteza na interpretação dos resultados obtidos, o que foi também observado por MATHAN et al. (1985).

A prevalência de anticorpos anti *Cryptosporidium* nos grupos de crianças e vaqueiros não pode ser comparada aos demais resultados da literatura brasileira por não serem encontrados parâmetros, principalmente em relação à técnica utilizada.

O aparecimento da infecção por *Toxoplasma* não resultou em reação cruzada com *Cryptosporidium*. Essa observação foi verificada também por CAMPBELL & CURRENT (1983). Segundo DE CARLI & SARAIVA (1991) as reações cruzadas de *Cryptosporidium* com *Toxoplasma*, *Sarcocystis* e *Isospora* são mínimas ou inexistentes.

#### CONCLUSÃO

A porção distal do íleo de bezerros inoculados experimentalmente pode ser utilizada como antígeno no diagnóstico sorológico da criptosporidiose humana, através da Reação de Imunofluorescência Indireta.

#### SUMMARY

##### Serological Diagnosis of Human Cryptosporidiosis

In order to verify the prevalence of *Cryptosporidium*, in human individuals, through the Indirect Immunofluorescence test (IIF), sera from 74 immunodeficient patients were examined, with an IgG occurrence of 55,40%. We have verified an estimated global prevalence of 9,05% in 210 sera of examined children. The antigen employed was the one obtained from the distal portion of the posterior third of the ileum of calves experimentally inoculated with *C. parvum*. The IIF test sensitivity, taking the faecal smears as a pattern, was of 79,27%. The prevalence in sera from 44 countrymen examined, was 6,8% (3 positive cases) at 1:40 dilution.

**KEYWORDS:** *Cryptosporidium parvum*, Indirect Immunofluorescence Reaction, Humans beings.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERG, I. E. Cryptosporidiosis in North Dakota. *Farm. Res.* **41**: 22-23, 1984.
- BOUFASSA - OUZROUT, S.; CHERMETTE, R.; MEISSONIER, E. La cryptosporidiosis: une maladie animale et humaine cosmopolita. *Ser. Tech. Off. Int. Epizooties Par.* v. 5, p. 1-96, 1986. Apud ORTOLANI, E. L. **Padronização da técnica de Ziehl - Neelsen para pesquisa de oocistos de Cryptosporidium: estudo de alguns aspectos epidemiológicos de criptosporidiose em bezerros de rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo.** São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 1988, 85 p. (Tese de Doutorado)
- CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the diagnosis of american tripanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **8**: 227 - 234, 1966.
- CAMPBELL, P. N.; CURRENT, W. L. Demonstration of serum antibodies to *Cryptosporidium* sp in normal and immunodeficient humans with confirmed infection. *J Clin. Microbiol.* **18**: 165 - 169, 1983.
- CASEMORE, D. P. Epidemiological aspects of human Cryptosporidiosis. *Epidemiol. Infect.* **104**: 1 - 28, 1990.

CARNEIRO, J.R.; GUIMARÃES, O.S.; CURY, F.C.; RODRIGUES, N.; LIMA, J.D. Diagnóstico sorológico da criptosporidiose humana. *Rev. Pat. Trop.* 24 ( 2 ): 205 - 217 jul/dez. 1995

CHACIN - BONILLA, L.; GUANIPA, N.; CANO, G.; RALEIG, X. ; QUIJADA, L. Cryptosporidiosis among patients with acquired immunodeficient syndrome in Zulia, State, Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 582 - 586, 1992.

COUDERT, J.; AMBROISE, T. D.; THAI, K. T.; POTHIER, M. A. Diagnostic Serologique de L'anguillulose humaine par immunofluorescence (Résultats préliminaires) *Bull. Soc. Path. Exot.*, 74-80, 1968.

CURRENT, W.L. Cryptosporidiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187: 1334-1338, 1985.

CURRENT, W.L.; REESE, N.C.; ERNST, J.V.; BAILEY, W.S.; HEYMAN, M.B.; WEINSTEIN, W.M. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *N. Engl. J. Med.* 308: 1252-1257, 1983.

DE CARLI, G.A. ; SARAIVA, P.J. Diagnóstico da Criptosporidiose humana. *Rev. Bras. Anal. Clin.* 23: 26-30, 1991.

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.Micro.*, 18: 185-190, 1987.

GUIZELINI, E.; AMATO NETO, V. Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp nas fezes diarréicas de adéticos e de crianças e adultos imunocompetentes, em São Paulo. *Rev.Hosp.Clin.Fac.Med.S.Paulo*, 47: 150-152, 1992.

LASSER, K. H.; LEWIN, K. J. ; RYNING, F.W. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Hum. Pathol.* 10: 234-240, 1979.

MAIA, V. *Técnicas histológicas*. 2, ed. São Paulo: Atheneu, 1979. 246 p.

MANN, E.D.; SEKIA, L.H. ; EIBISH, G. *Cryptosporidium* antibodies in Manitoba cattle: A pilot study using an indirect fluorescent antibody procedure. *Can. Vet. J.* 28: 126-128, 1987.

MATHAN, M.M.; VENKATESAN, S.; GEORGE, R.; MATHEW, M. ; MATHAN, V.I. *Cryptosporidium* and diarrhoea in Southern Indian Children. *Lancet.* 2: 1172-1175, 1985.

CARNEIRO, J.R.; GUIMARÃES, O.S.; CURY, F.C.; RODRIGUES, N.; LIMA, J.D. Diagnóstico sorológico da criptosporidiose humana. *Rev. Pat. Trop.* 24 ( 2 ): 205 - 217 jul/dez. 1995

MONCAYO, A.; LUQUETTI, A. O. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85: 489-495, 1990.

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

POHLENZ, J.; MOON, H.W.; CHEVILLE, N.F.; BEMRICK, W.J. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172: 452-457, 1978.

STIBBS, H.H.; ONGERTH, J.F. Immunofluorescence detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal smears. *J. Clin. Microbiol.* 24: 517-521, 1986.

TSHAIHONG, J.C. ; MA, P. Comparison of an indirect fluorescent antibody test and stool examination for the diagnosis of Cryptosporidiosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 770-773, 1990.

TYZZER, E.E. A Sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* 5: 12-13, 1907.

TYZZER, E.E. : *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26: 394-412, 1912.

TZIPORI, S. ; CAMPBELL, I. Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. *J. Clin. Microbiol.* 14: 455-456, 1981.

UNGAR, B.L.P.; GILMAN, R. H.; LANATA, C. F.; PEREZ-SCHAEL, J. Seroepidemiology of *Cryptosporidium* infection in two Latin American populations. *J. Inf. Dis.* 157: 551-556, 1988.

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

WHITESIDE, M. E.; BARKIN, J. S.; MAY, R. G.; WEISS, S. D.; FISCHL, M. A. MACLEOD, C. L. Enteric coccidiosis among patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 1065-1072, 1984.