

RIDASCREEN® Cryptosporidium

N.º producto: C1201



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemania

Teléfono: +49 (0) 61 51 81 02-0/Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Uso previsto

Para diagnósticos *in vitro*. RIDASCREEN® Cryptosporidium es un inmunoensayo enzimático para la determinación cualitativa de *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* en muestras de heces humanas.

2. Resumen y descripción del ensayo

La criptosporidiosis es una infección protozoaria causada por el género *Cryptosporidium*. Este parásito está ampliamente distribuido en el reino animal y es significativa su presencia como microorganismo patógeno en animales domésticos, especialmente en terneros.

En pacientes con sistema inmune sano, la enfermedad se manifiesta en forma de gastroenteritis de curación espontánea. La diarrea dura de 3 a 10 días y puede ir acompañada de fiebre y síntomas gastrointestinales, como náuseas y dolores similares a un cuadro de giardiasis (lambliasis).

Los síntomas y efectos son considerablemente más graves en pacientes inmunodeprimidos, en los que la diarrea es muy grave y persistente. La infección puede pasar de animales a humanos a través de agua contaminada, aunque también puede producirse por contagio directo con un paciente. En el pasado, el método más utilizado para diagnosticar criptosporidiosis consistía en la identificación microscópica de ooquistes en las heces y/o el análisis microscópico de pequeñas biopsias intestinales, que requerían la disponibilidad de personal experimentado.

El ensayo ELISA Cryptosporidium para la determinación simultánea de ambos patógenos en muestras de heces es una alternativa importante al diagnóstico por identificación microscópica. Su sensibilidad iguala la del análisis microscópico, no requiere personal especializado en parasitología, es sencillo y rápido de realizar y no depende de que se encuentren organismos intactos (quistes o trofocitos) en la muestra de heces.

3. Principio de ensayo

En el ensayo RIDASCREEN® Cryptosporidium se utilizan anticuerpos monoclonales según el método tipo sándwich. Estos anticuerpos específicos contra *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* se unen a la superficie de los pocillos de la placa. Una suspensión de la muestra de heces analizada y las muestras control se pipetea en los pocillos de la placa junto con anticuerpos anti-Cryptosporidium biotinilados (conjugado 1) y se incuba todo a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Después de un paso de lavado, se añade conjugado de poliperoxidasas y estreptavidina (conjugado 2) y se incuba nuevamente a temperatura ambiente (20 – 25 °C). En las muestras que contienen antígenos contra Cryptosporidium, los anticuerpos inmovilizados, el antígeno de Cryptosporidium y los anticuerpos conjugados forman un complejo tipo sándwich. En el siguiente paso de lavado se elimina el conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina no unido. En las muestras positivas, la adición de un sustrato provoca que la coloración de la solución con el enzima unido vire de incolora a azul. La adición

de un reactivo de parada provoca que la coloración cambie de azul a amarillo. La extinción es proporcional a la concentración de antígenos de *Cryptosporidium* presentes en la muestra.

4. Reactivos suministrados

Los reactivos del kit son suficientes para 96 determinaciones.

Plate	96	Placa de pocillos, 12 tiras de pocillos (divisibles) en el portatiras; recubiertos con los anticuerpos específicos contra <i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Cryptosporidium hominis</i>
Diluent 1	100 ml	Tampón de dilución de muestra, solución salina tamponada con proteína, lista para usar, color azul
Wash	100 ml	Tampón de lavado, solución salina tamponada con fosfato (concentración 10x); contiene timerosal 0,1 %
Control +	2 ml	Antígeno de <i>Cryptosporidium</i> inactivo; listo para usar
Control -	2 ml	Control negativo (tampón de dilución de muestra), listo para usar
Conjugate 1	13 ml	Anticuerpos conjugados con biotina contra antígenos específicos de <i>Cryptosporidium</i> en solución proteica estabilizada; listo para usar, color azul
Conjugate 2	13 ml	Conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina en solución proteica estabilizada, listo para usar, color naranja
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrógeno/TMB; listo para usar
Stop	12 ml	Reactivo de parada, ácido sulfúrico 1 N, listo para usar

5. Reactivos y almacenamiento

Todos los reactivos deben almacenarse a 2 – 8 °C y pueden utilizarse hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Si se almacena a 2 – 8 °C, el tampón de lavado diluido puede utilizarse durante un periodo máximo de 4 semanas. Evitar la contaminación microbiana. Una vez alcanzada la fecha de caducidad, no es posible garantizar la calidad.

Abrir la bolsa de aluminio con tijeras sin que se rompa el precinto de seguridad. Retornar inmediatamente las tiras de pocillos que no se necesiten a la bolsa de aluminio y guardarlas a 2 – 8 °C.

El sustrato incoloro debe protegerse de la luz directa para evitar la descomposición o el viraje a color azul por efecto de la autooxidación. No utilizar el sustrato si ha virado a color azul.

6. Reactivos adicionales y accesorios necesarios

6.1. Reactivos suministrados

- Agua destilada o desionizada

6.2. Accesorios

- Tubos de ensayo
- Pipetas desechables (ref. Z0001)
- Mezclador de vórtice (opcional, ver 9.3.)
- Micropipeta de 50 – 100 µl y 1 ml
- Probeta (1000 ml)
- Cronómetro
- Dispositivo de lavado de placas de pocillos o pipetas multicanal (300 µl)
- Fotómetro para placas de pocillos (450 nm, filtro de referencia 620 – 650 nm)
- Papel de filtro (toallas desechables)
- Recipiente para residuos de laboratorio con solución de hipoclorito 0,5 %

7. Precauciones para usuarios

Para diagnósticos *in vitro* exclusivamente.

Este ensayo debe realizarlo exclusivamente personal de laboratorio cualificado. Respetar las directrices para el trabajo en laboratorios médicos. Respetar siempre las instrucciones de uso de este ensayo.

No pipetear las muestras y los reactivos con la boca y evitar el contacto con lesiones de la piel y mucosas. Llevar equipo de protección personal (guantes, bata, gafas de protección) al manipular las muestras y lavar las manos después de finalizar el ensayo. No fumar, comer o beber en las zonas en que se procesen las muestras.

Para más información, consultar la hoja de datos de seguridad (MSDS) en www.r-biopharm.com.

El kit incluye un control positivo que contiene el antígeno *Cryptosporidium* inactivado. Las toxinas y las muestras de heces deben tratarse como material potencialmente infeccioso y manejarse de acuerdo con lo establecido en las normativas de seguridad nacionales.

El tampón de lavado contiene timerosal 0,1 % como conservante. Esta sustancia no debe entrar en contacto con la piel o con las mucosas.

Los reactivos y el material usados deben desecharse de forma correcta y responsable. Respetar la normativa nacional en materia de eliminación de residuos.

8. Obtención y almacenamiento de muestras

Guardar el material del ensayo a 2 – 8 °C hasta que se vaya a usar. Si el material no puede utilizarse en ensayos hasta dentro de tres días, recomendamos almacenarlo a como mínimo a – 20 °C. No congelar y descongelar la muestra innecesariamente.

No guardar las muestras de heces en recipientes de transporte que contengan materiales con conservantes, sueros animales, iones metálicos, agentes oxidantes o detergentes porque pueden interferir con el ensayo RIDASCREEN® Cryptosporidium.

En caso de utilizar hisopados rectales, comprobar si el volumen de material fecal es suficiente (aprox. 100 mg) para el ensayo.

La localización de contactos debe incluir muestras de heces de personas contactadas que no presenten síntomas clínicos para poder identificar portadores asintomáticos.

9. Procedimientos de ensayo

9.1. Información general

Los reactivos y pocillos **Plate** deben adquirir temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes de utilizarlos. No sacar las tiras de pocillos de la bolsa de aluminio hasta que hayan alcanzado temperatura ambiente. Mezclar a fondo los reactivos inmediatamente antes de usarlos. Después de usar, almacenar las tiras de pocillos (en bolsas de aluminio) y los reactivos a 2 – 8°C. Desechar las tiras de pocillos usadas. No utilizar los reactivos y las tiras de pocillos en caso si el envase está dañado o los viales tienen pérdidas.

Para evitar la contaminación cruzada, las muestras no deben entrar en contacto directo con los componentes del kit.

No realizar el ensayo en condiciones de luz solar directa. Recomendamos cubrir la placa de pocillos o colocar encima un envoltorio plástico para evitar pérdidas por evaporación.

9.2. Preparación del tampón de lavado

Mezclar 1 parte de tampón de lavado concentrado **Wash** con 9 partes de agua destilada. Calentar previamente el concentrado (en baño maría a 37 °C) para disolver los posibles cristales presentes.

9.3 Preparación de las muestras

Llenar un tubo de ensayo etiquetado con un 1 ml de tampón de dilución de muestra RIDASCREEN® **Diluent 1**. Utilizar una pipeta desechable (ref. Z0001) para extraer una muestra de heces fluida (aprox. 100 µl) hasta justo por encima de la segunda marca y añadirla al tampón del tubo de ensayo para formar una suspensión. Para formar una suspensión con una muestra de heces sólida, añadir una cantidad equivalente (aprox. 50 - 100 mg) con una espátula o asa de siembra desechable.

Homogeneizar la suspensión de heces mediante aspiración y eyección con una pipeta desechable o mediante agitación en un mezclador de vórtice. Dejar reposar brevemente la suspensión para que sedimenten las partículas de heces gruesas; el sobrenadante clarificado de la suspensión puede usarse directamente en el ensayo. Si el procedimiento de ensayo se realiza en un sistema ELISA automatizado, el sobrenadante debe estar libre de partículas. En este caso, es aconsejable centrifugar la muestra a 2.500 G durante 5 minutos.

Nota:

Las muestras de heces diluidas en **Diluent | 1** pueden analizarse en todos los RIDASCREEN® ELISA para los que se utilice **Diluent | 1**.

9.4. Primera incubación

Después de llenar un número suficiente de pocillos del portatiras, pipetear 100 µl del control positivo **Control | +**, del control negativo **Control | -** o de la suspensión de heces a los pocillos. Acto seguido, añadir 100 µl del anticuerpo conjugado con biotina **Conjugate | 1** y mezclar (golpeado suavemente contra un lado de la placa); incubar a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 30 minutos.

9.5. Lavado

Es fundamental realizar un lavado exhaustivo si quieren obtenerse resultados correctos y, en consecuencia, deben respetarse rigurosamente los pasos de lavado especificados en las instrucciones. Vaciar las sustancias incubadas en los pocillos en un recipiente de residuos para eliminarlas de acuerdo con la normativa local en materia de eliminación de residuos. Acto seguido, sacudir la placa sobre papel absorbente para eliminar la humedad restante. A continuación, lavar la placa cinco veces con 300 µl de tampón de lavado cada vez. Después de cada paso de lavado, sacudir los pocillos sobre una pieza de papel absorbente seco y limpio para verificar que están completamente vacíos.

Si se utiliza un equipo de limpieza de microplacas o un equipo ELISA automático, comprobar si el equipo está ajustado correctamente; solicitar los ajustes al fabricante, si es preciso. Los equipos suministrados por R-Biopharm están programados con ajustes y protocolos de trabajo validados. A fin de no bloquear las boquillas de lavado, utilizar solamente suspensiones de heces libres de partículas (ver punto 9.3, Preparación de las muestras). Verificar asimismo que se ha aspirado completamente el líquido en cada paso de lavado.

9.6. Segunda incubación

Pipetear 100 µl de conjugado de poliperoxidasa y estreptavidina **Conjugate | 2** en los pocillos e incubar a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 15 min.

9.7. Lavado

Lavar según se ha descrito en el punto 9.5.

9.8. Tercera incubación

Llenar todos los pocillos con 100 µl de sustrato **Substrate**. Incubar la placa a temperatura ambiente (20 – 25 °C) durante 15 minutos en la cámara oscura. A continuación, llenar todos los pocillos con 50 µl de reactivo de parada **Stop** con objeto de detener la reacción. Después de mezclar con precaución golpeando suavemente contra un lado de la placa, medir la extinción a 450 nm (opcionalmente a 450/620 nm). Ajustar el punto cero en el aire, es decir, sin la placa de pocillos.

Nota:

En las muestras de pacientes con positivo alto pueden formarse precipitados de sustrato de color negro.

10. Control de calidad, información sobre caducidad de reactivos

A efectos de control de calidad, deben utilizarse controles positivos y negativos cada vez que se realice el ensayo con objeto de garantizar que los reactivos son estables y que el ensayo se realiza correctamente. El ensayo se habrá realizado correctamente si la tasa de extinción (O.D.) de control negativo es menor que 0,2 a 450 nm (menor que 0,160 a 450/620 nm) y el valor medido para el control positivo es mayor que 0,8 a 450 nm o a 450/620 nm. Un valor mayor que 0,2 (0,160) para el control negativo puede indicar que el lavado no ha sido suficiente. Las desviaciones de los valores requeridos, como turbidez o coloración azul del sustrato incoloro antes de introducirlo en los pocillos, puede indicar que los reactivos han caducado. Si no se cumplen los valores especificados, deben comprobarse los siguientes puntos antes de repetir el ensayo:

- Fecha de caducidad de los reactivos utilizados
- Funcionamiento de los equipos utilizados (p. ej., calibración)
- Procedimiento de ensayo correcto
- Control visual de los componentes del kit para detectar contaminación o pérdidas; no utilizar soluciones de sustrato que hayan virado a color azul.

Si los requisitos siguen sin cumplirse después de repetir el ensayo, consultar al fabricante o al distribuidor local de R-Biopharm.

11. Evaluación e interpretación

11.1. Cálculo del corte

Con objeto de establecer el corte, se añaden 0,15 unidades de extinción a la extinción medida para el control negativo.

$$\text{Corte} = \text{extinción del control negativo} + 0,15$$

11.2. Resultados del ensayo

La evaluación de la muestra es **positiva** si la tasa de extinción supera en más del 10 % el valor de corte calculado.

La evaluación de la muestra es **marginal** si la tasa de extinción está dentro de un rango 10 % menor a 10 % mayor que el valor de corte. Si la repetición de la prueba de una muestra de heces fresca cae nuevamente dentro de la zona gris, la evaluación de la muestra es negativa.

Las muestras con extinciones inferiores en más del 10 % al valor de corte calculado deben considerarse **negativas**.

12. Limitaciones del método

El ensayo RIDASCREEN® Cryptosporidium permite determinar antígenos de *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis*. El nivel de extinción determinado no puede asociarse a la presencia o gravedad de los síntomas clínicos. **Los resultados obtenidos deben interpretarse siempre en combinación con el cuadro clínico.**

Un resultado **positivo** no permite descartar la presencia de otros patógenos infecciosos.

Un resultado **negativo** no permite descartar la posibilidad de infección con *Cryptosporidium*. Este resultado puede deberse a la excreción intermitente del parásito o a que la cantidad de antígeno en la muestra sea demasiado pequeña. Si la anamnesis del paciente da pie a sospechar una infección con *Cryptosporidium*, deberá repetirse la prueba con una muestra de heces diferente.

Un resultado **marginal** puede deberse a la distribución no homogénea de los parásitos en la muestra de heces. En este caso, deberá repetirse la prueba con una segunda suspensión de la misma muestra o solicitarse una nueva muestra.

13. Rendimientos

13.1 Sensibilidad analítica

Para determinar la sensibilidad analítica del ELISA RIDASCREEN® Cryptosporidium, se analizó el límite del blanco (limit of blank, LoB) en 270 ensayos del diluyente 1 y el límite de detección (limit of detection, LoD) en 90 ensayos. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Resultados de sensibilidad analítica para ELISA RIDASCREEN® Cryptosporidium

	MV [DO 450/620]	Quistes/Reacción
LoB	0,031	-
LoD	0,053	1.56 x 10 ⁴

13.2. Estudio de comparación clínico

En una investigación clínica realizada en Gran Bretaña se evaluó el ensayo de RIDASCREEN® Cryptosporidium con un total de 240 muestras de heces (estudios prospectivos y retrospectivos ciegos). Se realizó una comparación con métodos de microscopía para Cryptosporidium usuales en Gran Bretaña (tinción con fenol-auramina y tinción de Ziehl-Neelsen), así como una PCR diferencial en tiempo real. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Comparación del ELISA RIDASCREEN® Cryptosporidium con microscopía y PCR en tiempo real

		Microscopía		PCR en tiempo real [#]	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
RIDASCREEN® Cryptosporidium	Positivo	12	11	22	1
	Negativo	1	216	1	214

Sensibilidad (IC): 92 % (64 – 100) 96 % (78 – 100)

Especificidad (IC): 95 % (91 – 98) 100 % (97 – 100)

[#]Cantidad insuficiente de material en dos muestras de heces

IC: intervalo de confianza en %

13.3. Reactividad cruzada

Se estudiaron diferentes organismos patógenos del tracto intestinal con el ensayo RIDASCREEN® Cryptosporidium y, excepto *Campylobacter coli*, no mostraron reactividad cruzada. Estos estudios se realizaron con suspensiones de bacterias o virus no diluidas con concentraciones de 10⁶ a 10⁹ organismos por ml. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: Reactividad cruzada con microorganismos patógenos

Organismo	Origen	DO [450/620] Valor medio
Adenovirus	Sobrenadante de cultivo celular	0,011
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cultivo	-0,001
<i>Arcobacter butzleri</i>	Cultivo	0,012
Astrovirus	Sobrenadante de cultivo celular	-0,001
<i>Bacillus cereus</i>	Cultivo	0,006
<i>Bacteroides fragilis</i>	Cultivo	-0,005
<i>Campylobacter coli</i>	Cultivo	0,181
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cultivo	0,034

<i>Candida albicans</i>	Cultivo	0,016
<i>Citrobacter freundii</i>	Cultivo	0,008
<i>Clostridium difficile</i>	Cultivo	0,009
<i>Clostridium perfringens</i>	Cultivo	0,016
<i>Clostridium sordellii</i>	Cultivo	0,003
<i>Cryptosporidium muris</i>	Cultivo	2,782
<i>E. coli EPEC</i>	Cultivo	0,031
<i>E. coli ETEC</i>	Cultivo	0,002
<i>E. coli STEC</i>	Cultivo	0,017
<i>Entamoeba histolytica</i>	Cultivo	-0,003
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cultivo	0,007
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultivo	0,001
<i>Giardia lamblia</i>	Heces	-0,004
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultivo	0,030
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultivo	0,016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultivo	0,037
Rotavirus	Sobrenadante de cultivo celular	0,009
<i>Salmonella enteritidis</i>	Cultivo	0,018
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cultivo	0,010
<i>Serratia liquefaciens</i>	Cultivo	0,005
<i>Shigella flexneri</i>	Cultivo	0,013
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultivo	0,020
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultivo	0,018
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cultivo	0,019
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cultivo	0,015

13.4. Precisión

Para determinar la reproducibilidad intraensayo se analizaron 40 réplicas de estas referencias, representativas del rango de medición completo, desde negativo a positivo alto. Se determinaron las medias y los coeficientes de variación (CV) para tres lotes de los kits. Para la reproducibilidad interensayo se analizaron referencias en forma de duplicados de diez días de trabajo diferentes, con dos ensayos por día. Las medidas fueron realizadas por tres técnicos sobre tres lotes de los kits. Se determinó la reproducibilidad entre lotes para los tres lotes de kits. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 4. Tabla 4: Reproducibilidad/precisión del ELISA RIDASCREEN® *Cryptosporidium*

Tabla 4: Reproducibilidad/precisión del ELISA RIDASCREEN® Cryptosporidium

Referencia		Intraensayo			Interensayo			Interlote
		Lote de kit 1	Lote de kit 2	Lote de kit 3	Lote de kit 1	Lote de kit 2	Lote de kit 3	Lote de kit 1-3
1	MV [DO 450/620]	2,262	2,584	2,562	1,729	2,163	1,926	1,939
	CV (%)	6,00%	7,36%	4,75%	17,34%	15,94%	11,19%	18,47%
2	MV [DO 450/620]	1,391	1,636	1,508	1,000	1,275	1,158	1,144
	CV (%)	5,81%	6,94%	5,93%	14,94%	18,02%	11,26%	19,20%
3	MV [DO 450/620]	1,050	1,083	1,262	0,759	1,012	0,891	0,887
	CV (%)	8,17%	8,15%	7,67%	17,72%	18,02%	13,20%	22,23%
4	MV [DO 450/620]	0,675	0,706	0,766	0,413	0,562	0,511	0,495
	CV (%)	4,93%	7,33%	7,97%	18,15%	20,13%	13,03%	23,01%
5	MV [DO 450/620]	0,461	0,487	0,479	0,259	0,357	0,320	0,312
	CV (%)	5,60%	9,69%	7,49%	25,29%	26,51%	22,13%	29,03%
6	MV [DO 450/620]	0,228	0,287	0,268	0,148	0,214	0,194	0,185
	CV (%)	6,96%	9,71%	6,67%	26,68%	25,63%	20,87%	30,12%

13.5. Sustancias interferentes

Las siguientes sustancias no demostraron tener efectos en los resultados del ensayo al mezclarlas con los sobrenadantes de muestras de heces positivas y negativas en las concentraciones descritas:

sulfato de bario (medio de contraste para rayos X, 18,5 % p/p), loperamida (antidiarreico; 0,02 % p/p), Pepto-Bismol (antidiarreico, 6,6 % v/p), ciclamato de sodio (edulcorante, 1,3 % v/p), sangre humana (5,0 % v/p), ácido esteárico/palmitico (grasas en heces, mezcla 1:1, 40,0 % p/p), diclofenaco (analgésico, 0,1 % v/p).

Se estudiaron además posibles relaciones entre dosis y efecto para el metronidazol (0,5) (antibiótico, 3,0 % vol/peso) y las mucinas (5,0 % en peso).

Sin embargo, al analizar diluciones seriadas con metronidazol no pudo comprobarse la existencia de una relación entre la concentración y los valores de DO. La única excepción es la

concentración más alta estudiada, más alta incluso que la concentración "en el peor de los casos" y que ya se ensayó en el primer análisis (tres veces la dosis diaria). Por consiguiente, puede considerarse improbable la interferencia debido a metronidazol.

Las pruebas con mucinas confirmaron el análisis inicial: en todas las diluciones seriadas se repetían valores de DO constantes y demasiado bajos que influían en las evaluaciones de las muestras. Las mucinas deben considerarse, por tanto, sustancias interferentes.

Anexo

Símbolos específicos del ensayo:

Plate	Placa de pocillos
Diluent 1	Tampón de dilución de muestra
Wash	Tampón de lavado
Control +	Control positivo
Control -	Control negativo
Conjugate 1	Conjugado 1
Conjugate 2	Conjugado 2
Substrate	Sustrato
Stop	Reactivo de parada

Bibliografía

1. Clavel, A.: Evaluation of the optimal number of fecal specimens in the diagnosis of cryptosporidiosis in AIDS and immunocompetent patients. *Eur. Journal Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14, 46-49 (1995).
2. Current, W. L., Garcia, L. S.: Cryptosporidiosis. *Clinics in Laboratory Medicine* 11 (No. 4), 873 - 895 (1991).
3. Current, W. L., Garcia, L. S.: Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4 (No. 3), 325 - 358 (1991).
4. Flanigan, T. P.: Human immunodeficiency virus infection and cryptosporidiosis: Protective immune responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50 (5) Suppl., 29 - 35 (1994).
5. Guarino, A. et al.: Human intestinal cryptosporidiosis: secretory diarrhea and enterotoxic activity in Caco-2 cells. *J. Infect. Dis.* 171, 976 - 983 (1995).
6. Hayes, E. B. et al.: Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *New. Engl. J. Med.* 320 (No. 21), 1372 - 1376 (1989).
7. Le Chevallier, M. W. et al.: Giardia and Cryptosporidium spp. in filtered drinking water supplies. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (No. 9), 2617 - 2621 (1991).
8. Mc. Anulty, J. M. et al.: A community wide outbreak of cryptosporidiosis associated with swimming at a wave pool. *Jama* 272 (No. 20), 1597 - 1600 (1994).