

RIDASCREEN® Cryptosporidium

No do artigo: C1201



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

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



1. Uso previsto

Para uso no diagnóstico *in vitro*. O RIDASCREEN® *Cryptosporidium* é uma análise imunológica para a determinação qualitativa de *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis* em amostras de fezes humanas.

2. Resumo e explicação do teste

A criptosporidíase é uma infecção por protozoário causada pelo gênero *Cryptosporidium*. Esse parasita é amplamente encontrado em animais e tem uma presença significativa como microrganismo patogênico em animais domésticos, particularmente bezerros.

Em pacientes imunocompetentes, a doença se manifesta como uma gastroenterite que se cura espontaneamente. A diarreia dura de 3 e 10 dias e pode vir acompanhada de febre e sintomas gastrointestinais, como náusea e dor, semelhantes ao da giardíase (lamblíase).

Os sintomas e efeitos são muito mais graves em pacientes com imunidade comprometida, em que o curso da diarreia é grave e persistente. A infecção pode passar de um animal para o ser humano por meio de água contaminada, mas também é contagiosa pelo contato pessoal com um paciente. Anteriormente, o método mais usado para diagnosticar a criptosporidíase era a determinação microscópica de oocistos nas fezes e/ou o exame microscópico de pequenos biotatos intestinais, que exigia a disponibilidade de funcionários experientes.

O ELISA de *Cryptosporidium* descrito neste documento, para a determinação simultânea de ambos os patógenos em amostras de fezes é uma alternativa importante ao diagnóstico por exame microscópico. Sua sensibilidade equivale a de um exame microscópico, não requer funcionários qualificados especificamente em parasitologia, é simples, pode ser realizado rapidamente e não depende da detecção de organismos intactos (cistos ou trofozoítos) na amostra de fezes.

3. Princípio do teste

O teste de RIDASCREEN® *Cryptosporidium* emprega anticorpos específicos em um método do tipo sanduíche. Esses anticorpos específicos para o *Cryptosporidium parvum* e o *Cryptosporidium hominis* ficam ligados à superfície dos poços da placa de micropoços. Usa-se uma pipeta para posicionar uma suspensão da amostra de fezes para ser examinada, bem como as amostras de controle no poço da placa de micropoços, juntamente com anticorpos contra *Cryptosporidium* biotinados (Conjugado 1) para incubação à temperatura ambiente (20 – 25 °C). Depois de uma etapa de lavagem, o conjugado de estreptavidina poli-peroxidase (Conjugado 2) é adicionado e incubado novamente à temperatura ambiente (20 – 25 °C). Se há anticorpos contra *Cryptosporidium* em uma amostra, anticorpos imobilizados, o antígeno de *Cryptosporidium* e o anticorpo conjugado formam um complexo de sanduíche. Outra etapa de lavagem remove o conjugado de estreptavidina poli-peroxidase não ligado. Em amostras positivas, a adição de um substrato muda a enzima ligada, de uma solução incolor

para uma solução azul. A adição de um reagente de parada muda a cor de azul para amarelo. A extinção é proporcional à concentração de antígenos de *Cryptosporidium* encontrados na amostra.

4. Reagentes fornecidos

Os reagentes do kit são suficientes para 96 determinações.

Plate	96	Placa de micropoços, 12 tiras de micropoços (que podem ser divididas) no suporte para tiras; revestida com anticorpos para <i>Cryptosporidium parvum</i> e <i>Cryptosporidium hominis</i> .
Diluent 1	100 ml	Tampão de diluição de amostra, solução de NaCl tamponada com proteína, pronto para usar, cor azul
Wash	100 ml	Tampão de lavagem, solução de NaCl tamponada com fosfato (concentrada 10 vezes); contém 0,1% de timerosal
Control +	2 ml	Antígeno de <i>Cryptosporidium</i> inativado; pronto para usar
Control -	2 ml	Controle negativo (tampão de diluição da amostra); pronto para usar
Conjugate 1	13 ml	Anticorpos conjugados à biotina para antígenos específicos para o <i>Cryptosporidium</i> em uma solução de proteína estabilizada; pronto para usar; cor azul
Conjugate 2	13 ml	Conjugado de estreptavidina poli-peroxidase em solução de proteína estabilizada; pronto para usar; cor laranja
Substrate	13 ml	Peróxido de hidrogênio/TMB; pronto para usar
Stop	12 ml	Reagente de parada; 1 N de ácido sulfúrico; pronto para usar

5. Reagentes e sua armazenagem

Todos os reagentes devem ser armazenados a 2 – 8 °C e podem ser usados até a data impressa na etiqueta. Armazenado a 2 – 8 °C, o tampão de lavagem diluído pode ser usado por, no máximo, 4 semanas. Deve-se evitar a contaminação microbiana. Após a data de expiração, a garantia da qualidade já não é válida.

A bolsa de alumínio deve ser aberta com tesoura de forma que a vedação de grampo não seja rasgada. As tiras de micropoços que não forem necessárias devem ser colocadas em uma bolsa de alumínio imediatamente e armazenadas a 2 – 8 °C.

O substrato incolor também deve ser protegido contra a luz solar direta, para impedir que se decomponha ou fique azul devido à auto-oxidação. Depois que o substrato fica azul, ele não pode mais ser utilizado.

6. Reagentes adicionais necessários – e equipamento necessário

6.1. Reagentes fornecidos

- Água destilada ou deionizada

6.2. Equipamento

- Tubos de ensaio
- Pipetas descartáveis (Artigo no: Z0001)
- Misturador de vórtice (opcional, consulte 9.3.)
- Micropipeta para volumes de 50 – 100 µl e 1 ml
- Cilindro de medição (1.000 ml)
- Cronômetro
- Dispositivo de lavagem para placas de micropoços ou pipetas multicanal (300 µl)
- Fotômetro para placa de micropoços (450 nm e filtro de referência 620 – 650 nm)
- Papel filtro (toalhas para laboratório)
- Contêiner de resíduos com uma solução de 0,5% de hipoclorito

7. Precaução para os usuários

Somente para uso no diagnóstico *in vitro*.

Este ensaio só deve ser realizado por profissionais de laboratório treinados. As diretrizes para trabalhar em laboratórios médicos devem ser seguidas. Sempre siga rigorosamente as instruções para os usuários referentes a este teste.

As amostras ou reagentes não devem ser pipetados com a boca, e o contato com a pele ferida ou com membranas mucosas deve ser evitado. Use equipamento de proteção pessoal (luvas adequadas, avental, óculos de segurança) ao manusear as amostras e lave as mãos depois de concluir o teste. Não fume, coma ou beba nas áreas onde amostras ou reagentes estão sendo processados.

Para ver mais detalhes, consulte as Folhas de Dados de Segurança de Materiais (MSDS) em www.r-biopharm.com.

O kit inclui um controle positivo que contém o antígeno de *Cryptosporidium* inativado. As toxinas e as amostras de fezes devem ser tratadas como material potencialmente infeccioso e manuseadas de acordo com os regulamentos nacionais de segurança.

O tampão de lavagem contém 0,1% de timerosal como conservante. Não se deve permitir que essa substância entre em contato com a pele ou membranas mucosas.

Garanta o descarte adequado e responsável de todos os reagentes e materiais após o uso. Para o descarte, siga os regulamentos nacionais.

8. Coleta e armazenagem de amostras

Até o momento da utilização, armazene o material de teste a 2 – 8 °C. Se não for possível usar o material para um teste dentro de três dias, recomendamos a armazenagem a –20 °C ou menos. Evite congelar e descongelar a amostra repetidamente.

As amostras de fezes não devem ser coletadas em contêineres de transporte contendo meios conservantes, soros animais, íons metálicos, agentes oxidantes ou detergentes, já que podem interferir no Teste de *Cryptosporidium* RIDASCREEN®.

Se esfregãos retais forem utilizados, certifique-se de que o volume de material fecal seja suficiente (aprox. 100 mg) para o teste.

O rastreio do contato deve incluir amostras de fezes tomadas de pessoas de contato que não apresentam sintomas clínicos, para identificar portadores assintomáticos.

9. Procedimentos do teste

9.1. Informações gerais

Todos os reagentes e o micropoço **Plate** devem atingir a temperatura ambiente (20 – 25 °C) antes do uso. As tiras de micropoços não devem ser removidas da bolsa de alumínio até atingir a temperatura ambiente. Os reagentes devem ser misturados totalmente imediatamente antes do uso. Depois do uso, as tiras de micropoços (colocadas em bolsas vedadas) e os reagentes devem ser armazenados a 2 – 8 °C. Depois de usadas, as tiras de micropoços não podem ser usadas novamente. Os reagentes e as tiras de micropoços não devem ser usados se a embalagem estiver danificada ou os frascos estiverem vazando.

Para evitar a contaminação cruzada, deve-se impedir que as amostras entrem em contato com os componentes do kit.

O teste não deve ser realizado sob luz solar direta. Recomendamos a cobertura da tira de micropoços ou o envolvimento em plástico para evitar perdas por evaporação.

9.2. Preparação do tampão de lavagem

Misture 1 parte de concentrado de tampão de lavagem **Wash** com 9 partes de água destilada. Os cristais presentes no concentrado devem ser aquecidos de antemão (em banho-maria a 37 °C) para serem dissolvidos.

9.3 Preparação das amostras

Pegue um tubo de ensaio etiquetado e coloque 1 ml de tampão de diluição de amostra RIDASCREEN® **Diluent | 1** nele. Use uma pipeta descartável (artigo no Z0001) para sugar uma amostra fina de fezes (aprox. 100 µl) até um ponto logo acima da segunda protuberância e adicione ao tampão no tubo de ensaio para fazer uma suspensão. Para fazer uma suspensão com uma amostra de fezes sólidas, adicione uma quantidade equivalente (aprox. 50–100 mg) com uma espátula ou ansa de inoculação descartável.

Homogeneíze a suspensão de fezes por sucção e ejeção com uma pipeta ou, como alternativa, misture com um misturador Vortex. Deixe a suspensão descansar por um breve período para que as partículas grossas de fezes assentem, e esse sobrenadante clarificado da suspensão de fezes pode ser usado diretamente no teste. Caso o procedimento do teste seja realizado em um sistema ELISA automatizado, o sobrenadante deve obrigatoriamente estar livre de partículas. Nesse caso, é recomendável centrifugar a amostra a 2.500 G durante 5 minutos.

Observação:

As amostras de fezes diluídas em **Diluent | 1** podem ser testadas em todos os ELISA RIDASCREEN® nos quais **Diluent | 1** é usado.

9.4. Primeira incubação

Depois de encher um número suficiente de poços no suporte para tiras, use uma pipeta para adicionar 100 µl do controle positivo **Control | +**, controle negativo **Control | -**, ou suspensão das fezes aos poços. Em seguida, adicione 100 µl do anticorpo conjugado à biotina **Conjugate | 1** e misture (batendo levemente no lado da placa); depois, incube por 30 minutos à temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.5. Lavagem

Lavar cuidadosamente é importante para a obtenção de resultados corretos. Portanto, siga rigorosamente as instruções. A substância incubada nos poços deve ser esvaziada em um contêiner de resíduos e descartada de acordo com os regulamentos locais. Depois disso, deite a placa em um papel absorvente para remover a umidade residual. Em seguida, lave a placa cinco vezes usando 300 µl de tampão de lavagem em cada vez. Certifique-se de que os poços sejam totalmente esvaziados, deitando-os, após cada lavagem, em uma parte do papel absorvente que ainda esteja seca e não tenha sido usada.

Se você usa uma lavadora de microplacas ou um ELISA totalmente automatizado, certifique-se de que a máquina esteja ajustada corretamente; se necessário, solicite os ajustes do fabricante. Os aparelhos que a R-Biopharm fornece já estão programados com ajustes e protocolos de controle validados. Para evitar o entupimento das agulhas de lavagem, as suspensões de fezes que não estejam livres de partículas não devem ser utilizadas (consulte o Item 9.3., Preparação das amostras). Além disso, certifique-se de que todo o líquido seja aspirado durante cada etapa de lavagem.

9.6. Segunda incubação

Use uma pipeta para colocar 100 µl de conjugado de estreptavidina poli-peroxidase **Conjugate | 2** nos poços e, em seguida, incube durante 15 minutos à temperatura ambiente (20 – 25 °C).

9.7. Lavagem

Lave conforme o descrito no Item 9.5.

9.8. Terceira incubação

Encha todos os poços com 100 µl de substrato **Substrate**. Em seguida, incube a placa por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente (20 – 25 °C). Em seguida, coloque 50 µl de reagente de parada em todos os poços **Stop** a fim de parar a reação. Depois de misturar cuidadosamente ao bater ligeiramente no lado da placa, meça a extinção a 450 nm (opcional: 450/620 nm). Ajuste o ponto zero no ar, ou seja, sem a placa de micropoços.

Observação:

Amostras altamente positivas de pacientes podem provocar precipitados de cor preta do substrato.

10. Controle de qualidade – indicações da expiração do reagente

Para fins de controle de qualidade, controles positivos e negativos devem ser usados cada vez que o teste é realizado, para garantir que os reagentes estejam estáveis e que o teste seja realizado corretamente. O teste foi realizado corretamente se a taxa de extinção (O. D.) do controle negativo é inferior a 0,2 a 450 nm (inferior a 0,160 a 450/620 nm) e o valor medido para o controle positivo é maior que 0,8 a 450 nm ou a 450/620 nm. Um valor superior a 0,2 (0,160) para o controle negativo pode indicar que a lavagem foi insuficiente. O desvio os valores exigidos, bem como uma cor turva ou azul do substrato incolor antes que seja colocado nos poços pode indicar que os reagentes expiraram. Se os valores estipulados não forem obtidos, verifique os pontos a seguir antes de repetir o teste:

- Data de expiração dos reagentes usados
- Funcionalidade do equipamento que está sendo usado (por exemplo: calibragem)
- Procedimento de teste correto
- Inspeção visual dos componentes do kit à procura de contaminação ou vazamentos – a solução de substrato que se torna azulada não deve ser usada.

Se mesmo assim as condições não forem preenchidas após a repetição do teste, consulte o fabricante ou o distribuidor local da R-Biopharm.

11. Avaliação e interpretação

11.1. Cálculo do corte

Para estabelecer o corte, 0,15 unidade de extinção é adicionada à extinção medida para o controle negativo.

$$\text{Corte} = \text{extinção para o controle negativo} + 0,15$$

11.2. Resultados do teste

A avaliação da amostra é **positiva** se a taxa de extinção é mais do que 10% superior ao valor de corte calculado.

A avaliação da amostra é **marginal** se a taxa de extinção varia entre 10% menor e 10% maior que o valor de corte. Se a repetição do exame com uma nova amostra de fezes fica novamente na zona cinza, a avaliação da amostra é negativa.

Amostras com extinções mais de 10% abaixo do corte calculado devem receber uma **avaliação** negativa.

12. Limitações do método

O Teste de RIDASCREEN® Cryptosporidium pode determinar antígenos de *Cryptosporidium parvum* e *Cryptosporidium hominis*. Não é possível associar o nível determinado de extinção à ocorrência ou gravidade dos sintomas clínicos. **Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em conjunto com o quadro clínico.**

Um resultado **positivo** não descarta a presença de outros patógenos infecciosos.

Um resultado **negativo** não descarta a possibilidade de infecção por *Clostridium difficile*. Um resultado desse tipo pode ocorrer devido à excreção intermitente do parasita ou à quantidade muito pequena de antígeno na amostra. Se a anamnese do paciente respalda a suspeita de infecção por *Cryptosporidium*, deve-se repetir o exame com outra amostra de fezes.

Um resultado **marginal** pode ser causado pela distribuição não homogênea dos parasitas na amostra de fezes. Nesse caso, o exame deve ser repetido com uma segunda suspensão da mesma amostra ou outra amostra de fezes deve ser solicitada.

13. Características de desempenho

13.1 Sensibilidade analítica

Para determinar a sensibilidade analítica do ELISA de RIDASCREEN® Cryptosporidium, o limite de branco (LoB) foi analisado em 270 ensaios de Diluente 1, e o limite de detecção (LoD) foi analisado em 90 ensaios. Os resultados desse estudo são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados de sensibilidade analítica do ELISA de RIDASCREEN® Cryptosporidium

	MV [OD 450/620]	Cistos/Reação
LoB	0,031	-
LoD	0,053	$1,56 \times 10^4$

13.2. Estudo de comparação clínica

Uma investigação clínica na Grã Bretanha avaliou o Teste de RIDASCREEN® Cryptosporidium com um total de 240 amostras de fezes (estudos prospectivos e retrospectivos cegos). Houve uma comparação com métodos britânicos estabelecidos de microscopia para *Cryptosporidia*

(auramina-fenol e coloração Ziehl-Neelsen) e um PCR de diferenciação em tempo real. Os resultados desse estudo são resumidos na Tabela 2.

Tab. 2: Comparação do ELISA de RIDASCREEN® Cryptosporidium com microscopia e PCR em tempo real

		Microscopia		PCR em tempo real [#]	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
RIDASCREEN® Cryptosporidium	Positivo	12	11	22	1
	Negativo	1	216	1	214

Sensibilidade (CI): 92 % (64–100) 96 % (78–100)
 Especificidade (CI): 95 % (91-98) 100 % (97-100)

[#]Quantidade insuficiente de material em duas amostras de fezes

CI: Intervalo de confiança em %

13.3. Reatividade cruzada

Diversos micro-organismos patogênicos do trato intestinal foram examinados com o Teste de RIDASCREEN® Cryptosporidium, com exceção do *Campylobacter coli*, não apresentaram reatividade cruzada. Esses estudos foram realizados com suspensões não diluídas de vírus ou bactérias que comprovadamente tinham concentrações de 10⁶ a 10⁹ organismos por ml. Os resultados desse estudo são listados na Tabela 3.

Tabela 3: Reatividade cruzada com micro-organismos patogênicos

Organismo	Origem	OD [450/620] Valor médio
Adenovírus	Sobrenadante da cultura de células	0,011
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cultura	-0,001
<i>Arcobacter butzleri</i>	Cultura	0,012
Astrovírus	Sobrenadante da cultura de células	-0,001
<i>Bacillus cereus</i>	Cultura	0,006
<i>Bacteroides fragilis</i>	Cultura	-0,005
<i>Campylobacter coli</i>	Cultura	0,181
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cultura	0,034
<i>Candida albicans</i>	Cultura	0,016

Organismo	Origem	OD [450/620] Valor médio
<i>Citrobacter freundii</i>	Cultura	0,008
<i>Clostridium difficile</i>	Cultura	0,009
<i>Clostridium perfringens</i>	Cultura	0,016
<i>Clostridium sordellii</i>	Cultura	0,003
<i>Cryptosporidium muris</i>	Cultura	2,782
<i>E. coli EPEC</i>	Cultura	0,031
<i>E. coli ETEC</i>	Cultura	0,002
<i>E. coli STEC</i>	Cultura	0,017
<i>Entamoeba histolytica</i>	Cultura	-0,003
<i>Enterobacter cloacae</i>	Cultura	0,007
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultura	0,001
<i>Giardia lamblia</i>	Fezes	-0,004
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultura	0,030
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultura	0,016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultura	0,037
Rotavírus	Sobrenadante da cultura de células	0,009
<i>Salmonella enteritidis</i>	Cultura	0,018
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cultura	0,010
<i>Serratia liquefaciens</i>	Cultura	0,005
<i>Shigella flexneri</i>	Cultura	0,013
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultura	0,020
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultura	0,018
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cultura	0,019
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cultura	0,015

13.4. Precisão

Para determinar a reprodutibilidade intraensaio, 40 réplicas dessas referências foram testadas, representando a faixa completa de medição, de negativo a altamente positivo. Os valores médios e os coeficientes de variação (VC) de três lotes dos kits foram determinados. Para a reprodutibilidade intraensaio, foram testadas referências de dez dias úteis diferentes em duplicadas, com duas execuções por dia. As medições foram determinadas por três técnicos e se referem a três lotes de kits. A reprodutibilidade entre os lotes foi determinada para todos os três lotes dos kits. Os resultados desse estudo são mostrados na Tabela 4. Tabela 4: Reprodutibilidade/precisão do ELISA de RIDASCREEN®*Cryptosporidium*

Tabela 4: Reprodutibilidade/precisão do ELISA de RIDASCREEN® Cryptosporidium

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

13.5 Substâncias interferentes

As substâncias da lista a seguir não apresentaram efeitos sobre os resultados do teste quando misturadas aos sobrenadantes das amostras de fezes positivas e negativas nas concentrações descritas:

sulfato de bário (meio de contraste de raios X, 18,5% w/w), loperamida (medicamento antidiarreico; 0,02% w/w), Pepto-Bismol (medicamento antidiarreico, 6,6% v/w), ciclamato de sódio (adoçante artificial, 1,3% v/w), sangue humano (5,0% v/w), ácido esteárico/ácido palmítico (gorduras nas fezes, mistura 1:1, 40,0% w/w), diclofenaco (medicamento analgésico, 0,1% v/w).

No caso do metronidazol (0,5) (antibiótico, 3,0% v/w) e mucinas (5,0% w/w), foram estudados as possíveis relações entre dose e efeito.

No entanto, a investigação da diluição serial com metronidazol não apresentou relação entre a concentração e os valores de OD. A única exceção é a concentração mais alta que foi testada, mas é ainda mais alta que a concentração do "pior caso" que já foi testada na primeira análise (o triplo da dose diária). Portanto, a interferência devido ao metronidazol pode ser considerada improvável.

Os testes com mucinas confirmaram a primeira análise, devido aos valores de OD que foram consistentemente baixos demais. Avaliações alteradas das amostras apareceram repetidamente em todas as diluições seriais. Portanto, as mucinas são consideradas substâncias interferentes.

Apêndice

Símbolos específicos do teste:

Plate	Placa de micropoços
Diluent 1	Tampão de diluição da amostra
Wash	Tampão de lavagem
Control +	Controle positivo
Control -	Controle negativo
Conjugate 1	Conjugado 1
Conjugate 2	Conjugado 2
Substrate	Substrato
Stop	Reagente de parada

Bibliografia

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).