

IMUNOSSUPRESSÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6: UMA ESTRATÉGIA POTENCIALMENTE ÚTIL PARA ESTABELEECER INFECCÃO POR *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

IMMUNOSUPPRESSION OF C57BL/6 MICE: A POTENTIALLY STRATEGY HELPFUL TO ESTABLISH *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* INFECTION

Matheus Diniz Gonçalves Coelho^{1*}, Francine Alves da Silva Coelho², Ana Júlia Urias dos Santos Araújo,² Lucas Tobias Rodrigues Maciel⁴, Hermínia Yohko Kanamura³

¹ Professor Doutor, Curso de Farmácia, FUNVIC/Faculdade de Pindamonhangaba, Pindamonhangaba, SP.

² Instituto Básico de Biociências, UNITAU/Universidade de Taubaté, Taubaté SP.

³ Departamento de Patologia e Parasitologia, UNIFAL/Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG.

⁴ Aluno do Curso de Farmácia, FUNVIC/Faculdade de Pindamonhangaba, Pindamonhangaba, SP.

*Correspondência: profmatheuscoelho@gmail.com

RECEBIMENTO: 26/09/16 - ACEITE: 03/11/16

Resumo

Cryptosporidium spp. são protozoários que infectam as células epiteliais dos tratos digestório e respiratório de uma grande variedade de animais vertebrados, sendo parasitos intracelulares obrigatórios. Este parasito frequentemente contribui para a morte de pacientes com deficiência imunológica, em parte devido à falta de um tratamento efetivo e a dificuldade de estabelecimento de um modelo de infecção *in vivo* e *in vitro* bem definido, que seria de grande interesse para desenvolvimento e avaliação da eficácia de novos fármacos. Em função disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a susceptibilidade de camundongos da linhagem C57BL/6 à infecção por *Cryptosporidium parvum*, com o intuito de estabelecer modelo animal para obtenção de massa de oocistos. Para isto os animais foram submetidos a procedimento de imunossupressão com o corticosteróide dexametasona em diferentes doses, pela via subcutânea, e, após estabelecida a imunossupressão, foram infectados com 2×10^4 oocistos de *C. parvum* pela via intragástrica. Os camundongos que foram imunossuprimidos com uma dose de 0,5 mg de dexametasona liberaram quantidade significativa ($P < 0,05$) de oocistos nas fezes, podendo tal metodologia ser utilizada para implantação de modelo animal para manutenção deste parasito em laboratório.

Palavras-chave: *Cryptosporidium*. Criptosporidiose. Imunossupressão.

Abstract

Cryptosporidium spp. are protozoa which infect the epithelial cells of the digestive and respiratory tracts of a wide variety of vertebrates being obligate intracellular parasites. This parasite often contributes to the death of patients with immune deficiency, in part due to the lack of an effective treatment and the difficulty of establishing an *in vivo* and *in vitro* well defined model of infection, which would be of great interest for developing and evaluating the effectiveness of new drugs. As a result, the present study aimed to evaluate the susceptibility of C57BL/6 mice to infection by *Cryptosporidium parvum*, in order to establish an animal model to obtain mass of oocysts. For this, the animals were subjected to immunosuppression procedure with the corticosteroid dexamethasone at different doses, subcutaneously; and after established immunosuppression, were infected with 2×10^4 *C. parvum* oocysts by the intragastric route. The mice which were immunosuppressed with 0.5 mg of dexamethasone released significant amount ($P < 0,05$) of oocysts in the feces, and may thus this methodology can be used as an animal model for this parasite maintenance in the laboratory.

Keywords: *Cryptosporidium*. Cryptosporidiosis. Immunossupression.

Introdução

Cryptosporidium spp. são protozoários coccídeos que infectam as células epiteliais dos trato digestório e respiratório de uma grande variedade de animais vertebrados, sendo parasitos intracelulares obrigatórios^{1,2}.

São reconhecidas 16 espécies como pertencentes ao gênero *Cryptosporidium*,³ a saber: *C. andersoni*, *C. baileyi*, *C. cannis*, *C. felis*, *C. galli*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. molnari*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. saurophilum*, *C. serpentis*, *C. suis*, *C. bovis*, *C. scophitalmi* e *C. wrairi*, diferenciadas com o uso de critérios morfológicos, moleculares e especificidade de hospedeiros; no entanto, o ser humano pode se infectar geralmente por *C. parvum* e *C. hominis*, e destes, apenas *C. parvum* é capaz de colonizar o trato digestório de roedores.^{4,5}

Fatores determinantes da epidemiologia e da ocorrência de infecções por *C. parvum* relacionam-se ao seu pequeno tamanho, que dificulta o seu diagnóstico, à baixa dose infectante, à resistência aos procedimentos de cloração utilizados no tratamento convencional de água e ao potencial zoonótico.

Na criptosporidiose são considerados pertencentes a grupos de risco: crianças, pessoas malnutridas e indivíduos imunocomprometidos, incluindo pacientes com AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*), transplantados, pacientes submetidos à quimioterapia para câncer, pacientes institucionalizados e pacientes com doenças infecciosas imunossupressoras.¹

Os principais sintomas clínicos da criptosporidiose humana são intimamente correlacionados com o status imunológico do hospedeiro, porém nos pacientes imunocomprometidos, a criptosporidiose pode se manifestar de quatro maneiras: a) infecção autolimitada com dores abdominais, náuseas, vômito, perda de peso ou febre moderada; b) síndrome da desidratação diarréica aguda, com 20 ou mais evacuações diarréicas por dia; c) síndrome da diarreia crônica e d) diarreia com envolvimento sintomático dos ductos biliares e pancreáticos⁶. Cabe ressaltar que, no paciente imunocomprometido, o fator crucial para o prognóstico do paciente está relacionado principalmente com a contagem de linfócitos T CD4+, que estando abaixo de 50 células/mm³ de sangue, implica numa maior gravidade de sintomas.⁷

A falta de tratamento efetivo na infecção causada por parasitos do gênero *Cryptosporidium* frequentemente contribui para a morte de pacientes com AIDS ou com imunodeficiências de outras etiologias e ainda observa-se pouco avanço neste sentido, em parte devido à falta de modelos de infecção *in vivo* e *in vitro* bem definidos⁸.

Com base nos resultados obtidos por diversos pesquisadores, a imunossupressão com o glicocorticóide dexametasona, em camundongos adultos, em nível adequado, pode se estabelecer como modelo para infecção *in vivo*.

Embora existam modelos para cultivo de tal protozoário utilizando linhagens celulares, o estabelecimento de um modelo experimental parece ser uma alternativa de maior interesse para aprofundar aspectos referentes à biologia deste parasito, dos mecanismos de interação parasito-hospedeiro e, principalmente, para obter massa de oocistos e antígenos a serem empregados em estudos bioquímicos, moleculares e imunológicos.⁹⁻¹¹

No presente trabalho objetivou-se desenvolver um método simples de infecção por *C. parvum* em camundongo C57BL/6 imunossuprimido com dexametasona, com o intuito de obter massa de oocistos e, em paralelo, avaliar a viabilidade do modelo experimental.

Método

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas com animais da Faculdade de Pindamonhangaba, tendo sido aprovado sob protocolo nº022/2013.

Os procedimentos utilizados para delineamento experimental se basearam no preconizado por diversos pesquisadores⁹ com modificações, relacionadas basicamente com a dose de imunossupressor utilizada e a quantidade de oocistos inoculados por camundongo.

Basicamente, camundongos machos da linhagem C57BL/6, com idade entre dois e três meses e peso variando de 20 a 25 gramas, foram obtidos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Como droga imunossupressora utilizou-se dexametasona injetável (Merck, Decadron) na concentração de 4 mg/mL. A via de administração utilizada foi a subcutânea, devido à facilidade de padronização da dosagem de imunossupressor administrada para cada camundongo.

Para se analisar a imunossupressão, o corticosteróide foi administrado diariamente, na dosagem de 0,5 mg por animal, por um período de 21 dias, em dez camundongos C57BL/6 machos. Foi realizado leucograma a cada seis dias, até se observar uma considerada diminuição do número absoluto de leucócitos (50% em média) e inversão do número relativo de linfócitos no sangue periférico (contagem de linfócitos em torno de 25%, em um total de 100 células).

A quantidade de leucócitos totais por mm^3 de sangue foi estimada por intermédio da contagem do número absoluto, e através da contagem diferencial pôde-se acompanhar o comportamento dos linfócitos após administração da droga imunossupressora.

Os valores medianos dos leucócitos foram comparados empregando-se o teste Kruskal-Wallis complementado *a posteriori* pelo método de Student-Newman-Keuls, que permite a comparação múltipla, para isolar o grupo ou grupos que diferem estatisticamente dos outros, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Uma vez estabelecido o esquema de imunossupressão, novos grupos de camundongos foram imunossuprimidos com dexametasona e infectados por inoculação intragástrica com solução de PBS contendo 2×10^4 oocistos purificados, em dose única, diluídos em 0,1 mL de PBS 0,01M (pH 7,2). A infecção foi realizada no 14º dia do procedimento de imunossupressão e foi mantida até o final do experimento. Os camundongos foram separados em grupos da seguinte maneira:

Grupo A: Dez camundongos C57BL/6 machos, imunossuprimidos com administração diária de 0,5 mg de dexametasona por animal, e infectados com 2×10^4 oocistos de *C. parvum*;

Grupo B: Cinco camundongos C57BL/6 não imunossuprimidos e infectados com 2×10^4 oocistos de *C. parvum* – para avaliar se o inóculo utilizado, sem a presença da droga imunossupressora, seria suficiente para induzir uma infecção na linhagem de camundongo estudada;

Grupo C: Cinco camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dose diária de 1 mg de dexametasona e não infectados – para analisar se o procedimento de imunossupressão, isoladamente, não seria fatal aos camundongos;

Grupo D: Cinco camundongos C57BL/6 não imunossuprimidos e não infectados – controle negativo.

Para acompanhamento da infecção, os camundongos foram isolados individualmente em gaiolas esterilizadas e pavimentadas com arame. As fezes liberadas diariamente ficaram sobre toalhas de papel dispostas na parte inferior das gaiolas, toalhas estas que foram umedecidas com água destilada e trocadas diariamente. O volume total de fezes eliminadas diariamente por cada camundongo foi armazenado em tubos contendo dicromato de potássio a 5%, na proporção de 1:3, obtendo-se suspensões fecais que foram examinadas para verificação da presença de oocistos de *C. parvum*.¹⁰

Para recuperar os oocistos liberados nas fezes dos camundongos infectados, alíquotas de 3 mL da suspensão fecal obtida foram processadas em tubo cônico, contendo 10 mL de solução de

sacarose, sendo que após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, os 2 mL da camada superior da solução foram recuperados com o auxílio de pipeta automática e transferidos para outro tubo cônico com capacidade para 15 mL, contendo 13 mL de água destilada. A suspensão obtida foi submetida à centrifugação a 3000 rpm, por 10 minutos, para remoção da sacarose, permitindo assim que os oocistos sedimentassem. Este procedimento de lavagem foi repetido duas vezes. Finalmente o sedimento foi desinfetado com hipoclorito de sódio e lavado por três vezes com água destilada realizando-se centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos e ressuspensão em 1,5 mL de PBS, para posterior quantificação.

Para quantificação dos oocistos recuperados das fezes dos camundongos, foram confeccionados esfregaços de 10 μL , partindo da solução estocada em PBS, sendo estes posteriormente corados pela técnica de Kinyoun.¹² O número de oocistos foi contado e convertido para o volume final da suspensão de fezes purificadas de cada camundongo, e, posteriormente, para o total de fezes eliminada diariamente por cada animal. Cabe ressaltar que os animais foram acompanhados durante todo o período que houve eliminação de oocistos nas fezes, que perdurou por aproximadamente 30 dias.

Resultados

Após imunossupressão dos camundongos C57BL/6 machos com 0,5 mg de dexametasona, observou-se que os valores de leucócitos totais do sangue periférico, antes do procedimento de imunossupressão, diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos valores observados após a primeira e segunda semana de imunossupressão (Tabela 1).

Com relação aos valores relativos de leucócitos, observou-se que houve uma inversão na proporção dos valores de linfócitos em relação aos neutrófilos no decorrer da administração da droga, caracterizando desse modo um quadro de imunossupressão (Tabela 1).

Após estabelecimento da imunossupressão, no experimento de infecção, observou-se que os camundongos C57BL/6, que foram imunossuprimidos e infectados com *C. parvum*, desenvolveram infecção e liberaram oocistos nas fezes.

Os números de oocistos, expressos em média aritmética, recuperados dos camundongos do grupo A, estão representados na figura 1. Nota-se que a maior liberação de oocistos se deu no oitavo dia após a infecção. Os valores a partir do 18º dia do experimento não estão apresentados, já que a partir deste dia apenas três camundongos estavam vivos.

É importante frisar que nenhum dos animais que pertenciam aos grupos B, C ou D, utilizados como grupos controle, desenvolveu a infecção, já

que não foram detectados oocistos no material fecal após realização de pesquisa de *Cryptosporidium*, pela técnica de coloração de Kinyoun.

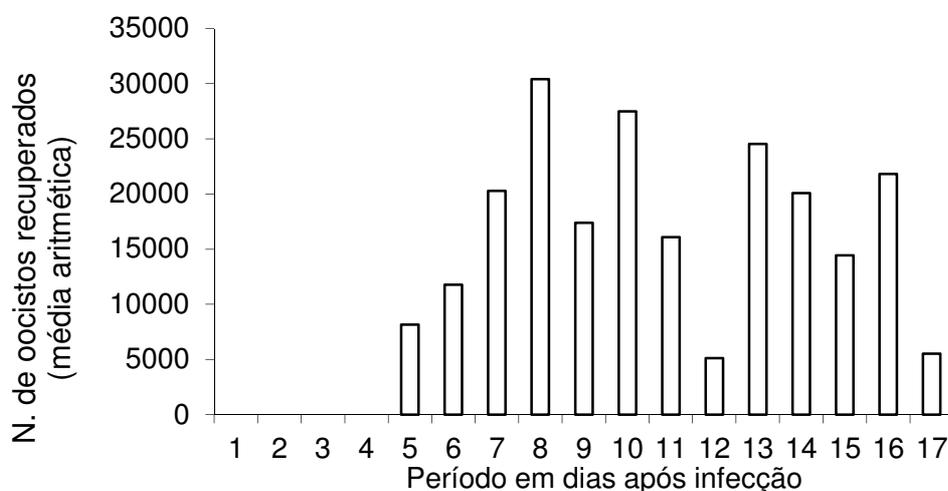


Figura 1. Número total de oocistos, expressos em média aritmética, recuperados a partir das fezes de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dose diária de 0,5 mg de dexametasona (grupo A), até o 17º dia da infecção

Tabela 1 - Resultados do leucograma de sangue periférico de dez camundongos C57BL/6 machos submetidos à imunossupressão com dose diária de 0,5 mg de dexametasona, antes da imunossupressão (A.I.) e na primeira (1ºsem) e segunda semana (2ºsem) após a imunossupressão

Camundongos	Leucócitos (VA)			Neutrófilos (VR)			Linfócitos (VR)		
	A.I.	1ºsem	2ºsem	A.I.	1ºsem	2ºsem	A.I.	1ºsem	2ºsem
1	14750	4750	4000	13	65	80	87	35	19
2	18800	6000	4000	13	65	75	87	35	35
3	6750	5000	2500	10	70	75	90	30	35
4	15550	10000	6250	10	84	90	90	16	10
5	10900	4400	-	11	74	85	89	26	14
6	8000	6700	6000	9	94	89	90	16	10
7	12400	5010	3000	6	60	70	94	40	28
8	18800	8450	4000	6	60	65	91	40	35
9	16000	5500	4950	12	60	80	86	40	20
10	7350	6500	5850	10	65	85	80	45	15
Mediana	13575 ^a	5750 ^b	4000 ^b						

VA = Valores Absolutos (nº de células/mm³ de sangue); VR = Valores Relativos (%); (-) = Dado não obtido
a ≠ b; valores de mediana com a mesma letra não diferiram estatisticamente

Discussão

A manutenção do ciclo de *Cryptosporidium parvum* em laboratório é de importância fundamental para a obtenção de parasitos em massa. Conforme já mencionado, diversos modelos têm sido propostos tanto *in vitro*, por meio de cultura contendo células como MDCK, HCT-8 e VELI,¹³⁻¹⁶ quanto *in vivo*, utilizando-se, dentre outros animais, bezerras,^{3,17} gerbils,¹⁸ camundongos neonatos^{4,10,19,20} e camundongos imunodeficientes.²¹

No presente trabalho, optou-se pelo uso de camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dexametasona preferencialmente a modelos utilizando culturas celulares ou outras linhagens murinas, por ser um procedimento de baixo custo e pela já comprovada susceptibilidade desta linhagem à infecção por *C. parvum*, além da eficiência desta droga em induzir imunossupressão, conforme já demonstrada por outros autores.⁹⁻¹¹ Outro fator importante que pode destacar o uso de modelo murino em detrimento ao uso de culturas celulares pode estar relacionado ao custo, à necessidade de mão de obra mais especializada e a baixa recuperação de oocistos.²²

A relevância do uso de camundongos C57BL/6 foi demonstrada por Rasmussen e Healey,¹⁰ que avaliaram a susceptibilidade de camundongos fêmeas, adultos, de cinco diferentes linhagens (C57BL/6, C3H/HeN, BALB/nAnN, DBA/2N e CBA) e demonstraram que apenas os camundongos C57BL/6 demonstraram-se susceptíveis a infecção por *C. parvum*, quando previamente imunossuprimidos com dexametasona. A escolha da linhagem supracitada ainda vai de encontro a outras pesquisas nas quais também foram empregados camundongos adultos C57BL/6, com o intuito de se obter produção em massa de oocistos deste protozoário,⁹⁻¹¹ porém com protocolos diferenciados, no que concerne ao tempo e a via de administração do glicocorticoide e ao inóculo de oocistos utilizado.

No que concerne a dose de dexametasona utilizada no presente trabalho, a saber 0,5 mg/animal/dia, esta foi marcadamente superior a utilizada por diversos autores. Rasmussen e Healey¹⁰ utilizaram a dose de 125 µg/dia/animal, porém, para induzirem a liberação de uma grande quantidade de oocistos, precisaram prolongar o experimento por 83 dias, representando uma desvantagem em relação ao protocolo proposto no presente trabalho, no qual foi possível uma recuperação significativa de oocistos em relação ao inóculo inicial, porém em um período de tempo relativamente inferior ao utilizado pelos autores supracitados.

Já no que diz respeito à dose de corticóide utilizada, os resultados apresentados também discordaram de Rasmussen e Healey,¹⁰ uma vez que estes autores ao avaliarem a dose de 500 mg/animal/dia observaram que todos os animais evoluíram ao óbito. Tal discrepância pode estar relacionada com o fato de que os autores supracitados prolongaram o tratamento por 83 dias, sendo possivelmente um tempo demasiadamente prolongado, crucial para sobrevivência dos animais à administração da droga.

Tal hipótese pode ser corroborada mediante observação dos resultados apresentados por Petry et al.⁹ que induziram imunossupressão em camundongos adultos, fêmeas da linhagem C57BL/6, injetando dexametasona por um curto período de tempo (quatro dias alternados), por via subcutânea, nas doses de 250, 500 ou 1000 µg por animal, sem entretanto observar óbito de espécimes. Além disso, os autores constataram que os camundongos imunossuprimidos com 1000 µg de dexametasona liberaram maior quantidade de oocistos quando comparado aos outros grupos que foram avaliados.

Cabe ressaltar que, independente da via de administração e da dose do agente imunossupressor, tanto Rasmussen e Healey¹⁰ quanto Petry et al.⁹ necessitaram de um 1×10^6 oocistos/animal para estabelecerem infecção patente, sendo um inóculo 50 vezes superior ao utilizado no presente trabalho, no qual a inoculação de 2×10^4 oocistos de *C. parvum*, pela via intragástrica, foi suficiente para induzir infecção com liberação de consideráveis quantidades do parasito nas fezes dos camundongos, demonstrando assim uma vantagem, em relação aos demais protocolos, uma vez que foi necessária uma dose menor de oocisto para estabelecer infecção suficiente para induzir liberação de oocistos nas fezes dos animais.

O uso de inóculo destacadamente menor pode ser considerado uma importante vantagem do modelo aqui proposto, tendo em vista uma das principais dificuldades inerentes ao cultivo de *C. parvum*, que é a obtenção de oocistos purificados em grande quantidade a nível laboratorial.²² Outros autores já alcançaram êxito no desenvolvimento de infecção patente em camundongos C57BL/6 utilizando apenas um oocisto deste protozoário, porém sem liberação de oocistos nas fezes, sendo a infecção constatada apenas em cortes histológicos de íleo terminal (2cm distais) corados com hematoxilina e eosina.¹¹

No presente trabalho, o óbito de alguns camundongos C57BL/6, logo no início do período

de infecção, pode ter ocorrido em função de um somatório da dose e do efeito imunossupressor da droga com o efeito da própria infecção; da mesma maneira o óbito de camundongos C57BL/6 que foram apenas imunossuprimidos (dados não demonstrados), indica uma maior susceptibilidade desses camundongos à imunossupressão com doses elevadas desse corticoide, assinalando a necessidade de uma melhor padronização da dose de imunossupressor e da quantidade do inóculo de *C. parvum*, o que possivelmente resultaria numa maior sobrevivência dos camundongos e numa maior recuperação de oocistos.

Apesar da quantidade de oocistos recuperados de camundongos ser substancialmente menor que a quantidade de oocistos comumente recuperados de bezerros infectados, pode-se considerar de potencial utilidade a manutenção de *C. parvum* por meio de sucessivas passagens em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos com dexametasona, já que o modelo murino demonstra-se de fácil manipulação, mais viável financeiramente e de menor risco de contaminação aos manipuladores e ao meio, e constitui, desse modo, uma alternativa potencialmente viável para obtenção ou para manter cepas de oocistos de *C. parvum* em laboratórios de pesquisa.

Referências

1. Del Coco VF, Sparo MD, Sidoti A, Basualdo JÁ, Córdoba MA. Effects of *Enterococcus faecalis* CECT 7121 on *Cryptosporidium parvum* infection in mice. *Parasitol Res.* 2016;115:3239-44
2. Sunnotel O, Lowery CJ, Moore JE, Dooley JS, Xiao L, Millar BC, Rooney PJ, Snelling WJ. *Cryptosporidium*. *Lett Appl Microbiol.* 2006;43(1):7-16.
3. Lesnianska K, Perek-Matysiak A, Hildebrandl J, Bunkowska-Gawlik K, Piróg A, Popiolek M. *Cryptosporidium* spp. And *Enterocytozoon bienersi* in introduced raccons (*Procyon lotor*) – first evidence from Poland and Germany. *Parasitol Res.* 2016;115:1-7.
4. Monis PT, Thompson RCA. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infection Gen Evol* 2003;3:233-44.
5. Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:72-97.
6. Kosec M, Alcántara C, Lima AM, Guerrant RL. *Cryptosporidiosis*: an update. *Lancet Infect Dis.* 2001;1:262-9.
7. Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):115-34.
8. Mead JR. *Cryptosporidiosis* and the challenges of chemotherapy. *Drug Resist Updates.* 2002;5: 47-57.
9. Petry F, Robinson HA, McDonald V. Murine infection model for maintenance and amplification of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1922-4.
10. Rasmussen KR, Healey MC. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. *Infect Immun.* 1992;60(4):1648-52.
11. Yang S, Benson SK, Du C, Healey MC. Infection of immunosuppressed C57BL/6N adult mice with a single oocyst of *Cryptosporidium parvum*. *J Parasitol.* 2000;86(4):884-7
12. Inácio SV, Gomes JF, Oliveira BC, Falcão AX, Suzuki CT, Dos Santos BM, de Aquino MC, de Paula Ribeiro RS, de Assunção DM, Casemiro PA, Meireles MV, Bresciani KD. Validation of a new technique to detect *Cryptosporidium* spp. oocysts in bovine feces. *Prev Vet Med.* 2016;134:1-5.
13. Chen F, Huang KH. *In vitro* cultivation model of *Cryptosporidium parvum* in MDCK cell and its development. *Chin J Parasitol & Parasit Dis.* 2009;27(3):219-22.
14. Hijawi NS, Meloni BP, Morgan UM, Thompson RCA. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *Int J Parasitol.* 2001;31:1048-55.
15. Lacharme L, Villar V, Rojo-Vazquez FA, Suárez S. Complete development of *Cryptosporidium parvum* in rabbit chondrocytes (VELI cells) *Micr infect.* 2004;6:566-71.
16. Ludington JG, Ward HD. The *Cryptosporidium parvum* C-Type Lectin CpClec mediates infection of intestinal epithelial cell via interactions with sulfated proteoglycans. *Infect Immun.* 2016;84(5):1593-602.
17. Watarai S, Tana, Koiwa M. Feeding activated charcoal from bark containing wood vinegar liquid (nekka-rich) is effective as treatment for cryptosporidiosis in calves. *J Dairy Sci.* 2008;91(4):1458-63.
18. Perrucci S, Fichi G, Buggiani C, Rossi G, Flamini G. Efficacy of mangiferin against *Cryptosporidium parvum* in a neonatal mouse model. *Parasitol Res.* 2006;99:184-8.
19. Klein P, Cirioni O, Giacometti A, Scalise G. *In vitro* and *in vivo* activity of aurintricarboxylic acid

- preparations against *Cryptosporidium parvum*. J Antimicrob Chemother. 2008;62(5):1101-4.
20. Martín-Gómez S, Álvarez-Sánchez M, Rojo-Vázquez F. A newborn mouse *Cryptosporidium parvum* infection model: its application to the study of therapeutic and prophylactic measures for controlling cryptosporidiosis in ruminants. Parasitol Res. 2006;99:1-6.
 21. Hikosaka K, Satoh M, Koyama Y, Nakai Y. Quantification of the infectivity of *Cryptosporidium parvum* by monitoring the oocyst discharge from SCID mice. Vet Parasitol. 2005;134:173-6.
 22. Arrowood MJ. *In vitro* cultivation of *Cryptosporidium* species. Clin Microbiol Rev. 2002;15(3):390-400.