

870127

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



IDENTIFICACION DE CRYPTOSPORIDIUM EN UNA POBLACION
DE 160 LACTANTES CON SINDROME DIARREICO

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A

María Martha de la Salud García Romero

Asesor: Q.F.B. Ma. del Socorro Pulido García

GUADALAJARA, JALISCO

1989

FALLA EN ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

1.- INTRODUCCION -----	1
1.1.- Antecedentes históricos -----	1
1.2.- Justificación y objetivos del trabajo -----	2
2.- GENERALIDADES -----	3
2.1.- Taxonomía y nomenclatura -----	4
2.2.- Aspectos parasitológicos -----	9
2.3.- Aspectos clínicos de la criptosporidiosis -	16
2.4.- Fisiopatogenia de la diarrea por -----	
<u>Cryptosporidium</u> -----	18
2.5.- Diagnóstico del laboratorio en la criptosporidiosis -----	18
2.6.- Tratamiento actual de la criptosporidiosis -	22
3.- MATERIAL Y METODO -----	23
3.1.- Material y reactivos utilizados -----	23
3.2.- Métodos empleados -----	26
4.- RESULTADOS OBTENIDOS -----	29
5.- DISCUSION Y CONCLUSIONES -----	33
5.1.- Discusión -----	33
5.2.- Conclusiones -----	38
6.- BIBLIOGRAFIA -----	42

1.- INTRODUCCION.

1.1.- Antecedentes históricos.

Cryptosporidium considerado ahora como un patógeno entérico de importancia, fue aislado en 1907 de la mucosa gástrica de ratones asintomáticos. Recibió poca atención hasta que en 1955 se sospechó que fuera el causante de diarrea en porcos. Las enfermedades en animales, particularmente en ganado, fueron documentados con la utilización de técnicas nuevas. Los primeros casos reportados en 1976 estaban asociados con exposición a animales de granja, posteriormente se reportaron casos que confirmaron la clasificación de Cryptosporidium como una infección zoonótica. En los años ochentas la mayoría de las infecciones reportadas han sido de pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) quienes presentan diarrea acuosa comúnmente severa, considerándose así a Cryptosporidium como un patógeno oportunista. (1, 8, 12)

Se ha dado un papel más importante con la incrementada presencia del parásito y los métodos de diagnóstico simplificados y sensibles. Cryptosporidium ahora es comúnmente identificado en casos de diarrea aguda auto-limitada en enfermos inmune competentes de países desarrollados y en vías de desarrollo. Los viajeros se han infectado, y se han documentado epidemias en guarderías (1986). La diseminación oral-fecal entre humanos y animales, y la ingestión de agua contaminada (1985), parecen ser las principales vías de transmisión. (6, 12)

Por el hallazgo incidental, la enfermedad veterinaria, la zoonosis y las infecciones oportunistas, actualmente se

considera a Cryptosporidium como una causa de enfermedad diarreica en todo el mundo.

1.2.- Justificación y objetivos del trabajo.

Por el incremento en el número de pacientes documentados con infección por Cryptosporidium, es importante para el laboratorio clínico contar con técnicas de diagnóstico necesarias para recuperar e identificar este parásito, buscando sobre todo técnicas confiables que eviten un falso diagnóstico, que sean rápidas de realizar y que no sean tan costosas para que pueda realizarse en todos los laboratorios.

Tratando de buscar una técnica que cumpla estos requisitos, se realizó este estudio en 160 muestras de lactantes con síndrome diarreico, usando la técnica de concentración de Ritchie y las tinciones de Karnoun modificada y la técnica de Directil sulfúrico (DSSO), métodos que se ha documentado dan buenos resultados y que nos pueden ayudar a ver con qué frecuencia se presenta esta parasitosis en la población infantil con síndrome diarreico de Guadalajara, Jalisco.

Los objetivos de este estudio fueron:

Depurar la metodología diagnóstica de Cryptosporidium utilizando una técnica de concentración y dos métodos de tinción

demostrar la presencia o ausencia del parásito en algunos grupos poblacionales del estado de Jalisco.

2.- GENERALIDADES.

Cryptosporidium es un pequeño protozooario coccidiano que ha sido descrito como causante de diarrea en humanos y animales. (1)

El desarrollo enóyeno de Cryptosporidium muris fue reportado por Tyzzer en 1907 y 1910, encontrado en alóndulas gástricas de ratones asintomáticos de laboratorio. Lucas, en 1955 se le encontró asociado como causa de diarrea en animales. (2)

El primer caso de criptosporidiosis humana fue descrito por el doctor John H. Yardley en una niña de tres años que desarrolló enterocolitis autolimitada. (4) Hasta 1982 se habían informado siete casos (2); en 1980 las infecciones por Cryptosporidium ya son más importantes y se veían asociadas a pacientes con SIDA, por lo que se pensó que este parásito era oportunista. (8, 12)

El primer caso reportado en México, estaba asociado al SIDA y fue realizado por el Dr. Barrigu y Col., publicado en la revista de Asociación Mexicana de Infectología. (2)

Desde entonces numerosos reportes en pacientes inmunocomprometidos y con SIDA (1981) han sido publicados y revisados. (1, 3, 7)

Navin y Jannek encontraron en 1983 solo 18 casos de criptosporidiosis en pacientes inmunológicamente normales. En 1984 este fue el parásito más comúnmente encontrado en EEIII en la Universidad Sur de California (USC), hospitales y clínicas.

Los protozoarios del género Cryptosporidium pueden ser causa severa de enteritis en humanos inmunocomprometidos (4, 7, 10, 12), y pueden causar diarrea auto-limitada en huéspedes inmunocompetentes (3, 5) y en muchas especies animales (6, 7).

Entre los primeros humanos a los que se les detectó Cryptosporidium están las personas con exposición a animales, por lo que esta parasitosis se considera una zoonosis (1, 8, 13). Cryptosporidium ahora es comúnmente identificado en casos de enfermedad aguda auto-limitante en pacientes inmunocompetentes de países desarrollados y en vías de desarrollo (8, 4, 11). Por lo anteriormente mencionado se le considera a Cryptosporidium como un causante de enfermedad diarreica a nivel mundial.

2.1.- Taxonomía y nomenclatura.

Este parásito pertenece al reino de los protozoarios, al phylum Apicomplexa que se caracterizan por tener un solo tipo de núcleo, por no presentar cilios ni flagelos, excepto los microgametos flagelados de algunos grupos; sus movimientos de locomoción los hacen a codo por medio de un complejo apical que poseen. Pertenecen a la clase Sporozoa, presentando reproducción sexual y asexual, u son parásitos que se adhieren en vertebrados y en algunos invertebrados. Se encuentran en la clase Coccidies, caracterizándose por ser muy pequeños, con desarrollo de gametos intracelulares. El ciclo biológico de un coccidio incluye tres fases principales: esquizogonia, gametogonia u esporogonia. El estado infectante es un esporozoito que penetra a la célula huésped y empieza a desarrollarse; estos esporozoitos se liberan del coquistis esporulado cuando

es ingerido por otro huésped.

Su orden es Eucecidiida, su familia Cryptosporidiidae y pertenece al género Cryptosporidium, caracterizándose por ser pequeños con un diámetro promedio de 4 a 6 micrómetros, que habitan los bordes de las microvellosidades de la mucosa epitelial de varios vertebrados incluyendo al hombre (Andersen, 1982, 1984; Angus, 1983; Current, 1983; Tzipori, 1983). (5)

Desde 1980 se han realizado estudios para determinar especies de Cryptosporidium, basándose en la estructura y en la preferencia por el huésped. Después de revisar varios datos, Levine (1984) concluyó que sólo cuatro especies de Cryptosporidium eran válidas de acuerdo con el tipo de hospedador (5):

1.- Cryptosporidium crotali. (Triffitt, 1925), parásito de reptiles.

2.- Cryptosporidium meleagridis. (Sevin, 1955), parásito de aves.

3.- Cryptosporidium muris. (Tyzzer, 1907), parásito de muríferos.

4.- Cryptosporidium parvum. (Hoover, Hoerr, Carlton, Huisman y Ferguson, 1981), parásito de peces tropicales.

Sin embargo Levine (1984) consideraba a Cryptosporidium parvum (Tyzzer, 1912) como sinónimo de C. muris (Tyzzer, 1907). La descripción original de Tyzzer sobre C. muris y C. parvum demostraba claramente que las dos especies son estructuralmente y evolutivamente diferentes, y que ocupan sitios separados en tracto gastrointestinal de huéspedes murinos.

Evidencias morfológicas y biológicas demuestran que el parásito más pequeño, aparentemente responsable de la mayoría de los casos reportados en mamíferos deberían ser considerados como *C. parvum* (Tyzzer, 1912) encontrados en la parte media del intestino de ratones y conejos de laboratorio. A éstos, Levine (1961) los llama *C. tyzzeri*, con una medida de 3.0 - 3.3 x 4.0 - 4.5 micrómetros, (considerablemente más pequeño que *C. muris*) y el menos común como *C. muris* (Tyzzer, 1907, 1910) con oocistos más largos con medidas de 5.0 - 6.0 x 7.0 micrómetros, siempre localizado en glándulas gástricas. (5)

Desde 1912, Tyzzer reconoció que las dos especies eran diferentes y escribió: "...está claramente demostrado que el organismo que vive en la superficie del epitelio intestinal es una especie diferente a la que habita en las glándulas gástricas de los ratones. Ambas especies se presentan en las mismas condiciones de laboratorio en los ratones, pero ambas están frecuentemente presentes en gran número, en la ausencia de las otras". (5)

Desde Tyzzer (1912) fueron nombradas diez y siete "especies" adicionales (5), de las cuales solo mencionaremos cinco por su importancia:

- 1.- *C. crocodyli*. (Triffitt, 1925), parásito de reptiles.
- 2.- *C. sporidium ctenosauri*. (Duszynski, 1969).
- 3.- *C. sporidium lampropeltis*. (Anderson, Duszynski y Marquardt, 1968).
- 4.- *C. pulpis*. (Wetzel, 1983).
- 5.- *C. ameyvae*. (Arcay de Peraza y Bastardo de San José,

1969).

Pero estas especies no se consideraron válidas porque, basadas en las descripciones originales, semejan esporooquistes de Sarcocystis (Levine, 1977, 1984; Levine y Tatro, 1980). Las otras doce especies de Cryptosporidium aparecen en base a la morfología de ooquistes asignadas por el propio género.

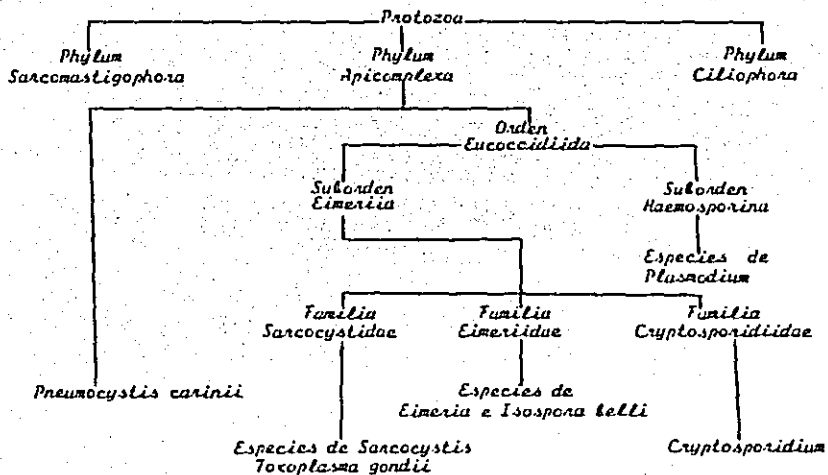
La clasificación más actualizada es la de Steve J. Upton y William L. Current quienes proponen que solo dos especies de Cryptosporidium infectan mamíferos, incluyendo al hombre, y son consideradas válidas para este tiempo (5, 9). Las especies son :

- 1.- Cryptosporidium parvum. (Tyzzer, 1912).
- 2.- Cryptosporidium muris. (Tyzzer, 1907).

Esta clasificación se basa en la preferencia por el huésped y en el tamaño de los ooquistes. Upton y W. L. Current también aislaron del úlcera y del intestino grueso de pollo a:

- 3.- Cryptosporidium baileyi.

ESQUEMA # 1
 TAXONOMIA DE CRYPTOSPORIDIIDAE
 (Según Navin, R.T. y Janacek, D.D.(2)).



2.2.- Aspectos parasitológicos.

2.2.1.- Ciclo de vida.

Este parásito es el único coccídeo monoxeno, ya que solo necesita un huésped para desarrollar todo su ciclo de vida. (2)

La fase infectante de Cryptosporidium son los oocistos maduros que se expulsan en las heces de animales enfermos, listos para infectar otros animales o humanos (Zipori, 1981), a diferencia de otros coccídeos como el Toxoplasma gondii, que tienen oocistos que requieren madurar en el medio ambiente antes de ser infectantes. (2)

Los oocistos esporulados de pared gruesa liberan a los esporozoítos por mecanismos desconocidos, pero parece ser que el desengastramiento se favorece por la digestión de la pared anéctica en el conducto gastrointestinal del nuevo huésped (2). Estos esporozoítos liberados se adhieren a la superficie epitelial del intestino delgado y empiezan su desarrollo para transformarse en trofozoítos, debajo de la membrana superficial. El trofozoíto forma una unión electrodensa de ataque en la interfase de la célula del huésped y el citoplasma del trofozoíto es rodeado por cuatro membranas diferentes que forman una vacuola parasitífera, donde se llevan a cabo todos los demás estadios. (2) El citoplasma del huésped u otro material alimenticio que esté dentro de las vacuolas parasitíferas, son atrinidades a través de los anillos electrodensos. (10) El origen de estas membranas no se ha establecido, pero las últimas evidencias indican que las dos membranas más externas son originadas por el huésped. Si es así, la localización del trofozoíto es intracelular pero extracitoplásmica. (2)

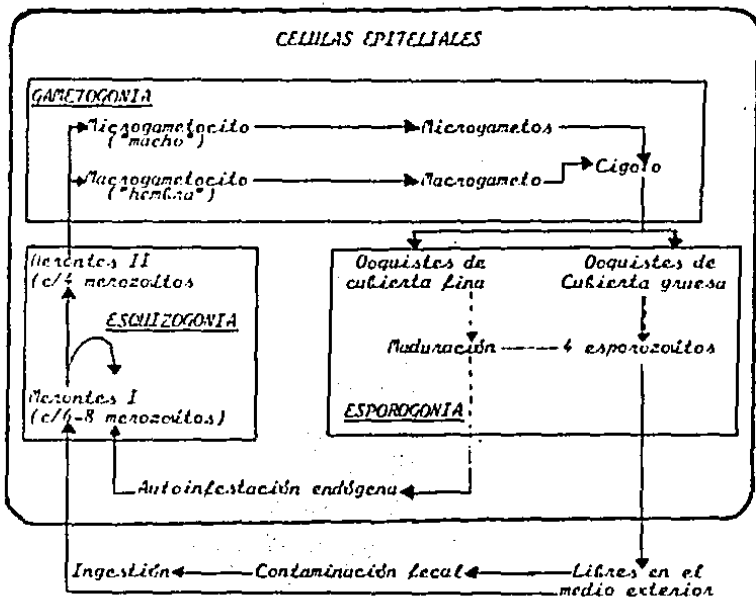
Durante la multiplicación asexual llamada agamogonia, el trofozoito sufre tres divisiones nucleares para formar merontes tipo I, los cuales tienen de 6 u 8 merozoítos. Luego estos merontes liberan los 6 u 8 merozoítos I y se accionan infectando otras células epiteliales en el lumen del intestino. Basándose en observaciones estructurales en conejillos de india naturalmente infectados, parece que el método de penetración de los merozoítos I en la célula huésped, es por invaginación de membrana. Los merozoítos tipo I sufren dos divisiones nucleares para formar merontes tipo II que producen 4 merozoítos; estos merozoítos sufren diferenciación separadamente y forman los gametocitos: microgametocitos ("machos") y macrogametocitos ("hembras"). Los macrogametocitos presentan pequeñas modificaciones y producen un solo macrogameto; en cambio, los microgametocitos efectúan divisiones nucleares y producen aproximadamente 16 microgametos.

Un microgameto fertiliza a un solo macrogameto y forma el cigoto, el cual sufre fisión múltiple (esporogonia) dando origen a un oocisto que está lleno de esporozoítos. Los oocistos formados pueden ser de pared delgada, o los más comunes de pared gruesa que resisten al medio ambiente. Los de pared delgada se desenquistan para liberar esporozoítos infectantes internos, mientras que los de pared gruesa salen del huésped en las heces y así se completa el ciclo de vida. Dentro de ambas formas de oocisto se lleva a cabo la esporogonia que sucede dentro del huésped para formar esporozoítos antes de ser liberados. (8) Ver esquema # 2.

Dichos parásitos del suborden Eimeriina solo tienen un ciclo de esquizogonia (reciclación de merontes) en un huésped o sea, en cada fase del ciclo de vida solo se desarrolla a la fase siguiente, pero el hecho de que la criptosporidiosis crónica puede prolongarse por meses u años, sugiere que

ESQUEMA # 2

CICLO BIOLÓGICO DE Cryptosporidium



Esporogonia : formación de esporozoítos.

Esquizogonia o *agamogonia*: reproducción asexual.

Gametogonia o *gamogonia*: reproducción sexual.

Cryptosporidium puede sufrir múltiples ciclos de esquizogonia, al menos en huéspedes inmunodeficientes. (2)

Según W. L. Current (1987), la reiclación de esquizontes o merozoitos, solo sucede en los merozoitos tipo I, y según Navin R. T. y Juranck, D. D. (1984), la reiclación sucede en los merozoitos de primera generación (tipo I), y en los de segunda generación (tipo II). (2)

2.2.2. - Epidemiología.

La criptosporidiosis es una enfermedad que se descubrió primero en animales domésticos y posteriormente en ganado vacuno. Los primeros informes de enfermos humanos se descubrieron en maneadores de ganado, por lo que se piensa que es una zoonosis (2, 3, 8, 12, 13), pues se han encontrado transmisiones de algunas especies animales a humanos. Las infecciones leves son difíciles de detectar.

Se encontró criptosporidiosis de un 3.0 a 13.0 % en países en desarrollo. (8) También se ha visto que este protozoo es causa significativa de diarrea auto-limitada en personas normales de países industrializados. (3)

En otras literaturas de estudios realizados, se observó que la criptosporidiosis en países desarrollados era baja, 0.7 % (8) en pacientes asintomáticos, mientras que en pacientes con diarrea el parásito fue encontrado de 0.6 a 7.3 % . (8)

En un estudio de Vellore, India, donde el contacto con

ganado empieza desde el nacimiento, se encontró Cryptosporidium en un 13.1 % en individuos con diarrea y en un 9.8 % en controles (8); Esto sugiere que una exposición temprana y constante puede asociarse con excreción asintomática e inmunidad hacia la enfermedad.

En un estudio que se llevó a cabo en Gran Bretaña, el rango más elevado de criptosporidiosis se notó en niños sintomáticos menores de 5 años; en todo el mundo, este grupo de edad abarca la mayoría de los casos en personas inmunocompetentes. En una epidemia de diarrea en Denver, Cryptosporidium se encontró en un 65.0 % en niños sintomáticos de guardería. (8)

En homosexuales sintomáticos con SIDA se ha observado Cryptosporidium en 28.0 % en EUA, pero no se ha encontrado en homosexuales asintomáticos. (8) Se ha visto que la preferencia sexual no es un factor de riesgo.

A pesar de los reportes de Costa Rica, Bangladesh e India con riesgo de criptosporidiosis elevados en los meses calurosos, lluviosos y húmedos, los patrones de estación no han sido consistentes. (8)

En pacientes con SIDA en EUA, del 3.0 al 4.0 % presentan criptosporidiosis; En África y Haití el 50.0 % . (4)

Tzipori comenta que no es común encontrar portadores asintomáticos, pero sí es posible poderlos encontrar en homosexuales o pacientes con SIDA. (2)

En cerros se ha visto que es frecuente encontrar al

parásito, teniendo predilección por animales jóvenes. En animales recién nacidos el período de incubación es de 2 a 10 días, y en adultos es más prolongado. (2)

2.2.3.- Resistencia y Transmisión.

Se ha visto que Cryptosporidium es transmitido por una variedad de mecanismos:

1) La transmisión zoonótica fue inicialmente considerada como la principal fuente de infección humana, ya que el parásito está comúnmente asociado con diarrea de animales, particularmente becerros, y la transmisión ocurre entre especies, a corderos, puercos, aves y otros animales. Además, los manipuladores de becerros y sus familias tenían altos rangos de excreción de oocistas.

2) El aumento de la infección en mascotas, animales de granja y laboratorio está bien documentado, pero no puede ser tan común como la transmisión de persona a persona. Se ha descrito elevada prevalencia de esta forma de transmisión como la responsable de la ocurrencia de infección en hogares, trabajadores al cuidado de la salud y los asistentes al cuidado de los niños. (1, 8) En pacientes inmunocomprometidos, la mayoría de los casos positivos se describen en homosexuales con SIDA. En una guardería se presentó un brote epidémico con un 100% de criptosporidiosis. (8)

3) Se cree que el principal mecanismo de transmisión sea el agua, esto se basó en una epidemia que hubo en Texas, por contaminación de agua potable con agua de drenaje. (8)

También se detectó Cryptosporidium en ríos de Washington y California, Nuevo México y Arizona. (4)

El agua contaminada ha sido implicada como fuente de infección en viajeros y hogares.

d) Los fomites desempeñan un papel importante en la transmisión de ooquistes resistentes en ciertas guarderías. La criptosporidiosis por alimentos, actividad sexual, uerzoolización ha sido sugerida pero no confirmada.

e) Otra posible forma de infección es la tos de algún paciente infectado, ya que también se ha visto que invade vías respiratorias, aunque estos casos son raros.

Por su pequeño tamaño (2 a 5 micrómetros de diámetro) escapa a la filtración; los ooquistes son duros y resistentes a muchos desinfectantes; sólo pueden ser destruidos por el calor a 65 grados centígrados durante 30 minutos, por congelación, uenico al 5.0 % e en cloro comercial.

Para minimizar la transmisión en hospitales, se deben tomar precauciones estrictas, como el lavado de manos, uso de guantes y batas, para prevenir enfermedades entéricas sobre todo en pacientes con SIDA. Los pacientes severamente infectados deshechan gran número de ooquistes infecciosos en sus heces, por lo tanto requieren de cuartos privados y cuidado óptimo para prevenir la transmisión. Las superficies pueden ser descontaminadas con cloro comercial dejándolo de 10 a 15 minutos.

2.2.4.- Inmunidad.

En personas con exposición crónica al parásito se desarrolla inmunidad protectora. La inmunidad mediada por células parece ser el mecanismo primario de defensa del huésped. Personas inmunocompetentes con criptosporidiosis dejan de eliminar al parásito espontáneamente, pero en aquellas que reciben terapia inmunosupresora, la enfermedad persiste. La depresión de los linfocitos T4 ayudadores descritos en pacientes con SIDA, involucra la mucosa del intestino delgado donde ocurre la reacción inmunológica a este protozooario. Se considera al sarapimón como otro factor predisponente, debido a la inmunodeficiencia mediada por células, en países en desarrollo, y no a la mala nutrición.

Podrían requerirse ambos tipos de inmunidad para eliminar la infección. La presencia de anticuerpos organismo específicos, sólo no pueden ser protectores.

En la mayoría de los reportes, el gran número de casos positivos son en niños. El período de incubación varía de una a dos semanas. (8)

2.3.- Aspectos clínicos de la criptosporidiosis.

En animales, la enfermedad aguda se caracteriza por diarrea acuosa y pérdida de peso, no se presenta criptosporidiosis crónica y se ha observado que hay animales que resisten la infección o curan espontáneamente; también puede producirse pérdida de enzimas digestivos del intestino delgado y reducir la capacidad de absorción del íleon.

Algunos de los factores que influyen en las manifestacio-

nes clínicas son la especie, edad y estado inmunitario. (2)

Se hicieron experimentos en carneros neonatos de diferentes edades, haciéndoles inóculos a diferentes dosis, en donde se observó que la presencia de la enfermedad dependía de la edad del animal y el período de incubación variaba entre 5 y 8 días.

En humanos con SIDA, la diarrea es crónica y severa, con pérdida de peso hasta llegar a la muerte. En paciente inmunocompetente, los síntomas son auto-limitados y con diarrea crónica. En adultos inmunocompetentes la enfermedad está caracterizada por anorexia (100.0 %), diarrea con 5 a 16 evacuaciones por día durante 1 a 10 días (100.0 %) (12), náuseas (67.0 %), flatulencia (67.0 %), vómitos (47.0 %), dolor abdominal (67.0 %), debilidad (100.0 %), fiebre ligera y leucocitosis sanguínea son comunes. El exámen fecal quizá revele moco, pero sangre y leucocitos son vistos raramente. (4, 8) Los síntomas son muy variables en niños, siendo la diarrea el síntoma más común (90.0 %). (1)

El número de oocistos es mayor en diarreas que en heces formadas. (1, 7) Los pacientes generalmente continúan excretando gran cantidad de oocistos después de desaparecer la diarrea.

En cortes histológicos los parásitos vistos en el borde de cepillo de las vellosidades, producen una reacción celular y quizá causan lesiones focales requiriendo así repetir las biopsias (William L. Current).

La intolerancia a la lactosa y la mala absorción de grasa han sido bien documentados. (1, 4, 8)

Normalmente los síntomas duran de 1 a 2 semanas, la enfermedad se auto-limita, pero pueden continuar por más de 1 a 2 meses. El síndrome clínico puede complicarse por la presencia de copulígenos. En inmunocompetentes los síntomas desaparecen espontáneamente. En inmunocomprometidos la infección es más virulenta y persistente, la diarrea es acuosa y de muchos meses de duración, lo cual puede producir caquexia, deshidratación severa, y a menudo los ya que puede colonizar el pulmón.

2.4.- Fisiopatología de la diarrea por Cryptosporidium.

Se desconoce el mecanismo por el que Cryptosporidium produce diarrea. Esta diarrea es secretora, sin leucocitos polimorfonucleares, ni glóbulos rojos es líquida y abundante, puede provocar mala absorción de grasas y carbohidratos ya que está involucrada la membrana superficial de la célula epitelial. En tejidos produce infiltración de mononucleares en la lámina propia, aumenta el tamaño de las criptas y atrofia las vellosidades intestinales. (8)

En esta parasitosis no se presenta eosinofilia periférica importante u dilatación de isosporiasis. (2)

2.5.- Diagnóstico de laboratorio en la criptosporidiosis.

El diagnóstico de Cryptosporidium se basa en la identificación de oocistos, por métodos de concentración y/o tinciones de muestra de excremento.

El primer diagnóstico que se hizo de criptosporidiosis

humana está basado en identificación del parásito en biopsias del intestino delgado y grueso. (1, 4, 6, 8, 12, 13)

La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que los exámenes de excremento son los más sensitivos; las biopsias pueden dar falsos negativos debido a la autólisis durante el procedimiento y a las dificultades de ejemplificación relacionadas con la distribución de Cryptosporidium, con poca inflamación asociada presente para guiar la endoscopia, pudiéndose hacer la toma de lugares que no estuvieran infectados.

Current y Da. aseguran que las técnicas de concentración y tinciones específicas son mejores y más concretas que las biopsias porque en estas últimas se puede tomar una muestra donde no se encuentre adherido el parásito y obtener un diagnóstico equivocado. (2) El examen de excremento asume que es prueba de todo el tracto intestinal y provee un procedimiento no invasivo. (12)

2.5.1.- Métodos de concentración.

Los métodos de concentración pueden ser útiles durante la evaluación de muestras de excremento formado en huéspedes asintomáticos. Tales métodos incluyen técnicas de flotación como la de sulfato de Zinc, técnica de Sheater con solución concentrada de sacarosa, y la solución hipertónica de cloruro de sodio; y las técnicas de sedimentación como la de Ritchie y la más recomendable la de formalin-éter.

La técnica de Sheater ha mostrado ser igual o mejor que la de formalin-éter para la concentración de oocistos. (6, 13)

2.5.2.- Métodos de tinción.

Una de las tinciones utilizadas es la de Auramina-O fluorescente que puede ser el procedimiento disponible más rápida pero poco confiable debido a que con esta tinción no se puede ver la morfología ni estructura interna.

Henrickson introdujo el uso de tinción ácido resistente para diferenciar células de levadura de los oquistes de Cryptosporidium y así evitar falsos negativos en el diagnóstico, ya que las células de levadura son semejantes a los oquistes en tamaño y forma. (S. A. Henrickson "Differential staining of Cryptosporidium in smears" abstract presented at the 10th symposium of the Scandinavian Society for Parasitology, held at Koge, Denmark in 1981).

La tinción de Ziehl-Neelsen ha mostrado ser la mejor de todas las tinciones, en sensibilidad y morfología cuando se usa junto con digestión inicial de mec con KOH al 10.0% (8). La tinción de dimetil metilóido carbocianina (DM50) y la técnica modificada de Kingum eliminan la necesidad de calentar o vaporizar, y tienen una tinción y sensibilidad elevada igual a la de Ziehl-Neelsen. Con estos métodos es difícil confundir los oquistes con las células de levadura u otros artefactos ya que toman color de contraste diferentes al tenerlos. La tinción de Giemsa es poco específica ya que no diferencia los oquistes de las células de levadura. La tinción con safranina-azul de metileno es sensible y rápida. Las tinciones con yodo, PAS modificado y la metenamina argéntica son poco confiables.

Es recomendable familiarizarse con dos técnicas de tin-

ción y el uso de láminas de control para un diagnóstico eficaz.

De las tinciones, la más usada es la de Kinyoun modificada, ya que se ha demostrado que es muy selectiva porque tinte los ooquistes de color rosa y ayuda a diferenciarlos de las células de levadura.

Muchos factores interfiere en las tinciones, incluyendo la flotación con azúcar, digestión del moco con KOH al 10.0 por ciento, la formalina usada para preservar las heces, alcohol polivinílico y mezcla de Schaudin.

2.5.3.- Métodos serológicos.

Los anticuerpos específicos IgG, IgM y la IgA para Cryptosporidium, han sido detectados por ensayos de inmunofluorescencia (IFA), el cual todavía no está disponible comercialmente y requiere microscopio de inmunofluorescencia, con 100.0 % (8) de sensibilidad y especificidad, aún con bajas concentraciones de ooquistes en la muestras el método de ELISA semi utilizado para detectar IgG e IgM séricos, en pacientes inmunocompetentes y con SIDA. El aumento de títulos de anticuerpos se da en 6 u 8 semanas de la infección durando así aproximadamente un año, y luego empiezan a disminuir. Estudios serológicos no son útiles en criptosporidiosis, pero juegan un papel importante en la epidemiología de esta enfermedad, y estas pruebas no están aún disponibles comercialmente. En criptosporidiosis persistente y en SIDA, los títulos fueron poco elevados y no persistían por mucho tiempo. No se observó reacción cruzada con otros coccidios.

Se está depurando un antígeno más específico de origen

antígeno que pesa 23,000 dalton, y no da reacción cruzada.

La respuesta de IgG puede reflejar infección reciente en el grupo de los inmunocompetentes.

Los métodos más sensibles reportados emplean anticuerpo murino monoclonal a la pared del ooquiste.

2.6.- Tratamiento actual de la criptosporidiosis.

Respecto a la terapia, las personas inmunocompetentes tienen infecciones auto-limitantes que pueden requerir hospitalización para rehidratación y mejora sintomática. En pacientes inmunocomprometidos, que raramente mejoran espontáneamente, pueden requerir terapia adicional. No se ha demostrado tratamiento útil pues se desconoce el mecanismo de acción contra Cryptosporidium.

Los agentes potenciales anti-Cryptosporidium, han sido impedidos por la inhabilidad para cultivar el parásito in vitro, y por la ausencia de síntomas. (4)

El antibiótico que se ha usado es la furazolidona, tetraciclina o una combinación de quinina y clindamicina; el más prometedor es el uso de espiromicina mostrando una mejora sintomática inconsistente e infrecuente y cura microbiológica.

3. - MATERIAL Y METODO.

3.1. - Material y reactivos utilizados.

3.1.1. - Material.

- Tubos cónicos para centrifuga de 15.0 ml.
- Centrifuga.
- Asa bacteriológica.
- Aplicadores de madera.
- Pipetas pasteur de 20.0 cm. de longitud.
- Gasa cortada en cuadros de 3.0 x 8.0 cm.
- Papel filtro.
- Bulbos de goma.
- 3 cajas coplin.
- Microscopio.
- Portuobjetos de 2.5 x 3.0 cm.
- Dilunzu.
- Probeta de 50.0 ml.
- Plancha eléctrica.
- Embudo.
- Termómetro.
- Matraz erlenmeyer de 50.0, 100.0 y 150.0 ml.

3.1.2. - Reactivos.

3.1.2.1. - Método de Ritchie (sedimentación).

a) Solución salina isotónica.

- b) Formol al 10.0 % .
- c) Eter sulfúrico comercial.

3.1.2.2.- Tinción de dimetil sulfóxido-modificada ácido resistente.

a) Carbolfucsina-DMSO:

Cristales de fucsina básica -----	4.0 gr.
Alcohol etílico 99.0 % -----	25.0 ml.
Fenol -----	12.0 gr.
Glicerol químicamente puro -----	25.0 ml.
DMSO -----	25.0 ml.
Agua destilada -----	75.0 ml.

Disolver los cristales de fucsina básica en el alcohol etílico 99.0 %. Aparte se licia el fenol en baño maría, para luego agregarlo a la primera preparación y mezclarlos bien. Enseguida se agrega el glicerol, el DMSO y el agua destilada, revolviendo muy bien todo. Se deja reposar durante 30 minutos y enseguida se filtra. Después de este procedimiento se puede usar la tinción o guardarla indefinidamente a temperatura ambiente, en un frasco de vidrio color ámbar.

b) Solución de contraste-decoloración.

Sol. ac. de verde de malaquita 2.0 % -----	220.0 ml.
Ac. acético glacial 95.0 % -----	30.0 ml.
Glicerol químicamente puro -----	50.0 ml.

Mezclar el ácido acético, verde de malaquita y glicerol.

La filtración no es necesaria. Esta solución se guarda indefinidamente en un lugar cerrado a temperatura ambiente.

- c) Metanol absoluto, 20.0 ml.
- d) Tonmatina al 10.0 %.

3.1.2.3. - Tinción de Kiyoun modificada.

- a) Metanol 100.0 %.
- b) Carbofucsina fenicada:

Fucsina básica -----	4.0 gr.
Fenol -----	8.0 gr.
Alcohol etílico 95.0 % -----	20.0 ml.
Agua destilada -----	100.0 ml.

Se disuelve la fucsina básica en el alcohol y se agrega lentamente al agua. Aparte se licia el fenol a 56 grados centígrados en baño maría, ya licuado se le agrega a la primera preparación. Se filtra antes de usar.

- c) Verde brillante:

verde brillante -----	2.0 gr.
Agua destilada -----	100.0 ml.

Se disuelve el verde brillante en el agua mezclando bien, y esto se usa como stock haciendo una dilución 1:10 en agua destilada.

- d) Acido sulfúrico 10.0 %.

3.2. - Métodos empleados.

3.2.1. - Método de concentración de Ritchie (sedimentación).

- 1.- Con un aplicador agregar aproximadamente 1.0 gr. de materia fecal en un vaso precipitado que contenga 10.0 ml. de solución salina. Homogeneizar bien.
- 2.- Filtrar la suspensión a través de una gasa, recibiendo el filtrado en un tubo cónico para centrifuga.
- 3.- Centrifugar durante un minuto a 2000 rpm. Después deshechar el sobrenadante.
- 4.- Repetir el paso número 3 hasta que el sobrenadante salga limpio.
- 5.- Agregar 10.0 ml. de formol y dejar en reposo la suspensión durante 10 minutos (fijación).
- 6.- Agregar 5.0 ml. de éter, tapar el tubo y agitar vigorosamente durante 30 segundos.
- 7.- Centrifugar durante 1 minuto a 1500 rpm.
- 8.- Pasar una pipeta pasteur a través de la capa 1, 2 y 3. Extraer con cuidado el sedimento.
- 9.- Poner el sedimento en un portaobjetos limpio. Dejar secar la muestra a temperatura ambiente durante un día.
- 10.- Ya seca la preparación se tiñe.

3.2.2.- Método de tinción rápida de dimetil sulfoxido modificada ácido-resistente.

Se hace una extensión de material fecal sobre un porta-objetos limpio y flameado, se deja secar al aire y sobre una placa caliente.

Las muestras se fijan con metanol absoluto por 5 a 10 segundos. Luego se tiñen con carbolfucsina-D150 en una caja de coplin, durante 5 min., enseguida se lavan individualmente por 10 a 30 seg. para quitar el exceso de solución. Después se colocan en el líquido de contraste-decoloración durante un minuto, o hasta que aparezca el fondo verde, y entonces se lavan individualmente bajo el chorro del agua de la llave por 10 seg., se secan y se dejan secar al aire. Se observa al microscopio con aceite de inmersión.

Las levaduras y los leucocitos se tiñen de color azul verde, y los glóbulos rojos no se tiñen.

Las cantidades de penetración del D150 agregado a la carbolfucsina elimina la necesidad de calentar o vaporizar y promete una tinción rápida y de mejor contraste. El ácido acético agregado a la solución de contraste-decoloración simplifica la decoloración.

3.2.3.- Tinción de Kinyoun modificada.

1.- Sumergir la preparación ya seca en metanol 100.0 % durante

- 1 minuto. Enseguida sacarlo, quitar el exceso sacudiéndolo un poco y dejarlo secar a temperatura ambiente.
- 2.- Sumergir la preparación en carbolfucsina fenicada durante 1 minuto.
- 3.- Lavar con agua en chorro suave para quitar bien cualquier exceso.
- 4.- Sumergirla luego en ácido sulfúrico 10,0 % durante 1 minuto, para decolorar.
- 5.- Lavar en el chorro de agua.
- 6.- Sumergir en el verde brillante durante 1 minuto.
- 7.- Lavar con agua en el chorro de la llave.
- 8.- Dejar secar y observar al microscopio con objetivo de inmersión.

4.- RESULTADOS OBTENIDOS.

En 160 muestras examinadas para la búsqueda de Cryptosporidium en una población de lactantes con diarrea crónica, se identificaron 5 casos positivos (3.12 %).

El análisis de la población seleccionada fue: 80 pacientes (50.0 %), con nivel socioeconómico de clase media baja, y 80 pacientes (50.0 %) de clase media alta.

Contradictoriamente a lo esperado, en el primer grupo se obtuvo solo una muestra positiva (0.62 %), mientras que en el segundo se encontraron los cuatro restantes (2.50 %).

Es importante mencionar que en el primer grupo las muestras se recolectaron de las heces remitidas preservándose estas en solución formalinizada al 10.0 %; mientras que las muestras procedentes del segundo grupo fueron recolectadas por irrigación rectal, y también fueron conservadas en solución de formol al 10.0 %.

De acuerdo a los métodos de tinción, en este estudio se utilizaron el método de Kinyoun modificado y la técnica de dimetil sulfóxido, donde se obtuvo el mismo porcentaje de positividad, pero prácticamente el grado de coloración obtenido por el segundo método dificultó la localización e identificación del parásito. (Fig. 1 y 2)

FIGURA 1.
Tinción de Cryptosporidium con
Kinyon modificada.

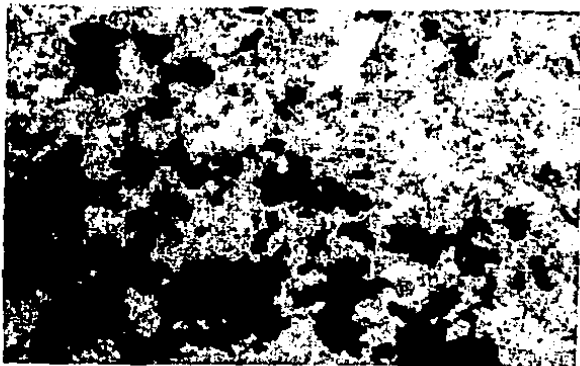


FIGURA 2.
Tinción de Cryptosporidium con
Diacel modificado.

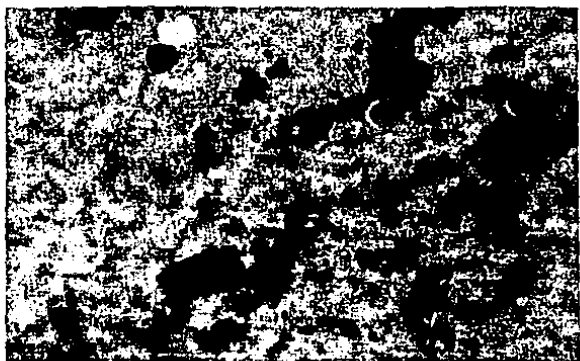


TABLE I. Datos obtenidos de los cinco casos positivos identificados en este estudio.

CASO	No. OOCULISTES CK	No. OOCULISTES DK	PMV	EDAD EN MESES	SEXO
I	A) 0 a 1 B) 17	A) 0 a 3 B) 205	0	7	M
II	A) 0 a 1 B) 4	A) 0 a 1 B) 4	ADIV- DAN- TES	12	M
III	A) 0 a 1 B) 7	A) 0 a 5 B) 52	ES- CA- SOS	14	M
IV	A) 0 a 1 B) 6	A) 3 a 5 B) 273	0	24	M
V	A) 0 a 1 B) 5	A) 0 a 7 B) 5	0	36	F

Donde:

CK : Método de concentración de Ritchie con posterior tinción de Kinyoun modificada.

DK : Método de frotis directo de la muestra formalinizada con posterior tinción de Kinyoun modificada.

PMV: Semicuantificación de la presencia de leucocitos polimorfonucleares en la preparación.

A) : Número de oocistos por campo óptico de inmersión.

B) : Número de oocistos en toda la lámina.

Se consideró interesante mencionar uno de los casos clínicos de los pacientes que presentaron criptosporidiosis, para darnos una idea de datos clínicos importantes en esta parasitosis.

CASO No. I

Paciente masculino de 7 meses de edad. Desde los dos meses presentó cuadro entérico, del cual se recuperó rápidamente. A los tres meses y medio presentó bronconeumonía desarrollándose poco después un cuadro entérico de evolución prolongada, con desnutrición de segundo grado (33.0%), que lo condujo a deshidratación severa, motivo por el cual fue internado en un hospital.

Urgencia: Deshidratación severa.

Diagnóstico: acidosis metabólica, desnutrición de segundo grado y anemia clínica.

Antecedentes: Cuadro enteral de dos meses de evolución tipo intermitente.

Hijo de padre campesino y madre dedicada al hogar, residente en Guadalajara, Jalisco.

El padecimiento reinició hace tres días con evacuaciones líquidas color verdoso, con moco, sin sangre, 6 a 8 evacuaciones por días; con 4 a 5 vómitos en 24 horas; hipertermias; rechazo a la vía oral; dificultad respiratoria con cianosis peribucal; abdomen ligeramente distendido, pero blando, depresible y con ruidos peristálticos aumentados.

5.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.

5.1.- Discusión.

Examinando los dos grupos poblacionales, vemos que contradictoriamente se obtuvo mayor porcentaje de positividad en pacientes de la clase media alta que en los lactantes de la clase media baja.

Mencionamos que es contradictorio el resultado obtenido ya que esperábamos mayor positividad en personas de clase media baja debido a que éstas tienen menor posibilidad económica y por tanto mayor posibilidad de estar en contacto con el suelo, animales domésticos como perros, gatos, y a veces con animales de granja principalmente huerzos y puercos, que se ha visto son animales transmisores de esta parasitosis, como también el agua contaminada y el mal aseo de las personas, que es más probable que las personas de clase media alta no se encuentren en estas condiciones. Se puede pensar que en este último nivel hayan adquirido el parásito por transmisión de persona a persona, madres que dejan a sus hijos en guarderías, o con las personas que visitan el aseo doméstico. También puede ser que la hayan adquirido por medio de fomites contaminados, o cuando juegan con mascotas.

Así mismo, se piensa que estos resultados contrarios a lo esperado puedan ser causados en parte por el tipo de toma de la muestra, ya que el 50.0 % de las tomas se obtuvieron por irrigación rectal (clase media alta) que es donde se obtuvo mayor positividad, y la otra mitad (clase media baja) se recolectaron las muestras provenientes de heces diarréicas.

Observando la positividad del primer grupo nos hace pensar que por la forma de obtener la muestra nos haya ayudado a presentar más casos positivos, ya que el paso de las heces a través del tracto intestinal pueden quedarse depositados los ooquistes en las paredes del intestino, principalmente en colon y recto sigmoides, y que al hacer presión con la obturación sativa cuando se está realizando la toma rectal llegan a removerse los ooquistes junto con el moco a que se adhieren. Por lo contrario, cuando no se induce esta reacción, debe existir gran cantidad de ooquistes en las heces, que son los que las células liberan normalmente cuando se va completando el ciclo biológico y no los que se pueden ir depositando a través del tracto intestinal mientras se van evacuando las heces, para que el examen tenga mayor posibilidad de ser positivo. Es por eso que si se obtiene de la segunda forma, se recomienda realizar un examen seriado de tres días consecutivos para así tener mayor posibilidad de encontrarlo. En caso de que en la primera toma por irrigación rectal no se encuentre Cryptosporidium o algún otro patógeno que pueda ser el causante de la diarrea, y persiste el cuadro característico de criptosporidiosis se recomienda hacer el examen seriado para una mayor seguridad.

Otro punto de considerable importancia que nos puede ayudar para obtener mejores resultados, es la selección de la materia fecal al hacer la preparación de las láminas. Al llevar a cabo ésta, se debe procurar tomar el moco que es donde más fácilmente se localiza al parásito. Con este moco se hace un extendido uniforme para después llevar a cabo la tinción.

También es importante saber que esta parasitosis no induce reacción inflamatoria, de lo contrario indicarla una infección mixta.

Al tratar de identificar a un parásito como Cryptosporidium, que comúnmente no se busca en cualquier laboratorio y que antes no habíamos aislado, nos hace suponer que este parásito ha sido inadvertido debido a su tamaño pequeño y a su semejanza con las levaduras u otros artefactos similares presentes en el excremento o en el moco al examinar una preparación en fresco de tomas rectales que se realizan diariamente como rutina, por lo que no ha sido motivo de un mayor estudio y menos para utilizar un procedimiento diferente al de otros parásitos para poder diferenciarlo e identificarlo, ya que no se sospecha ni siquiera su existencia debido a que casi no ha sido difundido en el área médica ni a nivel laboratorio.

A una de las muestras positivas se le agregó lugol parasitológico para intentar observar al parásito con el objetivo seco fuerte (40 X), pero no se logró su identificación debido a que su tamaño es pequeño, por eso es que se debe emplear un segundo método con técnicas de tinción especiales para poder diferenciarlo de otras estructuras o artefactos. La utilidad diagnóstica de un examen directo es ver si existe la presencia de PTV, células de levadura, gránulos neutros, restos alimenticios o algún otro patógeno que pudiera ser el causante de la diarrea.

Las evacuaciones diarreicas causadas por Cryptosporidium son de tipo secretor donde no se espera la presencia de PTV, por lo que en los casos donde se observan estos (Tabla I), es posible la presencia de un copatígeno bacteriano que son los que comúnmente inducen esa reacción inflamatoria.

De las dos técnicas que se utilizaron en este estudio, la de dimetil sulfoxido no resultó ser lo suficientemente útil, aunque se considere una tinción rápida debido a que los reacti-

vos empleados no se encuentran fácilmente disponibles y son raramente incluidos en laboratorios de diagnóstico clínico.

Por otra parte, con estos reactivos no se obtuvo una buena tinción de los ooquistos ni un buen contraste para poderlo diferenciar rápidamente al microscopio (se observó que no se presentaba una decoloración suficiente). Así mismo, con la tinción de Kinyoun modificada donde el fondo de contraste está bien definido (debido a una buena decoloración) ya que los ooquistos son ácido resistentes pudiendo tomar bien el primer colorante y no pueden decolorarse a diferencia de las células de levadura y otros artefactos que toman el color del colorante de contraste después de haber sido bien decolorados, pudiendo así ser más fácilmente diferenciado e identificado el parásito. También se sugiere esta técnica porque los reactivos son más accesibles y también pueden ser utilizados para tesar bacilos ácido-resistentes.

Al aplicar una técnica de tinción, es importante el grosor de la preparación, el cual debe ser uniforme y lo suficientemente delgado para facilitar la penetración de los colorantes y la decoloración, por tanto también su visualización al microscopio.

Al hablar de técnicas de concentración se espera, como su nombre lo indica, un concentrado de parásitos que es el objetivo de estos procedimientos, pero examinando los resultados vemos que esto es contradictorio, ya que se obtuvieron más número de ooquistos en preparaciones directas que en los concentrados. Observando esto, suponemos que un método de concentración resulta eficaz para una muestra pastosa o semisólida, pero en el caso de las muestras blandas o diluidas (con formol y/o solución salina, principalmente las muestras que se tomaron

por irrigación rectal) estos métodos pueden ser ineficaces por la pérdida de oquistes durante los lavados de la muestra, mientras que en la preparación directa se selecciona el moco que se va a usar para hacer el preparado de la luminilla. Por lo tanto, con los resultados obtenidos se recomienda hacer una técnica directa y no una de concentración por las desventajas ya mencionadas, también por el gasto de tiempo y reactivos que no es indispensable usarlos ya que se puede obtener un buen número de oquistes haciendo un frotis directo, evitando también el mayor manejo y contacto con la muestra, y por lo tanto, posibilidad de contaminación.

Como mencionamos anteriormente, este parásito que produce cuadros diarreicos agudos y crónicos, suponemos que pudo haber sido observado no como un parásito sino como un artefacto cualquiera, y que estos casos clínicos producidos no habían sido detectados como tales sino detectados como consecuencia de la presencia de Cryptosporidium, sino de una supuesta etiología diferente.

Como vemos en el caso No. 1, se presenta un cuadro clínico de evolución prolongada, siendo éste un dato muy importante ya que este parásito nos puede producir diarrea desde una semana hasta tres meses o más, llevando a estos pacientes a una deshidratación severa, lo cual puede conducir a descompensaciones metabólicas y daño renal. Otro dato común fueron las evacuaciones verdosas o amarillentas, con moco, sin sangre, en número de 6 a 8, por día y con la presencia de 4 a 5 vómitos en 24 horas. Otro dato que puede asociarse a esta parasitosis es la desnutrición por la intolerancia a los alimentos y mala absorción que se presenta, dando como consecuencia anemia y/o inmunodepresión, siendo así susceptibles a contraer criptospori-

diosis, ya que se considera patógeno oportunista. En este caso clínico el paciente padecía de enfermedad respiratoria que pudo incrementar dicha inmunodepresión.

Por lo general, en lactantes con síndrome diarreico el pediatra sugiere la tinción del moco fecal con azul de metileno, para la búsqueda de la presencia o ausencia de PTV. Tomando en cuenta esto, durante el estudio surgió la inquietud de tratar de visualizar los oocistos para sospechar la presencia del parásito, de tal manera que pudiera confirmarse dicha preidentificación con la técnica adecuada como lo es la de Kinyoun modificada. Consideramos que con azul de metileno puede observarse una especie de estructuras con aspecto de "fantasmas" característicos, del mismo tamaño que los oocistos de Cryptosporidium. De esta forma sugerimos que el microscopista debe familiarizarse con dichas estructuras para poder sospechar la presencia de este parásito poco difundido en el área médica, y confirmar posteriormente el diagnóstico mediante la tinción adecuada.

5.2.- Conclusiones.

En este estudio se logró identificar Cryptosporidium con un 3.12 % del total de las muestras de lactantes con síndrome diarreico, lo cual nos lleva a la conclusión de que es un microorganismo presente en nuestro medio, y que ha pasado desapercibido ya que no puede ser diferenciado e identificado por los métodos rutinarios que se emplean en el laboratorio en la búsqueda de parásitos u otros patógenos, ya que para su aislamiento y diagnóstico se requieren procedimientos especiales.

También se concluyó que cualquier enfermedad que nos conduja a la inmunodepresión, nos hace susceptibles a adquirir un cuadro clínico de criptosporidiosis, como es el caso de pacientes con alto grado de desnutrición o en pacientes con SIDA.

Consideramos que es importante conocer datos clínicos del paciente para ver si son compatibles con una criptosporidiosis, como lo vemos en personas que desarrollan un cuadro clínico con diarreas agudas o crónicas, con 6 a 8 evacuaciones por día, acompañadas en ocasiones de 4 a 5 mimitos en 24 horas debido a la intolerancia hacia los alimentos, y/o factores de inmunodepresión. Es por esto que en los laboratorios clínicos deben estar preparados para llevar a cabo una identificación usando los medios apropiados para ello.

Observando los resultados obtenidos nos damos cuenta que fueron contradictorios respecto a los porcentajes obtenidos en las dos clases socioeconómicas; esto nos lleva a concluir que fueron varios factores los que influyeron en ello, como son la toma de la muestra y el manejo de éstas.

Respecto a la toma de la muestra observamos que la técnica de irrigación rectal nos proveyó mejores resultados que la recolección por defecación, lo cual nos puede explicar el mayor número de casos positivos detectados en muestras obtenidas de esa manera.

Con respecto al manejo de la muestra, lo ideal es procesarlas lo más pronto posible después de haberlas obtenido.

Es tan pequeña la porción de muestra que se va a utili-

zar, que es importante saber elegir qué parte de esta se va a trabajar. Lo ideal es seleccionar el moco que se extrae al tiempo de hacer la irrigación y se aconseja hacer dos o más preparaciones, o pedir un exámen seriado de tres muestras para diagnosticar o descartar la posibilidad de una criptosporidiosis.

El intento que se efectuó por lograr un concentrado de oocistos utilizando la técnica de Ritchie fue desfavorable, ya que se observó un mayor concentrado haciendo un frotis directamente de la muestra que utilizando este método de concentración. Por lo tanto, concluimos que los concentrados son más eficaces para muestras sólidas o semisólidas, ya que con las muestras líquidas se pierde mucho material al procesarlas, produciendo así la pérdida de oocistos en los lavados.

Al hacer comparación de los dos métodos de tinción utilizados, se aceptó que la técnica de Kinyoun modificada resultó ser más aceptable que el método de directil sulfúrico, ya que con la primera técnica obtenemos un mejor contraste debido al color rosa fuerte que toma el Cryptosporidium u diferencia de las teniduras y leucocitos que forman el fondo tiñéndose de color verde ya que estos últimos no son ácido-resistentes. Así, se observó que el paso de la decoloración es muy importante en estos métodos y que la técnica de directil sulfúrico no proporciona una buena decoloración por lo cual no se obtiene un buen contraste. Es muy importante que el laboratorio trabaje con tinciones de control de acuerdo a la tinción que se está utilizando.

Por tanto, haciendo una buena tona, un frotis directo

de material selecto (noco) y una buena tinción como la de Kinyoun modificada que nos da un buen contraste, que es fácil de adquirir, que no es tan costosa y cuyos reactivos pueden ser utilizados para practicar otros exámenes (como es la tinción de bacilos ácido-resistentes), podemos simplificar el diagnóstico aportando así el inicio de la terapia y reduciendo el riesgo en el manejo prolongado del material contaminado y de la pérdida del parásito al tratar de hacer el concentrado.

6.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Holley H. P., Dover C. Cryptosporidium: A COMMON CAUSE OF PARASITIC DIARRHEA IN OTHERWISE HEALTHY INDIVIDUALS. *J. of infectious Dis.* 153, (2):365-367. 1986.
- 2.- Amador López Raul. CRİPTOSPORİDİOSIS. *Infectologia.* 6, (8):279-290. 1986.
- 3.- Junoff E. N. CONCENTRACION E IDENTIFICACION DE *Cryptosporidium* SP. *J. Clin. Microbiol.* 20, (5):860-861. 1984.
- 4.- Soue Rosemary and D. J. Warren. AIDS COMMENTARY. *J. of Infectious Dis.* 157, (4):225-229. 1988.
- 5.- S. J. Upton and W. L. Current. THE SPECIES OF *Cryptosporidium* (APICOMPLEXA: CRYPTOSPORIDIIDAE) INFECTING MAMMELS. *J. Parasitol.* 71, (5):625-629. 1985.
- 6.- McNabb S. J., Hensel D. M., Welch D. F., Hojkel H., Mcke G. L. and Istra G. R. COMPARISON OF SEDIMENTATION AND FLOTATION TECHNIQUES FOR IDENTIFICATION OF *Cryptosporidium* SP. OOCYSTS IN A LARGE OUTBREAK OF HUMAN DIARRHEA. *J. Clin. Microbiol.* 22, (4):587-589. 1985.
- 7.- Bronsdon M. A. RAPID DIMETHYL SULFONIDE-MODIFIED

- ACID-FAST STAIN OF Cryptosporidium OOCYSTS IN STOOL SPECIMENS. *J. Clin. Microbiol.* 19, (6):952-953. 1984.
- 8.- Janoff E. N. and Reller L. B. Cryptosporidium SPECIES, A PROTEAN PROTOZOAN. *J. Clin. Microbiol.* 25, (6):967-975. 1987.
- 9.- Pontus M. CRIPTOSPORIDIOSIS. *Enfermedades infecciosas.* IV:2529-2532. 1987.
- 10.- Schmidt G. D. y Lunny S. R. FUNDAMENTOS DE PARASITOLOGIA. Primera Edición, México, Ed. DECSA, 1984, 129-143.
- 11.- JEDIAQ. ROUTINE PARASITOLOGICAL EXAMINATION FOR Cryptosporidium. *J. Inf. Dis.* 54, (2):201-202. 1986.
- 12.- Garcia L. S., Dauchner D. A., Brewer T. C. and Shimizu Y. TECHNIQUES FOR THE RECOVERY AND IDENTIFICATION OF Cryptosporidium OOCYSTS FROM STOOL SPECIMENS. *J. Clin. Microbiol.* 18, (1):185-190. 1983.
- 13.- Ma. P. and Soave R. THREE-STEP STOOL EXAMINATION FOR CRIPTOSPORIDIOSIS IN 10 HOMOSEXUAL MEN WITH PROTRACTED WATERY DIARRHEA. *J. Inf. Dis.* 147, (5):824-828. 1983.
- 14.- JEDIAQ. CRIPTOSPORIDIOSIS AND ROUTINE PARASITOLOGICAL DIAGNOSIS. *J. Inf. Dis.* 156, (1):260. 1987.

- 15.- Garrocho C., García V. M., Macías M. C., Obregón M. G. y --
González R. INFECCION POR Cryptosporidium EN NIÑOS SANOS
DEL ALTIPLANO DE MEXICO. 55, (2):73-78. 1988.
- 16.- Bailey and Scott's. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY. 7th
Edition, EEIII, Ed. Sydney M. Finegold and Ellen Jo Baron,
1988, 901.
- 17.- Romero C. Raul, Montesinos N. Cristina, Saldaña R. E.,
Arista V. A. CRIPTOSPORIDIOSIS EN PACIENTES PEDIATRICOS
CON SINDROME DIARRHEICO. *Enfermedades Infecciosas en Pedia-*
tria. 1, (2):57-59. 1988.