

22
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

FRECUENCIA DE QUISTES DE CRYPTOSPORIDIUM
EN NIÑOS MENORES DE SEIS AÑOS QUE
ASISTEN A LA GUARDERIA DEL IPN Y PERSONAL
ADULTO QUE LABORA EN LA MISMA.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
CAROLINA JANDETTE ZARATE

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

INDICE GENERAL

	pág.
1. INTRODUCCION	1
1.1. Importancia de <u>Cryptosporidium</u> como agente causal de diarrea	5
1.2. Dudas sobre la zoonosis	6
1.3. Biología de <u>Cryptosporidium</u>	7
1.3.1. Clasificación	7
1.3.2. Ciclo de vida	8
1.4. Patología y patogenia	12
1.5. Alimentación y Edad	13
1.6. Epidemiología	14
1.6.1. Infección y Transmisión	14
1.7. Frecuencia por edad y sexo	15
1.8. Variación estacional	16
1.9. Papel de los animales	17
1.10. Diagnóstico	18
1.11. Serología	19
1.12. Tratamiento	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
3. OBJETIVOS	23
4. HIPOTESIS DE TRABAJO	24
5. MATERIAL Y METODOS	25
6. RESULTADOS	32

	pág.
7. DISCUSION DE RESULTADOS	52
8. CONCLUSIONES	60
9. ANEXOS	62
10. BIBLIOGRAFIA	67

INTRODUCCION

Las infecciones por parásitos intestinales siguen siendo de importancia para la salud pública por su alta prevalencia, su distribución cosmopolita entre las poblaciones que viven en las zonas tropicales y subtropicales.

Los efectos que traen como consecuencia son sin duda -- trascendentales entre las poblaciones desnutridas, con alimentos escasos y deficientes en cuanto a su contenido energético, proteínico y vitamínico. (31)

En las enfermedades parasitarias, la infección, es el resultado de una relación que existe entre medio ambiente, hospedero y parásito. Puede observarse en muchos millones de -- personas que viven en los trópicos en viviendas inadecuadas, carentes de abastecimiento de agua o de saneamiento apropiado. (31)

En los países en desarrollo como en México, el hombre -- crece, vive y labora en un ambiente insalubre. El catálogo de los protozoarios y helmintos patógenos en México, es largo e impresionante, siendo prevalentes las geohelmintiasis como ascariasis, tricuriasis, uncinariasis y strongiloidosis; la amibiiasis invasora por Entamoeba histolytica, la giardiasis y el paludismo.

síndrome de inmunodeficiencia adquirida; en estos pacientes - la diarrea originada por el parásito conduce a la muerte en - la mayoría de los casos. El hombre sano o normal también puede infectarse con Cryptosporidium sp. pudiéndose presentar -- diarrea leve de curso autolimitado.

Tanto la patogenia como la epidemiología de esta parasitosis apenas empieza a conocerse. Aparentemente se trata de una zoonosis, pues actualmente se han descrito por lo menos - once especies del parásito infectando a perros, gatos, gansos, becerros, serpientes, monos, cobayos, ratón, pavos, ratas, -- etc.

El Cryptosporidium sp. ha llegado a ser en los últimos - años uno de los parásitos de mayor interés científico especialmente por sus implicaciones en pacientes inmunodeficientes y por el fracaso de la mayoría de las drogas para combatir la infección. (36)

Por tal motivo es de importancia ampliar y profundizar - más en la epidemiología de la Cryptosporidiosis con miras a - determinar su prevalencia global en la población humana, los mecanismos de la inmunidad, el tratamiento y la prevención de esta coccidiosis.

La diarrea es una causa importante tanto de morbilidad como de mortalidad de los lactantes y niños en los países en

desarrollo. Hasta finales de los años de 1960, la etiología de la diarrea sólo podía determinarse en aproximadamente 20% de los casos, reconociéndose como agentes causales sólo a un número pequeño de microorganismos como Shigella sp., - - Salmonella sp., Vibrio cholerae, Giardia lamblia, - - - - Entamoeba histolytica, y los serotipos enteropatógenos de -- Escherichia coli. (1)

Sin embargo, en las últimas dos décadas, en base a las investigaciones realizadas acerca de las causas de la diarrea aguda y al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico, se descubrieron nuevos agentes infecciosos como Rotavirus, las cepas enterotoxigénicas y enteroinvasivas de Escherichia coli, Campylobacter jejuni, Yersinia enterocolitica, - - - - Clostridium difficile y otros agentes tales como el protozoario Cryptosporidium sp., además de los agentes bacterianos y virales menos comunes; los estudios que se han llevado a cabo en México a este respecto han permitido identificar al organismo causal en pacientes con diarrea aguda, en más del -- 60% de los casos, y la importancia relativa de los diversos agentes etiológicos mencionados. (1)

Sin embargo algunos de los estudios citados y otros llevados a cabo en otras áreas geográficas del mundo han demostrado que una proporción variable de los agentes patógenos mencionados, pueden también encontrarse en niños sin enfermedad diarreica aguda, lo cual ha llevado al planteamiento de diver

sas hipótesis (variaciones del microambiente intestinal, anti cuerpos específicos en la leche humana, etc.), tendientes a explicar este fenómeno. (1)

Como se mencionó anteriormente tres diferentes protozoarios que presentan una distribución universal participan también, aunque en forma limitada, en la etiología de las enfermedades diarreicas: Entamoeba histolytica, Giardia lamblia y Cryptosporidium sp. Los dos primeros tienen un estudio muy amplio, mientras que el último es un coccidio que en los últimos años ha cobrado mucha importancia debido a su papel en la etiología de la diarrea en diversas especies de animales y -- del hombre. (30)

1.1. IMPORTANCIA DE CRYPTOSPORIDIUM SP. COMO AGENTE CAUSAL DE DIARREA.

Desde que el parásito fue descrito por Tyzzer a principios del siglo (1907) en ratones, la infección ha sido descrita en una amplia gama de vertebrados, parasitando las células epiteliales del tracto gastrointestinal y en algunas ocasiones del árbol respiratorio. Han sido de particular importancia las infecciones notificadas en terneros, ovejas y pavos, así como en otros vertebrados en que produce diarrea severa e incluso fatal. (2, 5, 11, 12, 16, 19, 20, 21, 25, 26, 27, 28, 33, 34, 38, 39, 40, 41, 42, 43).

El interés por Cryptosporidium sp. se inició en 1976 al encontrarse al parásito en una niña con diarrea severa.

A partir de entonces se intensificó el estudio de infecciones en humanos sin complicaciones.

Ya se conocía la naturaleza oportunista de este organismo en pacientes farmacodependientes pues se habían descrito varios casos. Entre estos últimos, destacan las descripciones de infecciones fatales de Cryptosporidium sp. en pacientes con el síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (2, 5, 6, 11, 12, 13, 15, 16, 20, 24, 25, 26, 27, 28, 32, 33, 35, 40, 41, 42, 43).

Estudios en Australia, Costa Rica y posteriormente en -- Finlandia demuestran, sin embargo, que el parásito puede ser frecuente en individuos inmunológicamente normales.

1.2. DUDAS SOBRE LA ZOONOSIS.

La Cryptosporidiosis se ha considerado como una zoonosis potencial, pues se ha descrito en 30 especies incluyendo animales domésticos, particularmente en terneras, se ha asociado con enteritis en cobayo, enfermedad de tracto respiratorio e intestinal en diversos animales tales como guajolotes, pollinos, diarrea en becerras y corderos. (5, 8, 10, 12, 16, 19, 21, 25, 26, 32).

Poco se sabe sobre la epidemiología, antes se pensó que era una sola especie por la poca especificidad de hospederos. Ultimamente se reporta como un protozoario que infecta a varias especies de animales, por lo cual se le ha designado la especie de acuerdo al organismo de donde se aísla como - - - Cryptosporidium muris o parvum si se recupera de ratón, - - Cryptosporidium meleagridis en pavo, Cryptosporidium wraini en cobayo, Cryptosporidium ansirinum en ganso, - - - - - Cryptosporidium bovis en terneros, Cryptosporidium agni en oveja, Cryptosporidium rhesi en mono rhesus y - - - - - Cryptosporidium serpentis en serpientes. (25, 26, 41, 42).

1.3. BIOLOGIA DE Cryptosporidium sp.

1.3.1. Clasificación

El Cryptosporidium es un parásito que actualmente se ubica taxónomicamente así:

Phylum:	<u>Apicomplexa</u>	
Clase:	<u>Sporozoa</u>	
Subclase:	<u>Coccidia</u>	
Orden:	<u>Eucoccidiida</u>	
Suborden:	<u>Eimeriina</u>	
Familiar:	<u>Cryptosporidiidae</u>	(16, 42)
Género:	<u>Cryptosporidium</u>	

1.3.2. Ciclo de vida.

Fases del parásito: Trofozoito y oocistos.
Ciclo biológico: Directo, Monoxénico.
Fase Infectante: Oocistos maduros conteniendo cuatro esporozoítos.
Período de incubación: 3-8 días.

El ciclo de vida del Cryptosporidium sp. ha sido investigado en animales de experimentación, tales como: cricetos, -- terneras, rata y ratón.

Las observaciones sobre el ciclo completo del parásito - se han confirmado reproduciendo este "in vitro" en:

- a) Células embrionarias de pulmón humano.
- b) Células de riñón porcino.
- c) Por inoculación de oocistos en la membrana coriolantoidea de embrión de pollo..

Obteniéndose un crecimiento más extenso en el primer cultivo.

La fase infectante es el oocisto maduro, tal como se ha observado en contenido intestinal de ratones infectados experimentalmente, así como en animales infectados en forma natural.

Los oocistos de pared gruesa que constituyen el 80% de la población de oocistos, se excretan en heces, sin sufrir cambios aparentes durante el recorrido del tracto intestinal, y suelen infectar hospederos susceptibles por vía oral. Al ser ingeridos los oocistos, liberan los esporozoítos, se cree que la pared del oocisto es digerida en el aparato gastrointestinal, después de un período de maduración da origen al primer estadio del parásito que es el trofozoíto, tanto como los demás estadios se han encontrado solamente en el borde de las membranas epiteliales nunca dentro del citoplasma. En la fase siguiente los trofozoítos sufren tres divisiones nucleares, que darán origen a ocho merozoítos, a la estructura resultante se le llama primera generación de esquizontes. Los ocho merozoítos de la primera generación son liberados del esquizonte infectando otras células epiteliales, es aquí donde se observa el ciclo endógeno del parásito, llevándolo a cabo los oocistos de pared delgada que constituyen el 20% de la población de los oocistos, esta etapa también recibe el nombre de ciclo asexual. (22)

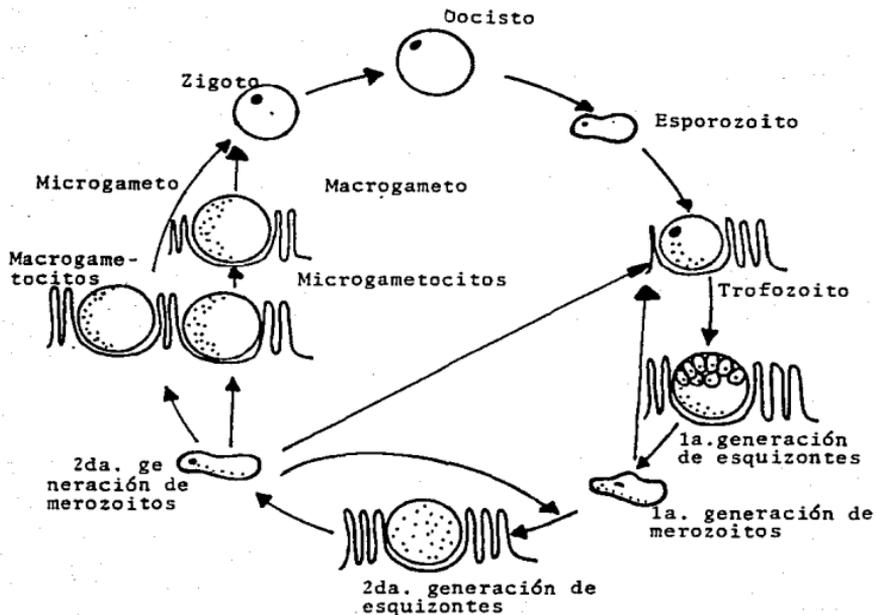
Después del ataque los merozoítos alargados cambian a redondos y después de llevar a cabo dos divisiones nucleares se convierten en esquizontes de segunda generación.

La conclusión de que el esquizonte que contiene ocho merozoítos es de primera generación y el esquizonte que contie-

ne cuatro merozoitos corresponde a la segunda generaci3n est1 basada en estudios realizados en cricetos, en los cuales despu3s de la inoculaci3n se detectaron trofozoitos en tres a -- cuatro d1as, esquizontes con ocho, merozoitos en siete a nueve d1as, de cuatro merozoitos en 11 a 14 d1as y gametocitos - en 13 a 15 d1as. (22)

Como en otros protozoarios se presentan c3lulas sexuales diferenciadas que se identifican como macrogametocitos y microgametocitos. El macrogametocito sufre un peque1o cambio - y se convierte en macrogameto. En tanto que el microgametocito sufre divisi3n nuclear y forma algunos microgametos. El n1mero exacto de microgametos no se conoce pero se cree que - son entre 12 y 16. Un microgameto se une con un macrogameto para formar un cigoto, del cual se desarrolla un oocisto, a - esta etapa tambi3n se le da el nombre de ciclo sexual, y es - as1 como se completa el ciclo de vida. (22)

FIGURA 1

ESQUEMA DEL CICLO DE VIDA DE Cryptosporidium sp.

Navin, R.T. y Juranek, D.D. Cryptosporidiosis Clinical, Epidemiologic and Parasitologic R. Rev. Infect. Dis. 6, 315. (1982)

1.4. PATOGENIA Y PATOLOGIA

El parásito posee una clara capacidad de colonizar diversos epitelios. Así, se le ha demostrado en biopsias de pacientes con diarrea, colonizando amplias zonas del yeyuno e íleon y focalmente en el colon y recto. (26, 42)

En pacientes con deficiencias Inmunológicas, el parásito puede invadir epitelio de la vesícula biliar produciendo colcistitis aguda, o bien el epitelio del árbol respiratorio asociado con neumonitis y neumonía. Otros sitios en donde se ha encontrado han sido faringe, esófago, estómago, duodeno y apéndice. El examen histológico revela, toda una gama de imágenes, desde un epitelio aparentemente normal hasta uno muy alterado con cambios que incluyen transformación del epitelio cilíndrico cuboidal, con acortamiento de las criptas y unión de las puntas de las microvellosidades ("punteo") que luego se desprenden o atrofian, el mecanismo por el cual ocurren alteraciones histológicas es aún desconocido, pero se considera -- que puede ser por efecto mecánico de las formas parasíticas del Cryptosporidium sp. Visualmente el parásito se observa desplazando y alterando la arquitectura del epitelio con borde de cepillo. Se desconoce la participación de sustancias tóxicas y/o enzimáticas en la patogenia. Sin embargo, la pérdida de líquido y electrolitos y su corrección mediante hidrotterapia oral podría suponer otros mecanismos fisiopatológicos.

En la mucosa parece interferir con la absorción y secreción de sustancias a nivel intestinal. (22, 26, 42)

La enfermedad diarreica en individuos normales se caracteriza por un cuadro clínico de evolución aguda y autolimitado, los síntomas que se presentan son: náuseas, vómitos, anorexia, dolor abdominal y diarrea aguda, con recuperación espontánea que ocurre en una o dos semanas.

En personas bajo tratamiento con drogas o que presentan el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), el cuadro clínico es diferente y frecuentemente muy severo. Los signos y síntomas más notorios son dolor abdominal, fiebre, diarrea profusa y persistente con pérdida de líquido durante meses o años llevando al debilitamiento y a la muerte del paciente.

En niños los síntomas son similares a los del adulto, se presentan vómitos, fiebre, diarrea y deshidratación.

La infección con Cryptosporidium sp. puede aparecer a -- muy corta edad, como en el neonato, y las manifestaciones clínicas tienden a ser más severas si el niño no recibe calostro ni leche materna o si es destetado prematuramente. (42)

1.5. ALIMENTACION Y EDAD

En estudios llevados a cabo en Costa Rica los niños pro-

cedentes del área urbana tendieron a presentar cryptosporidiosis (edad promedio 9.8 meses) probablemente porque el destete es precoz o porque los niños no están protegidos por la lactancia natural.

En contraste, las infecciones en niños del área rural -- aparecen tardíamente (edad promedio 22.8 meses) a pesar de -- que existen muchas posibilidades de infección.

No parece haber duda sobre el papel protector de la lactancia materna contra la Criptosporidiosis en el primer año de vida. Análogamente al posible papel de la lipasa en la leche materna estimulada por sales biliares como agente giardicida, podría existir otra sustancia similar, o quizás la misma contra el Cryptosporidium sp. Es probable también que existan anticuerpos secretores contra el coccidio, tanto a nivel intestinal como en la leche materna. (42)

1.6. EPIDEMIOLOGIA

1.6.1. Infección y Transmisión.

Estudios llevados a cabo señalan que terneros, ovejas y otros animales domésticos pueden ser fuentes potenciales de infección para el hombre. La transmisión de persona a persona es probable directa o indirectamente; el agua, alimentos y objetos contaminados con heces podrían dar origen a la trans-

misión indirecta. Durante la relación sexual el contacto or-anual puede ser un mecanismo de transmisión directa especialmente entre homosexuales. (5, 8, 10, 12, 19, 21, 25, 26, 32, 42).

Existen pocos estudios acerca de la prevalencia de - - - Cryptosporidium sp. Sin embargo estudios realizados en carnes demuestran que la infección puede ser común en estos animales domésticos, posteriormente en ganado vacuno, y los primeros informes de infección en humanos se describieron entre manejadores de ganado; lo cual sugiere que la enfermedad es una zoonosis. Esta hipótesis además está apoyada por experimentos que demuestran la transmisión de Cryptosporidium sp. - de humanos a algunas especies de animales. (5, 8, 10, 12, 16, 19, 21, 25, 26, 32, 42).

1.7. FRECUENCIA POR EDAD Y SEXO

Estudios llevados a cabo en países como Australia demuestran que el Cryptosporidium sp. parece ser más frecuente en la población infantil que en los adultos. (42)

En niños de Costa Rica con diarrea aguda, la edad en que se infectan varía entre 1 y 9 meses en la ciudad, y en el - - área rural entre 18 y 22 meses. La frecuencia de la parasitosis en niños del área urbana tiende a aumentar de un nivel --

muy bajo en el primer semestre de vida hasta el más alto en el cuarto semestre. Mientras que en los niños del área rural la prevalencia es nula o muy baja en el primer año de vida, la infección aparece en el segundo año y tiende a aumentar -- con la edad. No se han encontrado diferencias estadísticas -- en cuanto a sexo. (26, 42).

Un estudio llevado a cabo en la India puso de manifiesto que la Cryptosporidiosis era más frecuente en niños menores -- de seis meses. También se observó que la frecuencia de -- -- Cryptosporidium sp. es más marcada en niños a los cuales se -- les ha administrado algún antibiótico en quienes se favorece la colonización por el parásito y por consiguiente los episodios de diarrea. (24)

1.8. VARIACION ESTACIONAL.

Se ha observado que los oocistos comienzan a aparecer -- con más frecuencia de marzo a septiembre, lo que podría estar relacionado con el inicio de la época lluviosa y húmeda. (42)

Por medio de otros estudios llevados a cabo se ha visto una marcada variación estacional entre la población rural en los meses de junio y julio. (26, 42)

1.9. PAPEL DE LOS ANIMALES

Los primeros estudios sobre diarrea en terneros aparecieron en la década de 1970 en diversos lugares del mundo. (26) - En algunos casos se encontraron otros agentes etiológicos asociados como Rotavirus y Escherichia coli enterotoxigénica oscureciendo el significado clínico y patológico de - - - - - Cryptosporidium sp.

En otros casos el Cryptosporidium sp. apareció como único agente, permitiendo postular su papel como agente causal en la diarrea. (1)

La infección en terneros se manifiesta como diarrea moderada o severa con evacuaciones acuosas de color amarillento que luego se tornan pastosas y mucosas. A menudo la diarrea se acompaña de fiebre, deshidratación y debilitamiento. La infección puede presentarse en terneros de un día de nacidos con mínima excreción de oocistos que aumenta alrededor del doceavo día post-inoculación. (34, 38, 42)

El diagnóstico en este caso se hace por hallazgo del parásito en el intestino o en las heces. (19, 34, 38, 42)

Se pueden observar los diferentes estadios en el borde de las microvellosidades del intestino delgado y grueso u oocisto en frotis de heces coloreados con Giemsa o concentrados por flotación. (19, 42)

El Cryptosporidium sp. también ha sido reportado en pavos, pollos y pavorreales, en estas aves se presenta insuficiencia respiratoria, tos, estornudo y secreción oculonasal. En el pavo el parásito puede invadir tráquea y bronquios con una mortalidad y morbilidad del 20% y 30% respectivamente.

1.10. DIAGNOSTICO

Inicialmente el diagnóstico se basó en la biopsia intestinal. Sin embargo la excreción de abundantes oocistos en heces facilita enormemente al diagnóstico que se basa en la visualización en fresco, en preparaciones fijadas con formalina, PVA-Schaduin, o alcohol metílico, esta última después de teñir con colorante de Giemsa. (42)

En frotis coloreados con Romanowsky (Giemsa, Wright, - - Leishman), los oocistos de Cryptosporidium sp. aparecen como estructuras ovoides de tamaño uniforme, que con Giemsa se tiñen débilmente de azul o violáceo presentando corpúsculos internos rojizos o púrpura más fuertemente teñidos. En la actualidad se han desarrollado técnicas de tinción más ventajosas que la preparación en fresco o con Giemsa, la tinción de Safranina-Azul en metileno, la tinción de Ziehl-Neelsen modificada en frío, anaranjado de acridina, auramina-rodamina, -- etc. (2, 3, 5, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 22, 25, 26, 27, 28, 32, 41, 42, 44).

1.11. SEROLOGIA

Se ha utilizado la técnica de inmunofluorescencia indirecta para demostrar anticuerpos específicos contra el - - - - - Cryptosporidium sp., encontrándose oocistos adheridos al borde de las células epiteliales, en varios animales.

Algunos investigadores demostraron anticuerpos circulantes en humanos saludables que se habían recuperado de - - - - - Cryptosporidiosis persistente y pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

La prueba tiene gran sensibilidad y especificidad y junto con otras podrían ayudar en el diagnóstico de infecciones aparentes o en estudios epidemiológicos en humanos y animales. (37, 40, 42).

1.12. TRATAMIENTO

Se han probado muchos medicamentos contra la - - - - - Cryptosporidiosis en animales sin resultado alentador.

En personas cuya diarrea se torna persistente el único tratamiento es la terapia de hidratación y mantenimiento con solución de glucosa y electrolitos administrada generalmente por vía oral.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones intestinales constituyen grandes y graves problemas médicos y de salud pública en los países en desarrollo particularmente en regiones tropicales. (41)

Uno de los parásitos que está adquiriendo importancia en los últimos años es Cryptosporidium, la atención hacia este parásito antes desconocido fué en el año de 1976 al hallarse en una niña inmunocompetente con diarrea severa. (7)

Posteriormente se describieron infecciones en sujetos inmunodeficientes y farmaco-dependientes y más recientemente se han descrito infecciones causadas por Cryptosporidium sp. en homosexuales que padecen el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. (41)

A partir de 1976 se notificaron casos de infecciones por Cryptosporidium sp. en niños y adultos saludables y posteriormente se informó de la presencia de ooquistes del parásito tanto en niños como en adultos diarreicos inmunológicamente sanos en Australia. (41)

A pesar de esto no se sabe de estudios epidemiológicos sobre la frecuencia y prevalencia del parásito en la pobla-

Debido a esta serie de estudios que se están llevando a -
cabo en diferentes partes del mundo es necesario el estudio de
este parásito en nuestro país. (41)

4). HIPOTESIS

En nuestro país un cierto porcentaje de diarreas son de origen desconocido; es posible que algunas de estas diarreas sean causadas por Cryptosporidium sp. debido al efecto mecánico que ejercen las formas parasíticas de éste durante su desarrollo, en el sitio de colonización, pues se ha comprobado que desplazan y alteran la arquitectura del borde de cepillo.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1). Material

5.1.1.). Reactivos.

- Cloruro de sodio Q.P.
- Eter etílico comercial
- Yodo cristaloido
- Yoduro de potasio
- Sulfato de Zinc
- Sacarosa
- Metanol
- Fucsina básica colorante
- Alcohol etílico
- Verde de malaquita
- Colorante de Giemsa concentrado
- Colorante de safranina en polvo
- Colorante de azul de metileno en polvo
- Alcohol etílico 95°
- Acido peryódico
- Reactivo de Schiff
- Fucsina básica
- Acido clorhídrico (Merck)

- Metasulfito de sodio anhidro
- Carbón animal.

5.1.2). Equipo.

- Centrifugación clínica con camisa para tubos de 13 x 100 mm modelo HL-SII - 23555837
- Microscopio compuesto Carl Zeiss Modelo 164023-9901

5.1.3). Material

- Vasos de precipitado de vidrio de 1000 ml.
- Pipeta graduada de 10 ml.
- Portaobjetos de 25 x 75 mm.
- Cubreobjetos de 22 x 22 mm.
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.
- Gasa cortada en cuadros de aproximadamente 15 cm. de lado
- Aplicadores de madera
- Gradilla
- Embudos de plástico de 75 mm de diámetro
- Abatelenguas
- Tapones de hule
- Densímetro graduado a 1.100° a 1.200° Baumé.

5.1.4.). Material biológico

- Materia fecal

5.2. Método

Se procesaron 527 muestras de materia fecal colectadas en el centro de desarrollo infantil "Margarita Salazar de Erro" utilizando los siguientes Métodos y Técnicas.

5.2.1.). Método de Ritchie o Método de Formol-Eter.

Se desmenuzan aproximadamente 20 g de heces ocupando un abatelenguas, se añaden 30 ml de solución salina, y se homogeneiza con el mismo aplicador. Se filtran alrededor de 10 ml. de la suspensión por medio de un embudo, al cual se le ha puesto un fragmento de gasa, recolectando el filtrado en tubos de ensaye. Se centrifugan las muestras a 2500 rpm durante 1 minuto, se desecha el sobrenadante, teniendo cuidado que en el tubo quede de 1 a 2 ml de sedimento, a éste se le añaden aproximadamente 10 ml de formol al 10%, se mezcla y en seguida se le añaden de 3 a 5 ml de éter, se tapa el tubo y se agita fuertemente durante 5 minutos, se quita el tapón con cuidado, se centrifuga a 1500 rpm durante 1 minuto y aquí se obtienen cuatro capas: una capa de éter, un tapón de restos fecales, una capa de formol y el sedimento.

El tapón de restos fecales se desprende de las paredes del tubo mediante un movimiento circular con un aplicador de madera, se decantan cuidadosamente las tres capas superiores y se evita que caiga el sedimento. Se mezcla el sedimento res--

tante en una pequeña cantidad de líquido que resbala por las paredes del tubo y se hacen preparaciones con lugol y solución salina. El resto de la muestra que se encuentra en el recipiente (copropax) se cubre bien con formol al 10% y se tapa perfectamente, para evitar desecación de la muestra y pueda ser utilizada en estudios posteriores.

5.2.2. Método de Flotación de Faust

Se prepara una suspensión de materia fecal en solución salina formalinizada al 10% (proporción 1:10), se filtran alrededor de 10 ml de la solución por medio de un embudo al cual se le coloca un fragmento de gasa, recolectando el filtrado en los tubos, se centrifuga a 1500 rpm durante 1 min. y se tira el sobrenadante y se repite el lavado hasta que éste esté claro; se agrega al último sedimento 1 ml de reactivo de Sulfato de Cinc, se centrifuga a 1500 rpm durante 1 minuto, se agrega cuidadosamente por un lado, reactivo de sulfato de cinc, hasta levantar el menisco y se coloca un cubreobjetos, éste se coloca sobre un portaobjetos al cual se le pone una gota de lugol, se observa al microscopio (10 X) para identificar quistes, huevecillos o estructuras de los diferentes parásitos intestinales.

5.2.3). Método de flotación con solución de sacarosa

Se prepara una suspensión de materia fecal en solución salina formalinizada al 10%, se filtra alrededor de 10 ml de la solución por medio de un embudo al cual se le coloca un fragmento de gasa, recolectando el filtrado en los tubos se centrifuga a 1500 rpm durante 3 minutos, se tira el sobrenadante y se repite el lavado hasta que esté claro, se separa el formol al 10% por decantación, al sedimento se le agrega solución de Sheather's hasta dos terceras partes del tubo, se agita vigorosamente, se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos, posteriormente por medio de una jeringa colocada sobre las paredes del tubo se agrega cuidadosamente más solución de Sheather's hasta subir el menisco, se coloca un cubreobjetos y se deja reposar por diez minutos aproximadamente, luego éste se coloca sobre el portaobjetos al cual se le ha puesto una gota de lugol previamente, y se observa en el microscopio de contraste de fases.

5.2.4.). Método para la tinción de Ziehl-Neelsen (Modificado en frío)

Se hace un frotis de cada muestra de la siguiente manera: se coloca una gota del sedimento obtenido del procesamiento de la muestra por la técnica de Ritchie en un portaobjetos, se deja secar a temperatura ambiente, posteriormente se sumerge por 5 minutos en alcohol metílico a 4°C con ello se -

consigue la fijación del frotis, se tinte con carbol fucsina - durante 20 minutos sin calentar, se lava con agua corriente - durante 2 minutos, se decolora con alcohol ácido por 10 segundos, se lava con agua de la llave, se contrasta con verde de malaquita al 5% durante 5 minutos, se lava nuevamente con - - agua y se deja secar a temperatura ambiente, se observa al microscopio (40X y 100X).

5.2.5). Método para la tinción de Giemsa

Se hace un frotis delgado de la muestra de heces fecales se sumerge en la solución de Giemsa (1:9) y se deja por un -- tiempo de 30 minutos, se lava la preparación con bastante - - agua hasta que el frotis toma un color azul-violáceo, se deja secar a temperatura ambiente y se observa al microscopio. (40X y 100X).

5.2.6.). Método para la tinción de Safranina - Azul de Metileno

Se hace un frotis de la muestra de heces fecales, se cubre con colorante de safranina al 1% en alcohol y se calienta, a emisión de vapores durante un minuto, se lava con agua de - la llave, se decolora con alcohol ácido por 30 segundos, se - lava con agua de la llave y se cubre con azul de metileno por un minuto, finalmente se lava con agua de la llave y se deja-

secar a temperatura ambiente, se observa al microscopio (40X- y 100X).

5.2.7). Método para la tinción de ácido peryódico de Schiff o PAS.

Se hace un frotis delgado de la muestra de heces fecales, se sumerge en ácido peryódico durante 5 minutos, enseguida se sumerge en el reactivo de Schiff (fucsina sulfurosa filtrada, por un tiempo de 20 minutos, se lava con agua de la llave, se sumerge en agua sulfurosa por unos segundos, se lava con agua de la llave y se deja secar a temperatura ambiente, se observa al microscopio. (40X y 100X).

RESULTADOS

La población muestreada en esta investigación consistió de 192 individuos, de los cuales 30 fueron adultos y 162 niños, se recolectaron 547 muestras fecales en total (tabla # 1).

Al realizar el estudio macroscópico de las 547 muestras, 25 presentaron consistencia diarreica. (tabla # 2).

En el centro escolar muestreado, la población infantil - estaba dividida por salas de acuerdo a la edad de los niños: - de 8 meses a 1 año estaban en la sala de lactantes, con 38 niños en total, de los cuales 17 eran niños y 21 niñas. En la sala de maternales se encontraban 76 niños de 2 a 3 años de edad, 34 eran niños y 42 niñas. En la sala de preescolares - los niños presentaban entre 4 y 6 años, 20 eran niños y 28 niñas en total eran 48. Y el personal adulto que estuvo constituido por 30 personas del sexo femenino. (tabla # 3).

Los métodos de concentración utilizados en este estudio, fueron el de sedimentación de Ritchie y el de flotación de -- Faust, para efectuar la comparación de estos métodos en cuanto a la mejor recuperación de estructuras parasitarias se empleó un método estadístico. (tabla # 4). Se tomaron 35 muestras que presentaron parásitos, se efectuó el recuento de es-

estructuras por campo (10X) (quistes y huevecillos). Se calculó la media y desviación estandar para cada método. Se estimó una hipótesis nula $H_0: \mu_1 = \mu_2$ la cual significa que las medias son iguales, o sea que los dos métodos tienen la misma eficacia. Y una hipótesis alterna $H: \mu_1 \neq \mu_2$ significa que las medias son diferentes o sea que uno de los dos métodos es mejor que el otro. Se calculó el error de estimación $Z = \bar{x} - \mu_0 / \sigma / \sqrt{n}$. Los cálculos antes mencionados, nos sirven para fijar un intervalo de confianza del 95%.

Para poder representar gráficamente el intervalo de confianza se calcularon los grados de libertad ($gl = n-1$) en tablas establecidas (fig. 1). Con este método se puso de manifiesto que el método de Ritchie es mejor, ya que como se observa en la tabla # 4 el número de estructuras recuperadas por campo es mayor, por lo cual existe un rango de confiabilidad mayor como método de diagnóstico.

Con los métodos de concentración utilizados se recuperaron: quistes de Endolimax nana en 11 individuos, al relacionar éstos con la población total muestreada (192) se obtuvo una frecuencia de 5.72%, Giardia lamblia con 5.21%, - - - - Entamoeba histolytica con 2.01%, Cryptosporidium sp. con 2.0%, Isospora belli 1.5%, Trichuris trichiura 0.5% (tabla # 5).

En la tabla # 6 se puede observar el histograma de frecuencia para los parásitos recuperados en este estudio, - -

siendo el más prevalente Endolimax nana y el más escaso - - -
Trichuris trichiura. También podemos observar la presencia -
de asociación de parásitos como: Endolimax nana y - - - - -
Entamoeba histolytica con una frecuencia aproximada a 1.5% - -
Isospora belli con Ascaris lumbricoides con 1.0% de frecuen-
cia y Ascaris lumbricoides con Trichuris trichiura con 0.5% -
de frecuencia.

Para la confirmación de la presencia de oocistos de - - -
Cryptosporidium sp. es necesario el uso de técnicas de tin- -
ción. En esta investigación se utilizaron: la tinción de --
Giemsa, Safranina - Azul de metileno y Ziehl - Neelsen modifi-
cada.

El procedimiento seguido fué el siguiente, de las 547 --
muestras procesadas por concentración, se escogieron aquellas
que presentaban estructuras menores a 10 micras, entre éstas-
estaban las que presentaron quistes de Endolimax nana, quistes
de Entamoeba histolytica y levaduras, estas últimas te- -
niendo mayor preferencia por la similitud de morfología a los
oocistos de Cryptosporidium sp., se tñieron con cada una de -
las técnicas y se observaron con objetivo de inmersión, obteni-
niendo cuatro frotis con estructuras correspondientes a los -
oocistos de Cryptosporidium sp., confirmando estas observacio-
nes con patrones obtenidos de estudios anteriores y mediante

el método de concentración de sacarosa (Sheather's), observando éstas con el microscopio de inmunofluorescencia, en la - - cual se observaron estructuras refringentes, ovoides de tamaño uniforme. (Tabla 7) (Fig. 5)

Las cuatro muestras que resultaron positivas fueron de - niños, cuyas edades se encontraban entre 8 meses y 4 años y - de los cuales 3 eran niñas y 1 niño. (tabla # 8).

RESULTADOS

TABLA 1

Población estudiada para la búsqueda de Cryptosporidium sp. en una guardería del Instituto Politécnico Nacional, México, 1986.

Número de individuos muestreados	Número de muestras colectadas
30 adultos	90
162 niños	457
Total = 192	547

TABLA 2

Relación del número de muestras que presentaron diarrea durante el muestreo en el Centro de Desarrollo Infantil del Instituto Politécnico Nacional.

Número de Individuos	M U E S T R A			Total
	1a.	2a.	3a.	
2	X	X	X	6
2	X	X		4
15	X			<u>15</u>
				25

TABLA 3

Población estudiada por grupo de edad y sexo en la guardería del Instituto Politécnico Nacional, México, 1986.

Grupo	Edad	S E X O		Total Personas
		Mascu- no	Femeni- no	
Lactantes	8 meses 1 año	17	21	38
Maternales	2 años- 3 años	34	42	76
Preescolares	4 años- 6 años	20	28	48
Adultos	20 años- 34 años	--	30	<u>30</u>
				192

TABLA 4

Comparación del método de sedimentación de Ritchie y el método de flotación de Faust, en base al número de Parásitos y comensales recuperados por campo.

Muestra No.	Método de Flotación de Faust	Método de sedimentación de Ritchie
	Número de estructuras por campo	10 X
1	2	4
2	5	8
3	3	5
4	10	13
5	10	12
6	1	4
7	6	8
8	6	7
9	12	15
10	3	5
11	15	17
12	4	6
13	4	6
14	7	9
15	11	14
16	16	18
17	4	5
18	3	5
19	2	4
20	7	9
21	6	8
22	5	8
23	3	4
24	2	5
25	3	4
26	1	3
27	2	5
28	9	12
29	5	7
30	2	2
31	5	8
32	7	9
33	2	3
34	7	8
35	9	14

CALCULOS PARA EL METODO DE FLOTACION DE FAUST

CALCULOS:

$$n = 35$$

$$\bar{x} = 5.68$$

$$\sigma = 3.74$$

$$\sigma^2 = 1.93$$

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\mu_0 = 6.7$$

$$z = \frac{\bar{x} - \mu_0}{\sigma / \sqrt{n}}$$

$$z = \frac{5.68 - 6.7}{3.74 / \sqrt{35}} = -1.02 = -1.61$$

Intervalo de Confianza 95%

$$P\left(\bar{x} - z_{1 - \frac{\alpha}{2}} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{x} + z_{1 - \frac{\alpha}{2}} \frac{\sigma}{\sqrt{n}}\right) = 1 - \alpha$$

$$z = 1 - \frac{\alpha}{2}$$

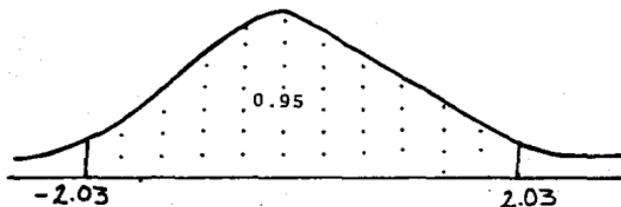
$$Z = 1 - \frac{0.05}{2} = 0.975 \quad \text{Valor consultado en tablas} = 1.960$$

$$P \left(5.68 - 1.96 \frac{3.74}{\sqrt{35}} < \mu < 5.68 + 1.96 \frac{3.74}{\sqrt{35}} \right) = 1 - \alpha$$

$$P (3.09 < \mu < 4.81) = 1 - \alpha$$

$$g.1 = n - 1$$

$$= 35 - 1 = 34 \quad \text{Valor calculado en tablas} 2.03$$



CALCULOS PARA EL METODO DE SEDIMENTACION DE RITCHIE

$$n = 35$$

$$\bar{x} = 7.85$$

$$\sigma = 3.9$$

$$\sigma^2 = 1.98$$

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$\alpha = 0.05$$

$$\mu_0 \geq 6.7$$

$$Z = \frac{\bar{X} - \mu_0}{\sigma / \sqrt{n}}$$

$$Z = \frac{7.85 - 6.7}{3.9 / \sqrt{35}} = \frac{1.15}{0.66} = 1.74$$

Intervalo de Confianza 95%

$$P \left(\bar{X} - z_{1-\frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + z_{1-\frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) = 1 - \alpha$$

$$Z = 1 - \frac{\alpha}{2}$$

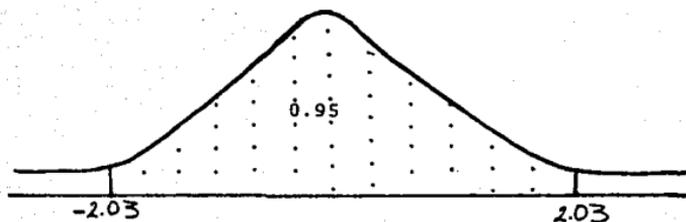
$$Z = 1 - \frac{0.05}{2}$$

$$Z = 1 - \frac{0.05}{2} = 0.975 \quad \text{Valor consultado en tablas 1.960}$$

$$P \left(7.85 - 1.96 \cdot \frac{3.9}{\sqrt{35}} < \mu < 7.85 + 1.96 \cdot \frac{3.9}{\sqrt{35}} \right) = 1 - \alpha$$

$$P (5.25 < \mu < 10.47) = 1 - \alpha$$

$$g.l = n - 1 \quad 35 - 1 = 34 \quad \text{Valor Calculado en tablas 2.03}$$



- H_0 = No hay diferencia significativa entre los métodos
 H_1 = Si hay diferencia significativa entre los métodos.

Al ocupar el método estadístico anterior, se constato - que el método de sedimentación de Ritchie es más eficaz pues tiene un intervalo de confianza mayor o más amplio que el método de Flotación de Faust, por lo tanto la hipótesis alterna es la aceptable, y la hipótesis nula se rechaza.

TABLA 5

Frecuencia de los parásitos encontrados en la población del Centro de Desarrollo Infantil del Instituto Politécnico Nacional, México 1986.

Número total de individuos que presentaron parásitos.

	Agente	Frecuencia
11	<u>Endolimax nana</u>	5.72%
10	<u>Giardia lamblia</u>	5.21%
4	<u>Entamoeba histolytica</u>	2.08%
4	<u>Cryptosporidium sp.</u>	2.08%
3	<u>Isospora belli</u>	1.5 %
2	<u>Ascaris lumbricoides</u>	1.0 %
1	<u>Trichuris trichiura</u>	0.52%
<hr/> 35		<hr/> 18.11%

La frecuencia observada en esta tabla es con relación al número total de individuos muestreados (192).

TABLA 6

Frecuencia de protozoarios y helmintos recuperados mediante - los métodos de flotación de Faust y método de sedimentación - de Ritchie de la población de la guardería del Instituto Politécnico Nacional, México 1986.

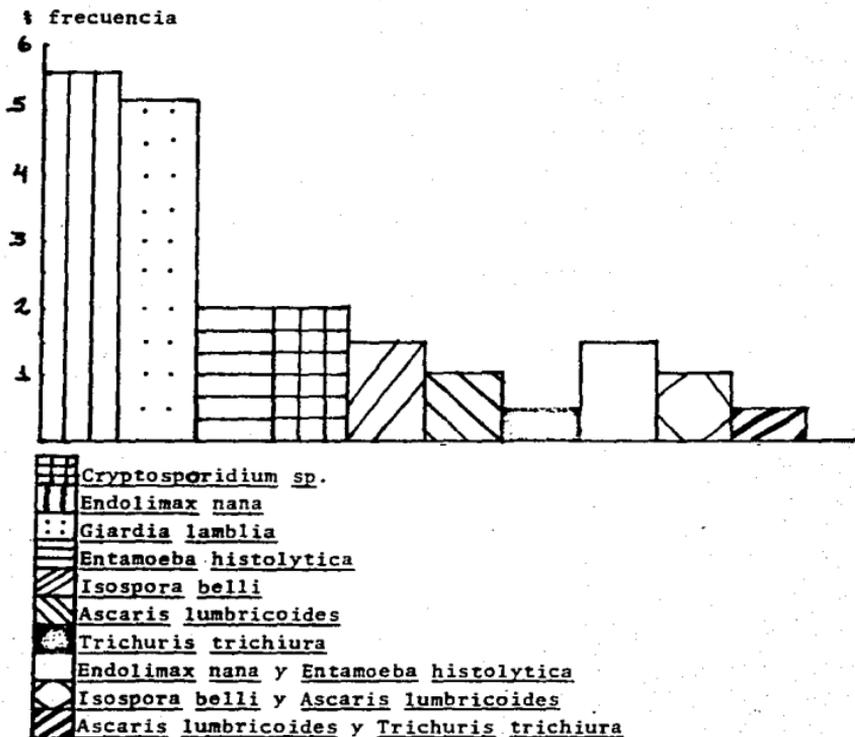


TABLA 7

Confirmación de la presencia de oocistos de Cryptosporidium sp. mediante las técnicas de tinción utilizadas en este estudio.

Número de muestras totales.	Muestras con estructuras menores a 10 micras.	Número de frotis teñidos	Frotis	
			Pos.	Neg.
547	126	126	4	122

NOTA: En estructuras menores de 10 micras se incluyen: Quistes de *Endolimax nana*, quistes de *Entamoeba histolytica* y levaduras.

INTERPRETACION DE LAS TECNICAS DE TINCION UTILIZADAS:

- a). Safranina - Azul de metileno
- b). Ziehl - Neelsen (modificada en frío)
- c). Giemsa.

FIGURA 2



- A). Ooquistes de Cryptosporidium sp., representación de una preparación coloreada con Safranina - Azul de metileno, en donde se observan estructuras de color naranja, ovoides que contrastan con un fondo azul.

Aumento final 100X.

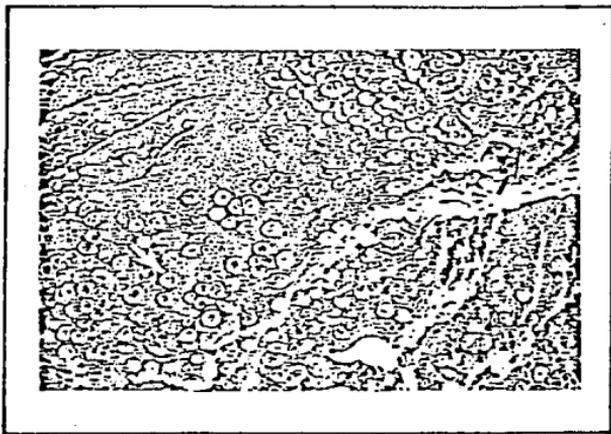
FIGURA 3



- B). Ooquistes de Cryptosporidium sp., Representación de una preparación coloreada con Ziehl - Neelsen modificada, se observan estructuras fuertemente teñidas de rojo, correspondientes a ooquistes ácido resistentes, contrastando con un fondo verde.

Aumento final 100X.

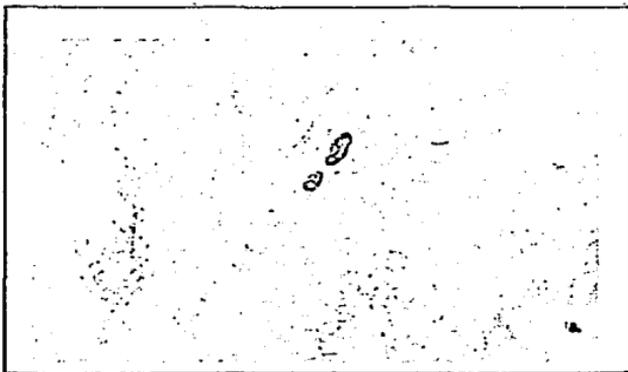
FIGURA 4



C). Ooquistes de Cryptosporidium sp., Representación de una preparación coloreada con Giemsa, en donde se observan como estructuras ovoides, de tamaño uniforme, adoptando una morfología de huecos-vacíos con cuerpecillos internos de color rojizo o café.

Aumento final 100X.

FIGURA 5



- D) Ooquistes de Cryptosporidium sp., Representación de una preparación utilizando el método de flotación con sacarosa o Sheater's para la confirmación de las estructuras, adoptando una morfología parecida a la de levaduras pero diferenciándose de ellas por ser fluorescentes.

Preparación observada en Microscopio de fluorescencia 40X.

TABLA 8

Presencia de los oocistos de Cryptosporidium sp., por edad y sexo en la población estudiada.

Individuo	Edad	Sexo	Muestra Número
1	8 meses	Femenino	Primera
2	1 año 2 meses	Femenino	Segunda
3	3 años	Masculino	Primera
4	4 años	Femenino	Tercera

DISCUSION DE RESULTADOS

Con base en los resultados anteriormente expuestos, vemos registrada una cifra de 192 individuos muestreados de los cuales se recolectaron 547 muestras fecales, esta cifra no corresponde a la esperada ya que para un examen coproparasitológico se requieren un mínimo de tres muestras, si se efectúa el cálculo, la cantidad de muestras debió ser de 574, esto -- fué debido a que no todos proporcionaron las tres muestras -- que se les pidieron.

De las muestras colectadas 25 resultaron con consistencia diarréica, un porcentaje de este síntoma gastrointestinal se debe principalmente a la alta prevalencia de parásitos intestinales en países en vías de desarrollo como México y por lo general se halla en relación directa con las condiciones sanitarias y ambientales en que se desarrollan los grupos de población, además de los malos hábitos higiénicos y las dietas deficientes que los hacen más susceptibles a la infección, permitiendo que el parásito sobreviva, se multiplique en el organismo y produzca manifestaciones clínicas diversas. (1)

Al ocupar los métodos de concentración de Faust y Ritchie. Se observó ventaja en cuanto a la recuperación de estructuras parasitarias por el método de Ritchie.

Varios autores mencionan algunas ventajas que tiene el método de Ritchie sobre el método de Flotación de Faust lo cual se puso de manifiesto en este trabajo de investigación. Fué posible comprobar que realmente el método de sedimentación es más eficaz que el de flotación. Esto se notó durante la práctica ya que con método de Ritchie se logró la recuperación de mayor número de estructuras que con el método de flotación.

Por otro lado el método de flotación tiene como limitantes que no oculta el olor de la materia fecal utiliza una solución hipertónica, a la cual se le debe checar la densidad cada ocasión que se utilice para el procesamiento de las muestras, distorsiona o destruye los huevecillos o quistes de parásitos y con este método las muestras procesadas deben de leerse rápido ya que en muchas ocasiones los huevecillos pesados tienden a depositarse en el fondo del tubo obteniéndose entonces un diagnóstico falso. Otros autores han reportado que el método de flotación no detecta huevecillos operculados o larvas de nemátodos. (22)

Así pues en varios reportes el método de flotación de Faust ha sido descartado como método de rutina y sustituido por el método de sedimentación de Ritchie.

Al procesar las muestras para este estudio encontramos -

varios parásitos (comensales y patógenos) en la población del Centro de Desarrollo Infantil. En la tabla 5 se aprecia que el comensal Endolimax nana, fué el más alto en cuanto a frecuencia 5.72%. A menudo se observan entre los componentes de cualquier sector urbano o rural, algunas especies de protozoos comensales tales como el mencionado, que tiene un ciclo de vida igual al de Entamoeba histolytica y Giardia lamblia, su presencia en el intestino de la población adulta estudiada sugiere que los hábitos higiénicos están influyendo para que éstos prevalezcan ya que como sabemos las protozoosis incluyendo, la amebiasis invasora y giardiasis, son transmitidas por fecalismo.

La mayoría de los reportes de giardiasis en nuestro país oscilan con cifras que van desde un 10% a un 20% de frecuencia en la población en general, aunque se han encontrado cifras mayores como la reportada por Robledo y cols. (17) en Xochimilco, D. F. quienes efectuaron un estudio en lactantes aparentemente sanos reportando un 66.6% de los mismos infectados por Giardia lamblia. Otro trabajo efectuado por Escobar y Cols. (17) reportó un 57.2% en la guardería infantil del Hospital General en México D. F. Mientras que la frecuencia encontrada en nuestro estudio fué de 5.20% registrándose en la población infantil este porcentaje debe considerarse importante por la pequeña población muestreada. Pues no han sido infrecuentes las epidemias de origen hídrico por Giardia lamblia

porque la cantidad de cloro usado normalmente, no es suficiente para destruir los quistes de este protozoario.

Por otro lado Entamoeba histolytica fué el tercer parásito en frecuencia encontrado en nuestro estudio con 2.08%. Entre los estudios revisados encontramos que la frecuencia más alta reportada por González y Cols. (17) fué de 55.5%. Este trabajo se realizó en Mixquic, D.F., donde predominan condiciones socioeconómicas bajas, en cuanto a la frecuencia más baja la obtenida por Tay y Navarrete (17) en escolares de Oaxtepec, Guerrero, con cifras de 0.6%. Un promedio de diversas encuestas realizadas en nuestro país ponen en evidencia que dicho protozoario se encuentra en un 15.9% de la población en general, no sin tener en cuenta que en algunos lugares puede ser muy alta o muy baja dependiendo de diversos factores tales como los buenos hábitos higiénicos, aseo personal, nivel socioeconómico, etc., En el estudio realizado en el Centro de Desarrollo Infantil se considera la presencia de este parásito bajo, el porcentaje reportado en este estudio corresponde únicamente a la población adulta, no descartando la posibilidad de que si no se toman medidas de prevención, podría en un corto tiempo encontrarse en la población infantil. Otro parásito encontrado en la población estudiada fué - - - - - Isospora belli con una frecuencia de 1.56%. No existen reportes acerca de la prevalencia de este parásito en nuestro país, pero llama la atención el hecho de encontrarlo en un porcenta

je relativamente alto. Se ha descrito como agente causal de diarrea, dolor abdominal, fiebre y cansancio que cura espontáneamente. Este coccidio al igual que Isoospora hominis, aunque raros en humanos, tienen una amplia distribución.

Por otro lado las geohelminthiasis se adquieren por la ingestión de huevos larvados procedentes del suelo contaminado con heces humanas, pero no de una persona a otra, el embrión de Ascaris lumbricoides y Trichuris trichiura, requieren de dos a tres semanas para completar su desarrollo y volverse infectivos, las verduras, ensaladas, fresas y otros alimentos regados y lavados con aguas negras y que se comen crudos pueden servir de vehículos para la transmisión de estos parásitos. La tierra contaminada acarreada a distancias enormes en el calzado llegan hasta los comedores y sitios de recreación infantil y de esta manera es la infección; en los preescolares es frecuente la parasitosis múltiple y masiva, resultante de ingerir la tierra, al completar su ciclo biológico, las hembras grávidas descargan sus huevecillos que salen con las heces del sujeto parasitado. (9) De la parasitación por Ascaris lumbricoides se han reportado cifras de 93% en el estado de Guerrero y de 43% a 70% en Tabasco, Veracruz, Chiapas y Morelos; (17) y en nuestro estudio este parásito se registró con 1.04% de frecuencia, lo cual sugiere, que tal vez éste no sea el clima adecuado para el desarrollo de este parási

to, ya que la frecuencia en nuestro estudio es relativamente baja en comparación con los lugares de clima caluroso y húmedo como los reportados arriba.

En cuanto a Trichuris trichiura en algunos trabajos se ha registrado con frecuencia muy semejante a la de ascariasis. Se ha precisado que en Guerrero y Veracruz las cifras más altas van de 84% a 85% de las muestras de las poblaciones estudiadas. Se deduce entonces que en regiones típicamente tropicales la prevalencia de la tricocefalosis es mayor que la de ascariasis. En nuestro estudio se registró con 0.52% de frecuencia, al igual que la ascariasis podemos decir que este clima no es favorable para el parásito pues la frecuencia es muy baja en comparación con los lugares de clima tropical. (23)

Es común encontrar en la población en general casos con asociación de parásitos, o parásitos con bacterias causando síntomas gastrointestinales tales como la diarrea que muchas veces puede llegar a ser muy grave. Un estudio llevado a cabo en Costa Rica reportó la asociación de Rotavirus con Campylobacter teniendo una frecuencia de 3.0% Campylobacter con Cryptosporidium sp. con 1.1%, Giardia lamblia con Rotavirus con 0.4%, Giardia lamblia con Cryptosporidium sp. 0.4%, Campylobacter con Salmonella 0.2%, Escherichia coli enteropatógena con Cryptosporidium sp. 0.2%, Campylobacter con Cryptosporidium sp. y con Rotavirus con 0.2% de frecuencia. (1)

Por los datos arriba expuestos puede haber desde dos, -- tres o más agentes etiológicos causantes de la diarrea en un solo hospedero. En la investigación llevada a cabo se encontró la asociación del comensal Endolimax nana con - - - - - Entamoeba histolytica siendo su frecuencia de 1.5% en la población adulta, con respecto a la población infantil: también se pudo apreciar asociación de parásitos como podemos observar en la fig. (1). Isospora belli fué encontrada con - - - Ascaris lumbricoides y este último con Trichuris trichiura -- con una frecuencia de 0.52%. Sin embargo en este estudio sólo se buscaron parásitos, por lo que no podemos descartar la posibilidad, de que algunos hayan estado asociados a bacterias.

En nuestro trabajo fué posible con los métodos de concentración seleccionar a las muestras que contenían morfología semejante a las levaduras como posibles candidatas a contener oocistos de Cryptosporidium sp., El número de muestras fué de 126, las cuales se tificaron por tres técnicas de tinción: Giemsa, Ziehl-Neelsen modificado y Safranina-Azul de metileno, en cuanto a la tinción no podemos hablar de mejor o peor, o sensibilidad pues con las tres se logró observar las estructuras correspondientes a los oocistos de Cryptosporidium sp. En algunos artículos (5) hacen comparaciones de las técnicas que pueden ser ocupadas para la identificación de oocistos de Cryptosporidium sp., mencionando las empleadas como excelen-

tes. En estudios publicados hacen énfasis que los oocistos - pueden ser confundidos con levaduras, por presentar la misma morfología y tamaño, en nuestro estudio fué posible la diferenciación de estas estructuras tanto con tinciones como con el método de flotación de Sheather's.

CONCLUSIONES

1. De acuerdo a los resultados obtenidos, el método de sedimentación de Ritchie, fué mejor en cuanto a la recuperación de estructuras parasitarias, que el método de flotación de Faust en este estudio.
2. El método de Flotación de Sacarosa (Método de Sheather's) es buen método de recuperación de oocistos de Cryptosporidium sp. a partir de materia fecal.
3. Las técnicas de tinción utilizadas para la confirmación de la presencia de oocistos de Cryptosporidium sp. resultaron buenas, pues pusieron de manifiesto la presencia de estructuras.
4. La frecuencia de oocistos de Cryptosporidium sp. en este estudio fué de 2.08%, esta frecuencia es importante pues si tomamos en cuenta que el parásito es poco conocido y mediante este estudio se estimó la presencia de él en México, se hace necesario el estudio epidemiológico de la población, abarcando los mecanismos de transmisión para lograr el control y prevención de esta zoonosis.

5. En la población estudiada se observó la presencia de - -
otros parásitos como Entamoeba histolytica, - - - - -
Giardia lamblia, Endolimax nana, Isospora belli, - - -
Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura, importantes -
en el estado de salud de la población estudiada.

6. El estado de salud de la población estudiada en la guar-
dería es bueno, pues en los cuatro individuos que se en-
contraron oocistos de Cryptosporidium sp. no presentaron
síntomas gastrointestinales durante el estudio.

ANEXO

PREPARACION DE SOLUCIONES:

SOLUCION SALINA 0.85%: Pesar 8.5g de cloruro de sodio -- Q.P. y disolver en 1000 ml de agua destilada.

LUGOL PARASITOLOGICO: Solución madre.

Disolver 10 g de yoduro de potasio en 100 ml de agua y en seguida agregar 5 g de yodo, agitando constantemente para que se disuelva la mayor cantidad, posible, se guarda en un frasco ámbar, procurando que todo el exceso de yodo que tenga en el fondo también se vacie en el frasco; esto se hace para que la solución permanezca con la concentración deseada durante mucho tiempo.

Solución de trabajo:

Solución madre de lugol	1 volumen
Agua destilada	1 volumen

Se mezcla la solución madre con el agua destilada y se -- guarda la solución en un gotero ámbar.

FORMALDEHIDO AL 10%: Mezclar 10 ml de formaldehído en -- una probeta o matraz volumétrico de 100 ml y completar el volumen a 100 ml. con agua destilada.

SOLUCION DE SULFATO DE CINCO:

Pesar 350 g de sulfato de cinc, medir en una probeta 1000

ml de agua de la llave. Disolver el sulfato de cinc en el - -
agua de la llave hasta disolución total de la solución y final
mente ajustar la densidad a 1.180.

SOLUCION DE SACAROSA:

Se pesan 500 g de sacarosa, en una probeta medir 320 ml -
de agua, pesar 6.5 g de fenol y fundirlo. En un vaso de preci
pitado de 1000 ml se coloca el agua y se va adicionando poco a
poco sacarosa, con agitación constante, posteriormente se adi
ciona el fenol fundido hasta la completa disolución. Se ajust
ta la densidad de la solución (1.180 g/ml).

ALCOHOL-ACIDO: Medir 97 ml de alcohol etílico 95° y adi
cionar por las paredes 3 ml de ácido clorhídrico, mezclar bien
y guardarlo en un frasco bien cerrado.

CARBOL-FUCSINA: Se pesan 10 g del colorante y se disuel
ven en 10 ml de etanol, por separado se pesan 5 g de fenol y -
se disuelven en 95 ml. de agua destilada, se mezclan perfecta
mente y se guarda en un frasco.

VERDE DE MALAQUITA: Se prepara una solución de alcohol
etílico al 10% y se disuelve con 5g de verde de malaquita.

COLORANTE DE GIEMSA CONCENTRADO:

Se mezclan en una caja de petri 1 ml de colorante de - -
Giemsa concentrado con 9 ml de agua destilada.

SAFRANINA: Se pesan 5 g de colorante de safranina en polvo y se diluyeron en 495 ml de alcohol etílico, se mezclan bien hasta que esté completamente homogéneo y se guarda en un frasco bien cerrado.

AZUL DE METILENO: Se pesan 5 g de colorante azul de metileno y se disolvieron en 495 ml de agua, se homogeniza bien y se guarda en un frasco.

REACTIVO DE SCHIFF: Se pesan 2 g de fucsina básica y se disuelven en 400 ml de agua hirviendo, se deja enfriar a 50°C y se agregan 10 ml de ácido clorhídrico 2N y 4 g de metasulfito de sodio, se deja reposar una noche en la obscuridad y se agrega 1g de carbón animal y se filtra.

AGUA SULFUROSA: Se prepara ácido clorhídrico concentrado 0.1 ML. se pesan 0.2 g de metasulfito de sodio y se miden 50 ml de agua destilada, todos estos reactivos se mezclan y se guardan en un frasco bien cerrado.

DEFINICIONES ESTADISTICAS:

n = tamaño de muestra

\bar{x} = Es llamada media aritmética y es el promedio de las observaciones del grupo, es decir, el valor obtenido sumando -- las observaciones del grupo y dividiendo esta suma por el número de observaciones que hay en el grupo. Se puede denotar como $X_1, X_2, X_3, \dots, X_n$ por:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

S = Desviación típica o standar. Se define como la raíz cuadrada (positiva) de S^2 , que es la varianza.

Su fórmula de cálculo es la siguiente:

$$S = \sqrt{n \sum_{i=1}^n X_i^2 - (\sum_{i=1}^n X_i)^2 / n(n-1)}$$

S^2 = Llamada varianza es una medida de variabilidad, se le denota por lo general por S y su fórmula de definición es pues:

$$S^2 = n \sum_{i=1}^n X_i^2 - (\sum_{i=1}^n X_i)^2 / n(n-1)$$

H_0 = Hipótesis estadística cuya verdad se va a investigar por muestreo. (También es llamada hipótesis de contraste).

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

H_1 = Hipótesis estadística en desacuerdo con la hipótesis contrastada.

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$$

Z = Estadígrafo de Contraste. Variable aleatoria relacionada con la hipótesis de contraste.

$$Z = \bar{X} - \mu_0 / \sigma / \sqrt{n}$$

P = Nivel justo de significancia al cual el valor observado del estadígrafo de contraste sería significativo, esto es, caería precisamente en la región crítica.

$$P(\bar{X} - Z_1 - \frac{\alpha \cdot \sigma}{2\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + Z_1 - \frac{\alpha}{2} \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}) = 1 - \alpha$$

Región crítica: Conjunto de valores del estadígrafo de contraste que lleva a descartar la hipótesis contrastada.

Región de aceptación: Conjunto de valores del estadígrafo de contraste que lleva a aceptar la hipótesis contrastada.

BIBLIOGRAFIA

1. Alvarado A.F.J., Guardo B.C., Galindo E., Méndez T.E., Alvarado G.S., Velásquez J.L., "Frecuencia de microorganismos enteropatógenos aislados en niños con y sin diarrea aguda" Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 42: 6:354-359:1985.
2. Barriga A.G., Cardeña C.V., Estrada P.S., Padierna O.L., Cruz C.G., Ruiz S.D., Gómez C.G., López V.M.A. P., - - "Cryptosporidiosis asociada con SIDA informe de un caso"- Infectología 5:2:2:33-37:1985.
3. Baxby D., Blundell N., "sensitive, Rapid Simple Methods - for detecting Cryptosporidium in faeces" The lancet, - - 11:12:1149:1983.
4. Biagi F., "Enfermedades parasitarias" Ed. La Prensa Médica Mexicana S.A., Segunda ed. México, D.F. 1985, págs. -- 63-75: p.p. 355.
5. Bogaert S.J., Lepage P., Rouvroy D., and Vandepitte J., - "Cryptosporidium spp., a Frequent Cause of Diarrhea in - Central Africa "Jouernal of clinical Microbiology. 11:20: 5:874-876:1984.

6. Botero D., Persistencia de Parasitosis Intestinales en --
America Latina" Bol. of Saint. Panam. 90:1:39-45:1981.
7. Brown H.W. "Parasitología Clínica" 4ta. ed. Ed. Interame-
ricana. México, México 1984.
8. Cabo T.C.R. "Case Records of the Massachusetts General -
Hospital" the New England Journal of Medicine, 313:13 -
805-814:1985.
9. Carrada B.T. "Las parasitosis humanas en México" Bol. -
Med. Infant. Méx. 42:1:73-77:1985.
10. Casemore D.P., Jackson B., "Sporadic Cryptosporidiosis in
Children" The Lancet 9:17:679:1983.
11. Current L.W., D.P.H., Reese C.N., Ernest V.J.D. Ph., - -
M.P.H. and Winstein M.W., M.D., "Human Cryptosporidiosis-
in Immunocompetent and Immunodeficient Persons".
12. Current W.L. and Campbell P.N. "Demonstration of serum anti-
bodies to Cryptosporidium sp. in Normal and Immunodeficient
Humans With Confirmed Infections" 18:1:165-169:1985.
13. Chester W., Laner M.D. and Tapper L.M. "Opportunistic In-
fection Complicating Acquired Immune Deficiency Syndrome"
Medicine, 63:3:155-164:1984.
14. Donald L.P. "Comparison of three collection-preservation-
methods for detection of intestinal parasites" The Journal

of clinica Microbiology, 14:6:656-660:1981.

15. García S.L., Bruckner A.D., Brever C.T., and Shimizu and-Robyn L.C., "Techniques for the recovery and Identification of Cryptosporidium oocyst from stool specimens" Journal of clinical Microbiology 18:1:185-190 1983.
16. González B.C., Reyes M.E., Conde G.C., Calderón J.E. - - "Cryptosporidiosis" Infectología, V:6:140-145:1985.
17. González C., López R., Tay J.: "Frecuencia de parasitosis intestinales en Mixquic., D.F. Medicina 930:599-601 (1983).
18. Golvan J. y Drouhet E., "Técnicas en Parasitología y Mico-
logía" Ed. JIMS, Barcelona España, 1977 págs. 7-85. 391.-
pp.
19. Heine J., J.F.L. Phlenz., Moon H.W. and Woodne G.N. "Ente-
ric Lesions and Diarrhea in Gnotobiotic Calves Mono in-
fect with Cryptosporidium Species" The Journal of Infec-
tions Diseases 150:5:768-775:1984.
20. Horen E. P.W. "Detection of Cryptosporidium, in Human Fe-
cal Specimens" the Journal of parasitology, 69:3:622-624:
1983.
21. Jokipii M.M.A., Hemila M., Jokipii L., "Prospective Study
of adquisition of Cryptosporidium, Giardia lamblia and -
gastrointestinal illness" The lancet 8:31:487-489:1985.

22. Kate F., Kard Faler "Improved Detection of Intestinal parasites" Clinical lab. Medicien, 4:273-276:1984.
23. Lara A.R. "Las Geohelminthiasis en México y Perspectivas de su control" Salud Pública México, 26:573-3-578:1984.
24. Malebrache R., Arnoux E., Guérin J.M., Pierre U.D., Laroche A.C., Péan-Guérin J.M., Pierre U.D., Elie R., Morissset P.H. Spira T., Mandeville R., Drotman P., Seemayer T., Dupuy J.M. "Acquired Immunodeficiency Syndrome with Severe Gastrointestinal Manifestations in Haiti" The Lancet 10:15:873-877:1983.
25. Mata L., Bolaños H., Pizarro D., y Vives M., "Cryptosporidiosis en niños de Costa Rica: Estudio Transversal y Longitudinal" Rev. Biol. Tropo. 32(1): 129-135:1983.
26. Mata L., Vives M., Achi R., Pizarro D., "Aspectos Clínicos Epidemiológicos de la Criptosporidiosis en Costa Rica".
27. Mathan M.M. Tena G., Mathan V.I., Mathene M., Venkatesan S. "Cryptosporidium" and diarrhea, in Southern Indian Children" the Lancet 23:22:1172-1175:1985.
28. McNabb N.J.S., Hensel M.D., Melch F.D., Heijbol H., McKee M.L.G., and Istre R.J., "Comparision of Sedimentation and Flotation Techniques for Identification of Cryptosporidium sp. occyst in large outbreak of Human Disrrhea" --

Journal of Clinical Microbiology, 10:22:4:587-589:1985.

29. Neghme A. y Silva R. "Ecología del Parasitismo en el hombre" Bol. of Sanit Panam 70:313 (1971).
30. Olarie J., "Etiopatogenia de las Diarreas Infecciosas - Progresos en pediatría" Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 42: 1:66:72:1985.
31. Organización Mundial de la Salud. "Infecciones Intestinales por Protozoos y Helminetos" Ser. Inf. Tecc 666, Ginebra Suiza (1981).
32. Pearl M. and Soave R., "Three-Step Atool Examination for Cryptosporidiosis in 10 homosecual Men with Protracted watery Diarrhea" The Journal of Infections diseases 147: 5:825-827:1983.
33. Preston A.H., Dover C., "Cryptosporidium: A common cause of parasitic Diarrhea in otherwise Healthy Individuals" - The Journal of Infections Diseases" 153:2:365-367:1986.
34. Rahaman H.M.S.A., Sanyal S.C., Mahmud A.A.K., Sobhan A., Hossain S.K. Anderson C.B., "Cryptosporidium in Calves - Their Handlers in Bangladesh" The Lancet 7:28:221:1984.
35. Ratman S., Paddok J., McDonalds E., Whitty y D. Jong M., Cooper R., "Occurrence of Cryptosporidium oocyst in fecal Sample Submitted for Clinical Microbiological Examina-

- tion" The Journal of Clinical Microbiology 9:22:3:402-404: 1985.
36. Salazar S.P.M., y De Haro A.I., "Manual de Técnicas para el Diagnóstico Morfológico De la Parasitosis" Ed. Francisco Mendez Cervantes, México, D.F., págs. 4-22, 199 pp.
 37. Tzipori S. and Campbell I., "Prevalence of Cryptosporidium Antibodies in 10 animal Species". Journal of clinical. Microbiology, 14:4:455-456:1981.
 38. Tay J. Navarrete F. "Frecuencia de parasitosis Intestinales de Ometepec., Estado de Guerrero" Medicina 40:200- - 203 (1960).
 39. Tzipori K.W., Angus p., Campbell I., and L.W. Blerihew., - "Diarrhea Due To Cryptosporidium Infection in Artificially Reared Lambs" Journal of Clinical Microbiology, 7:14: 100-105:1981.
 40. Ungar L.P.B., Soave R., Faver R., and Nash E.T., "Enzyme-Immunoassay Detection of Immunocompetente and Immunocompromised persons" The Journal of Infections Diseases - - 153:3:570-578:1986.
 41. Urbina A., Mata L., Pizarro D., "Cryptosporidium en Niños de Costa Rica: Cuadro Clínico, Variación Estacional y Tratamiento" Acta Médica Costarricense 27:191-198:1984.

42. Urbina A., Mata L., Rojas C., "Cryptosporidiosis una - - zoonosis de Reciente Interés" *Adel. Microbiol. Enf. infecc.* 3:159-174:1984.
43. Walfron A.M., S.M. John., pH D., Richter M.j., B.S. Meber-J.D., M.D. McCarthy M.D., B.A. and Hopkins C.C., M.D., - "Cryptosporidiosis" *Am. J. Trop. Hyg* 33(1):24-29:1984.