

870127

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA**

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

6  
2ej

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



BUSQUEDA DE OOCISTOS DE CRYPTOSPORIDIUM EN HECES  
HUMANAS Y DE BECERROS CON SIGNOS Y SINTOMAS  
GASTROINTESTINALES Y SU CORRELACION  
EPIDEMIOLOGICA

---

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

LUCIA LIRA HERRERA

Asesor : Q.F.B. Rosa Ma. Muñoz Saucedo

GUADALAJARA, JAL.

1990

---



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 esta 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.

## I N D I C E

	Págs.
CAPITULO I	INTRODUCCION ..... 1
CAPITULO II	GENERALIDADES..... 3
	a).- Esquema taxonómico..... 6
	b).- Características genéricas y específicas..... 7
CAPITULO III	ANTECEDENTES..... 9
CAPITULO IV	HISTORIA.....11
	4.1 Ciclo de vida y resistencia .....13
	4.2 Epidemiología .....18
	4.3 Inmunidad..... 21
	4.4 Patogenia y curso clínico de la enfermedad..... 22
	4.5 Métodos de diagnóstico..... 29
	4.6 Diagnóstico diferencial..... 33
	4.7 Tratamiento..... 34
	4.8 Profilaxis..... 35
CAPITULO V	MATERIAL Y METODOS.....36
	5.1 Metodología
	5.2 Descripción de la metodología..... 37
	5.3 Criterios de selección de pa- cientes
	5.4 Metodología del muestreo ..... 38
	5.5 Material y reactivos ..... 39
	5.6 Métodos ..... 40
CAPITULO VI	RESULTADOS..... 43
CAPITULO VII	CONCLUSIONES Y DISCUSION..... 49
CAPITULO VIII	BIBLIOGRAFIA..... 52

**CAPITULO I**

**INTRODUCCION**

## I.- INTRODUCCION

Las enfermedades parasitarias ocupan un lugar muy importante sobre todo cuando constituyen un problema de salud pública presentándose generalmente en países con deficiente desarrollo socioeconómico, causando morbilidad y mortalidad significativas en el mundo y particularmente en países con clima tropical y subtropical (11,22).

La importancia del presente estudio radica en que -- Cryptosporidium está adquiriendo cada vez más interés debido al papel que presenta como agente etiológico de diarreas, por su importancia dado su carácter oportunista (18) en personas inmunodeprimidas (13), por el desequilibrio electrolítico que causa en personas con diarrea persistente, todo esto aunado a la resistencia que presenta a diferentes antiparasitarios y antisépticos de mayor uso hospitalario.

En México los pocos casos de Criptosporidiosis que -- han sido reportados se debe a la poca información y a la -- falta de concientización en el Sector Salud para su diagnóstico clínico y/o parasitológico.

Esta enfermedad sólo había sido reportada en animales pero no en el hombre por tanto su mayor importancia era desde el punto de vista veterinario (23) de allí, que este estudio tenga como objetivo la búsqueda de oocistos en nuestro medio en una población humana (personas que presenten algún factor predisponente, cuadro clínico de diarrea o sin síntomas y signos gastrointestinales) y en becerros que presenten o no cuadro clínico de gastroenteritis. En esta investigación los becerros son motivo de estudio ya que son -- la fuente de infección más importante para el hombre.

Cryptosporidium parece ser un patógeno que primordialmente afecta animales jóvenes y niños normales e indivi

duos inmunocomprometidos (8), ha sido estudiado intensivamente desde 1971 como una causa de enfermedad en animales y particularmente de ganado (20), así mismo Cryptosporidium sp ha sido identificado como agente causal de infección gastrointestinal en el hombre y puede ser más prevalente o similar que Pneumocystis carini (40).

La enfermedad puede ser diagnosticada por la demostración de ooquistes en preparaciones especiales de muestras fecales (23).

El sitio más común de encontrar a Cryptosporidium es el tracto intestinal pero en personas con deficiencias inmunológicas se le ha encontrado en faringe, esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, apéndice, colon y recto (27), en casos recientes de infecciones biliares (42) y expectoración (1,25).

Las formas parasitarias en materia fecal pueden obtenerse llevando a cabo el método de Ritchie y la identificación se realiza por medio de tinciones como la de Kin -- youn modificada, el parásito con ésta técnica se tiñe de rojo a diferencia de las levaduras que se tiñen de azul -- verde (23).

**CAPITULO II**

**GENERALIDADES**

## II.- GENERALIDADES

El género Cryptosporidium es un pequeño protozoario que pertenece al Phylum Apicomplexa, Orden Eucoccidiala,-- Suborden Eimeriina, Familia Cryptosporiidae (3,25,31), con 11 especies.

Se encuentra en todo el mundo y puede infectar mamíferos, aves, reptiles incluyendo animales domésticos (3, - 23, 39).

Es un coccídeo parásito que ha estado implicado en enfermedad intestinal primeramente en pacientes inmunosuprimidos (13,14) y de gran importancia económica en animales domésticos (34).

Fue descrito en 1907 por Tyzer quien lo observó en la mucosa gástrica de ratones asintomáticos y especies conocidas se han identificado en cobayos, conejos, perros, - pollos, mono rhesus, borregos, corderos y serpientes (15), el parásito ha sido identificado en otras especies animales como terneras, gatos, potrillos, venados, gansos, pericos y faisanes (2,15), reportándose en la literatura no habersele encontrado a Cryptosporidium huésped definitivo como ocurre en otras coccidias (25).

En humanos se le ha asociado como oportunista en -- personas con deficiencias inmunológicas y nutricionales.-- El primer caso de Criptosporidiosis humana fue informado -- por el Dr. Jhon H. Yardley en 1976 (18). En México el primer caso de infección intestinal por Cryptosporidium fue -- reportado por Barriga y col. en 1985 y fue publicado en la Revista de la Asociación de Infectología.

Cryptosporidium es un protozoario extracitoplasmático e intracelular (39) mide de 2-6 um, el parásito habita el borde de las microvellosidades del epitelio intestinal de animales incluyendo el hombre (2,13,25).



Otras coccidias relacionadas taxonómicamente que infectan al hombre, incluyen Isospora belli y Toxoplasma gondii (15,20,23). Cryptosporidium tiene un ciclo de vida rápido y carece de especificidad de huésped (25,39).

Cryptosporidium tiene características entre las coccidias que infectan vertebrados de sangre caliente, ya que durante diferentes estadios de desarrollo invade solamente el borde de las microvellosidades de las células epiteliales (14) y es considerablemente más pequeño que Isospora hominis e Isospora belli, de quien es fácilmente diferenciable (2, 15,25).

Cryptosporidium es el nuevo protozooario coccidial - que causa diarrea intratable, fatal en individuos inmunocomprometidos, pero enteritidis autolimitada en huéspedes normales, éste parásito es bien conocido para los veterinarios ya que causa diarrea y neumonía, así como infección generalizada en animales de granja (25) y es patógeno para muchos animales jóvenes que generalmente son afectados por otras coccidias (15).

La evidencia de que Cryptosporidium es un patógeno - y no meramente un comensal en el hombre viene de: estudios histológicos en pacientes inmunodeficientes; la ocurrencia de ataques en personas en contacto directo con ganado infectado (20).

Los rasgos de la infección criptosporidial que hacen difícil el reconocimiento son que los oocistos son pequeños (diámetro de 4 um) y son excretados en pequeñas cantidades. Cryptosporidium ha estado asociado con diarrea en varias especies de mamíferos. Los ataques han sido observados más comúnmente entre becerros pero hay reportes de ocurrencia similar entre ovejas y humanos (39).

Produce diarrea en humanos, becerros, cabras inmuno competentes, todos son fuente de infección así como animales de compañía (24).

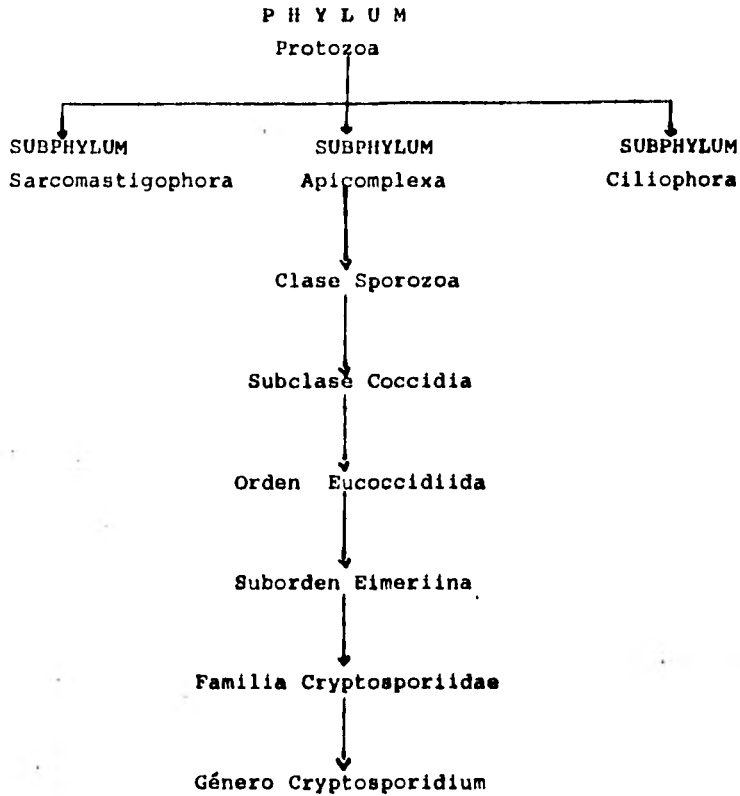
La principal vía de transmisión es la oral-fecal (2, 13,14), ya sea por contacto directo (conductas sexuales aborrrantes) o indirecto mediante agua, alimentos, fomites y otras superficies contaminadas con materia fecal (2,14,15,--20), animales de laboratorio han sido implicados en algunas instancias, otra fuente son las personas infectadas que han viajado reciente y extensivamente a los lugares endémicos. El contacto con personas infectadas particularmente de la misma familia, trabajadores de la salud son otras fuentes de infección común. Importantes reservorios de infección -- pueden ser las personas que siguen excretando oocistos después que los síntomas clínicos han desaparecido o los portadores asintomáticos (12).

Los huéspedes vierten oquistes infectivos en las heces, estos proliferan asexualmente en el nuevo huésped y el parásito ataca por sí mismo las microvellosidades de los enterocitos (23).

La dosis infectiva puede ser pequeña y ha sido calculada en menos de 1,000 oocistos por un investigador (12).

## a).- ESQUEMA TAXONÓMICO

(Según Arredondo G. J. Luis y Fayer R. (3,12)).



b).- Características genéricas y específicas.

Siendo Cryptosporidium igual que la mayoría de las coccidias, un parásito polimórfico presentándose en la biología del mismo las siguientes estructuras: trofozoitos, merozoítos, esquizontes, gametos y oocistos (6), para los fines de este estudio conviene señalar aquellas estructuras con las que el microbiólogo clínico debe estar familiarizado para su diagnóstico parasitológico.

Cryptosporidium es un pequeño protozoario de la clase Sporozoa (4) que mide de 2-6 micras aunque su diámetro puede variar de 3 a 5 micras, y habitar la región microvellosa del epitelio mucoso de variedad de animales y el humano, semeja a las levaduras en tamaño y morfología (25), son ovales y lisos, unos pueden estar sin teñir y otros son púrpura rojizos con 2 vacuolas grandes y uno o dos puntos entre la vacuola y la membrana celular (41). Se han observado dos tipos de oocistos: el liso que se tiñe de rosa y el granular de rojo (25).

Los oocistos de Cryptosporidium en frotis fecales teñidos con el método de Ziehl-Neelsen modificado aparecen como cuerpos redondos densamente teñidos de rojo sobre fondo verde, es discernible una pared gruesa y varias estructuras internas, más de cuatro esporozoítos, un punto excéntrico y vacuola (23). Se acepta como oocistos sólo objetos de tamaño apropiado (3-4 um) con morfología característica, paredes gruesas con puntos excéntricos (remanentes de cigotos) y vacuolas frecuentemente discernibles (23).

Las especies de Cryptosporidium es el mismo protozoario coccidial que causa diarrea intratable fatal en individuos inmunocomprometidos pero enteritidis autolimitada en huéspedes normales. En las especies de esta familia (Cryptosporidiidae) los oocistos tienen una pared gruesa --- (25) y los merozoítos se encuentran libres en su cavidad, de manera que no se forman esporas. Los esquizontes sólo forman ocho merozoítos (15).

Upton y Current concluyen que sólo 2 especies de Cryptosporidium infectan a los mamíferos: C. muris y C. parvum son válidas (12).

1.- Cryptosporidium muris: (12)

Esta especie descrita por Tyzer (1907) es pequeña y se localiza sobre la capa cuticular del epitelio de los vellos del intestino delgado del ratón. El trofozoito se encuentra tan firmemente adherido a las células del huésped que se proyecta o se insinúa en su interior. El esquizonte tiene 5 micras de diámetro y el gametocito macho-3 micras. Los oocistos miden aproximadamente sólo 4 por 3-micras.

2.- Cryptosporidium vulpis: (12)

Esta especie fue descrita por Wetzal (1938) en el zorro. Sus oocistos miden de 13 a 15 micras por 8 a 9 micras.

3.- Cryptosporidium parvum: (12)

Se le encuentra en el conejo, aves y ganado vacuno, los gametocitos miden 3 micras y los esquizontes 5 micras, es la especie que se ha encontrado en pacientes -- con SIDA.

4.- Cryptosporidium baileyi: (12)

Fue descrito por Current, Upton y Haynes en -- 1986 en pollos y pájaros.

**CAPITULO III**

**ANTECEDENTES**

## III.- ANTECEDENTES

En la actualidad se conocen un poco más de 150 zoonosis, las cuales forman un grupo heterogéneo de infecciones (13,14,19,23,25), muchas son complejas en su patogénesis y epidemiología, otras son las consideradas como comunes, tal es el caso de la brucelosis, tuberculosis, leishmaniasis, a la lista anterior se han agregado por lo menos tres más: enfermedad de Lyme, criptosporidiosis y babesiosis humana (3).

La criptosporidiosis es una enfermedad que inicialmente se descubrió en animales domésticos, posteriormente en ganado vacuno y los primeros informes de infección en humanos se descubrieron entre manejadores de ganado; lo cual sugiere que la enfermedad está dentro del grupo anteriormente mencionado. Esta hipótesis está apoyada por experimentos que demuestran la transmisión de Cryptosporidium de humanos a algunas especies de animales (15).

Anjus ha revisado los aspectos más generales veterinarios y humanos del parásito (7).

La criptosporidiosis ha llegado a ser de gran interés desde el primer caso reportado en 1976 (18) debido al comportamiento oportunista del parásito en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida y otros individuos comprometidos inmunológicamente (14), sin embargo, poco se conoce de la criptosporidiosis en países en desarrollo --- (18).

La infección extraintestinal está bien documentada en animales pero raramente reportada en humanos (1). Hasta recientemente la criptosporidiosis fue considerada como una infección en animales y en humanos se pensó que era el resultado de un patógeno oportunista poco conocido fuera de sus huéspedes normales (25). En la actualidad este con-

cepto ha cambiado considerándosele importante causante de gastroenteritis y diarrea en varias especies animales, especialmente becerros, corderos y humanos (25), sobre todo en individuos que están en contacto con animales infectados (3).

Los becerros y otros animales de compañía sirven como fuentes potenciales de infección en humanos y por lo -- tanto Cryptosporidium puede ser una causa de gastroenteritis en personas que han estado en contacto con animales infectados.

En las ciudades los perros, gatos y roedores están implicados como huéspedes reservorios debido a que pueden infectarse con heces de humanos enfermos (25).

El conocimiento clínico y epidemiológico acerca de criptosporidiosis se han incrementado proporcionalmente -- con el aumento de casos informados, se conoce el ciclo de vida del parásito, su posible mecanismo de transmisión y -- las características clínicas y parasitarias de la enfermedad (31).

La transmisión directa persona-persona también es -- altamente probable y puede presentarse a través del contacto directo o indirecto con heces contaminadas (3,14,25).

Recientemente se ha obtenido evidencia serológica -- de la transmisión de la enfermedad en pacientes con SIDA Y Criptosporidiosis prolongada al personal hospitalario (dato no publicado) así Cryptosporidium puede ser un agente -- de diarrea nosocomial (25).



CAPITULO IV

HISTORIA

## IV.- H I S T O R I A

Cryptosporidium fue descrito por primera vez en 1907 por Tyzzer quien lo observó en la mucosa gástrica de ratones asintomáticos (2) dándole el nombre de C. muris pero no suministró características para un nuevo género hasta 1910- (12).

La entidad clínica fue relacionada por primera vez - con criptosporidiosis en 1955 al estudiar pavos con diarrea grave infectados con Cryptosporidium (15). Slavin en el mismo año informó la presencia de diarrea grave en perros infectados con este protozooario y a partir de entonces numerosos estudios se han hecho especialmente en animales.

Ha sido estudiado intensivamente desde 1971 como una causa de enfermedad en animales y particularmente de ganado (20).

La criptosporidiosis ha llegado a ser de gran interés desde el primer caso reportado en 1976 por el Dr. Jhon H. Yardley (15), cuando se detectaron ooquistes de Cryptosporidium en una muestra de biopsia rectal en una niña de 3-años con severa enterocolitis autolimitada (20).

Estudios subsecuentes estaban enfocados a enfermedad en pacientes inmunológicamente deficientes, especialmente - en aquellos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida - en los cuales Cryptosporidium causa diarrea severa crónica- (20).

Desde 1976 y hasta 1982 sólo 7 casos habían sido publicados. Durante 1982 y principio de 1983 el número informado de pacientes se incrementó considerablemente (2,4,15).

En humanos las infecciones causadas por Cryptosporidium han sido descritas dentro de la década pasada, a principios de los 80's la aparición del SIDA en los Estados -- Unidos atrajo la atención de la asociación de Cryptosporidium con enfermedades diarreicas cuando 21 pacientes con - SIDA y criptosporidiosis fueron reportados al Centro de En fermedades (12).

En México el primer caso de criptosporidiosis publi cado, el cual se encontró asociado al SIDA lo realizó Ba-- rriga y col. mismo que fue publicado en la Revista de la A sociación Mexicana de Infectología (4).

#### 4.1.- Ciclo de vida:

Cryptosporidium es un parásito monoxeno por lo que sólo necesita un huésped para llevar a cabo su ciclo de vida- (2). Parece seguir el patrón descrito para otras coccidias- del género Eimeria, entre otras al de Toxoplasma gondii (15, 17,25) que contienen cuatro esporozoítos.

Ha sido investigado en cricetos, terneras y membrana- corioalantoidea del embrión de pollo (15).

Los ooquistes esporulados (maduros y altamente infec- tivos se encuentran en el contenido intestinal de animales- y humanos, lo que a diferencia de otras coccidias, están -- listas para infectar otro huésped ya que no requieren madu- rar en el ambiente antes de ser infectantes (14,15,31).

Los esporozoítos del ooquistes son liberados por meca- nismos desconocidos, pero parece que el desenquistamiento-- se favorece por la digestión de la pared quística en el con- ducto gastrointestinal del nuevo huésped. Los esporozoítos- liberados infectan células epiteliales del intestino delga- do para transformarse en trofozoítos (2).

El trofozoíto forma una unión electrodensa en la in-- terfase con la célula del huésped y el citoplasma del trofo- zoíto es rodeado por cuatro membranas distintas. El origen- de estas membranas no se ha establecido pero las últimas e- videncias indican que las membranas más externas son origi- nadas por el huésped (si la membrana la origina el huésped- la localización del trofozoíto es intracelular pero extraci- toplasmática) (15).

Sus etapas de desarrollo no ocurren dentro del cito- plasma de las células ni debajo de las capas epiteliales (2), sino que están confinadas a una zona intracelular (27) por- que cada etapa se lleva a cabo dentro de una vacuola parasi-

tofora (14), extracitoplasmática porque la vacuola conteniendo el parásito se encuentra en la superficie microvellosa de la célula huésped (25) y son observadas por microscopía electrónica (22).

Generalmente el desarrollo ocurre en el epitelio gastrointestinal pero en aves puede ocurrir en el epitelio de la tráquea (2,15).

Este ciclo de vida difiere de los publicados anteriormente en que los merontes (esquizontes) son considerados como tipos (12) en vez de generaciones y en el cual se consideran dos tipos de ooquistes.

El Tipo I de esquizontes con 6 ú 8 merozoítos Tipo I son liberados y salen de las células hospedadoras, volviendo a penetrar a otras células produciendo nuevamente esquizontes Tipo I, además de esquizontes Tipo II con 4 merozoítos.

Los esquizontes tipo I vuelven a reciclar y los esquizontes Tipo II continúan el ciclo hasta producir ooquistes de pared gruesa y ooquistes de pared delgada (25).

Aproximadamente el 80% de los ooquistes son de pared gruesa que pasan por el intestino intactos y transmiten la infección a un huésped susceptible vía contaminación fecal-oral.

El 20% restante de los ooquistes son de pared delgada, sufren esporogonia dentro de la célula hospedadora liberando esporozoítos dentro del intestino, reiniciando el ciclo biológico (25).

El ciclo de vida puede ser dividido en 6 fases de desarrollo:

- 1ª Fase: Exquistación
- 2ª " : Merogonia
- 3ª " : Gametogonia
- 4ª " : Fertilización
- 5ª " : Formación de la pared del oocisto
- 6ª " : Esporogonia

a).- Ooquistes esporulados con 4 esporozoítos en heces fecales.

b).- Rompimiento del oociste en el intestino del hospedero susceptible.

c).- Trofozoíto libre en el intestino

d).- Esquizonte tipo I con 6 ú 8 merozoítos tipo I.

e).- Los merozoítos tipo I se reciclan formando esquizontes tipo I nuevamente.

f).- Esquizonte Tipo II con 4 merozoítos

g).- Microgametocitos (machos) fecundan a macrogametocitos (hembras) dando origen a los gametos.

h).- Los microgametocitos efectúan divisiones nucleares y forman aproximadamente 12-16 microgametos, los macrogametocitos presentan pequeñas modificaciones y se convierten en macrogametos.

i).- Un microgameto se une con un macrogameto formando el cigoto y este se desarrolla hasta formar un oociste.

j).- El 80% de los oocistes formados por los cigotos, tienen pared gruesa.

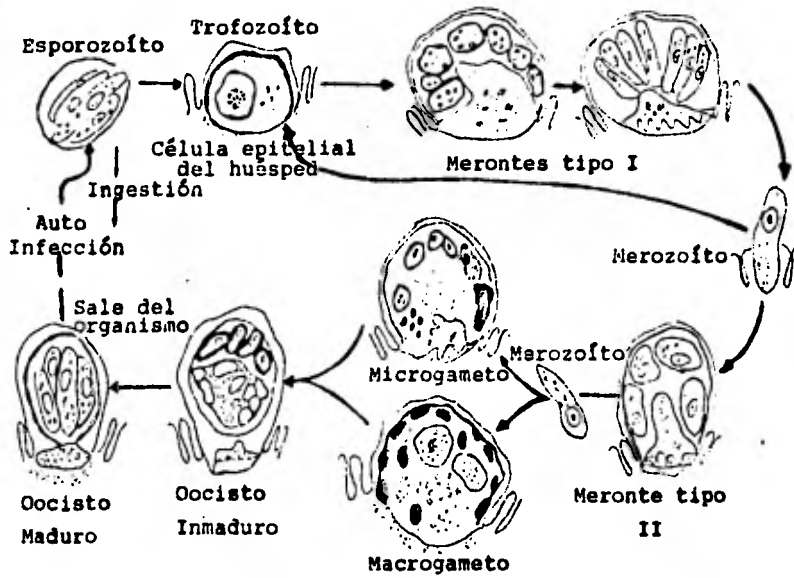
k).- Sufren esporogonia dentro del huésped y son eliminados por las heces fecales.

l).- El 20% de los oocistes tienen pared delgada, sufren esporogonia dentro de la célula huésped liberando esporozoítos dentro del intestino.

m).- Se inicia el ciclo endógeno. (15).

ESQUEMATIZACION: CICLO DE VIDA

(Fayer et-al 1986).



**Resistencia:**

Estos organismos son resistentes a algunos de los desinfectantes usualmente utilizados en hospitales y laboratorios (14).

Los ooquistes son susceptibles y pierden su infectividad con amoníaco al 5%, formalina al 10%, en solución salina, congelación, desecación y exposición a temperatura arriba de 65°C X 30' o con cloro comercial al 50% (dato no publicado)(14,23,25).

Algunos de los equipos para la recolección de heces proponen viales de dicromato de potasio al 2.5% pero se sabe que los ooquistes permanecen viables en esta solución -- por algún tiempo, así como sobrevivir a algunos procesos de pasteurización.



#### 4.2.- Epidemiología:

El conocimiento sobre la epidemiología de Cryptosporidium es limitado, particularmente su potencial como parásito (patógeno humano) ha sido apenas reconocido recientemente (14,25). Aunque en la actualidad se han hecho estudios sobre este protozooario en pacientes inmunocomprometidos y se ha reportado información sobre el ciclo de vida, la patogenicidad de Cryptosporidium y sobre la epidemiología de criptosporidiosis poco se conoce en países en desarrollo (15).

Las infecciones en humanos por Cryptosporidium han sido descritas en todos los continentes, países desarrollados y en vías de desarrollo, áreas urbanas y rurales. Encuestas a gran escala han examinado generalmente muestras de heces tomadas en una población seleccionada de adultos o niños con diarrea u otros problemas gastrointestinales los cuales buscan atención médica, aquellos que son internados o muestras de heces llevadas a un laboratorio particular (12).

En muchas áreas Cryptosporidium está entre los 3 ó 4 patógenos principales identificados y parece haber diferencias en las estaciones en las cuales las infecciones se presentan ya que ocurren más durante los meses más calientes y húmedos.

El rango de edades para Cryptosporidium es de 3 días de nacido (parto vaginal de una madre infectada con Cryptosporidium) a 95 años de edad.

Los niños son los más susceptibles, aquellos menores de 2 años de edad presentan mayor prevalencia.

Basados en una encuesta a gran escala se reportó la-

distribución por sexo, masculino y femenino y parecen ser igualmente susceptibles (M=149 , F=160) (12), en pacientes inmunocompetentes no hay predominio de la enfermedad en al algún sexo, sin embargo en pacientes inmunocomprometidos - se observa un predominio del género masculino y puede originarse por transmisión persona-persona (2,15).

La proporción de cuadros diarreicos ocasionados por este parásito es desconocida; tal vez a semejanza de lo acontecido con otros enteropatógenos tales como Campylobacter, Rotavirus, Yersinia, se tenga en un futuro alguna evidencia epidemiológica de su frecuencia como productor de - diarrea (3).

Existen pocos estudios acerca de la prevalencia de Cryptosporidium en animales. Sin embargo estudios realizados en carneros demuestran que la infección puede ser común en estos animales; por otro lado se observa que la infección es rara en animales adultos; lo que sugiere que -- probablemente se adquiere inmunidad al contacto con el organismo (2,15).

Se desconoce la prevalencia de criptosporidiosis humana en muchos países, a excepción de Australia donde se - han hecho estudios sobre la prevalencia de la infección en hospitalizados con gastroenteritis, indicando que este pro - tozoario puede ser una causa común de diarrea (14).

La importancia epidemiológica de portadores asintomáticos se desconoce; sin embargo un estudio realizado en Australia sugiere que es común encontrar portadores asintomáticos en la población general sin excluir la posibilidad de encontrar portadores asintomáticos entre homosexuales o pacientes con SIDA (15,25).

La frecuencia decreciente de criptosporidiosis con el aumento de la edad podría indicar la inducción de inmunidad y/o un modo diferente de transmisión (18).

El período de incubación de la criptosporidiosis en animales recién nacidos varía de 2 a 10 días aunque se ha observado que en animales este período se prolonga (25).

Un dato muy importante que llevará a investigaciones-epidemiológicas es que los pacientes excretan oocistos durante el doble de tiempo de la duración de la diarrea (10).

#### 4.3.- Inmunidad:

Las respuestas de inmunoglobulina M (IgM) e IgG han sido encontradas en inmunocompetentes e inmunosuprimidos-- por la técnica de inmunofluorescencia y ELISA. No se conoce si estas ofrecen protección. (12)

En pacientes inmunológicamente sanos hay un aumento temprano y una caída de IgM y una elevación tardía (dentro de 6 semanas) de IgG; la respuesta IgG puede desaparecer - dentro de unos pocos meses después de la infección o puede persistir significando contacto continuo o infección no detectada. (12)

Algunos pacientes con SIDA produjeron IgM y todos -- produjeron IgG la cual se mantuvo elevada a través del curso de la enfermedad. (12)

En estudios serológicos más de 50% de las personas - no identificadas como infectadas pueden demostrar IgG específica, sugiriendo que la enfermedad en la vida es común - (12).

Campbell y Current mediante IFI encontraron anticuerpos en suero de individuos normales recuperados de criptosporidiosis. Los títulos observados fueron altos (1:40 a -- 1:1560) y permanecieron elevados durante un año (1:40 a -- 1:640)(15).

En pacientes con SIDA y criptosporidiosis persistente, algunos tenían títulos de anticuerpos poco elevados -- (1:40 a 1:640) y no persistían (15).

#### 4.4.- Patogenia y curso clínico de la enfermedad:

##### Patogenia:

Establecer que un organismo es patógeno usualmente in volucra que la proporción de pacientes con el organismo y - con diarrea significativamente excede la proporción de suje tos con el organismo y sin diarrea (17).

La ausencia de alteraciones significativas a la mi---  
croscopía de luz de la arquitectura en la muestra de biop--  
sia sugiere que otros factores tales como la elaboración de  
toxinas por los criptosporidios u otros organismos puede es  
tar involucrada en la patogénesis de la diarrea (22).

En el huésped inmunodeficiente es posible que Cryptos  
poridium pueda permanecer durante varios meses de manera a--  
sintomática o ser causa de diarrea crónica; debido a que --  
presenta múltiples ciclos de esquizogonia, esto es con la--  
presencia de esporozoítos u oocistos viables se puede reini  
ciar la esquizogonia de un nuevo ciclo vital del protozoa--  
rio (2).

##### Patogenia en humanos:

Las lesiones intestinales que puede causar Cryptospo-  
ridium puede variar desde una leve hasta una moderada atro  
fia de las vellosidades, alargamiento de las criptas y una  
moderada o escasa infiltración de la lámina propia (25).--  
En el intestino delgado, Cryptosporidium se establece en -  
las microvellosidades de las células cilíndricas de absor-  
ción mientras que en el intestino grueso se encuentran en-  
el borde de las criptas.

En diferentes biopsias de yeyuno con microscopía de luz se observó daño en la mucosa intestinal, con acortamiento y pérdida de las vellosidades y alargamiento de las criptas. Las células cilíndricas que recubren el epitelio intestinal aparecían en forma cuboide y las microvellosidades presentaron ruptura y acortamiento. En la lámina propia se observó un incremento en el número de linfocitos, monocitos, polimorfonucleares, células plasmáticas y eosinófilos, encontrándose el mismo incremento en el epitelio (12).

A lo largo del epitelio intestinal aparecieron partículas redondas sugestivas de Cryptosporidium de 2 a 4 micrómetros de diámetro, adheridas a las microvellosidades del epitelio.

Al microscopio electrónico, fueron identificados estadios de desarrollo de Cryptosporidium. Se encontraron trofozoítos maduros, esquizontes, macrogametocitos y microgametocitos adheridos a las células de absorción del epitelio intestinal, rodeados por una membrana parasitófora (14). No se observaron diferencias entre las dos membranas, a excepción del sitio de adhesión entre la célula huésped y el parásito, donde se observa una banda densa.

En biopsia de duodeno, se describe con microscopio de luz un ligero acortamiento de las vellosidades y un alargamiento de las criptas. En la lámina propia se incrementó el número de células plasmáticas y una disminución de los polimorfonucleares. Se encontraron múltiples cuerpos redondos de 2 a 6 micrómetros de diámetro sobre las vellosidades de las células cilíndricas del epitelio.

Se observaron trofozoítos y macrogametocitos por microscopía electrónica, pero no se reportaron esquizontes ni microgametocitos. El sitio de adhesión entre el parási

to y la célula huésped presentó una banda densa.

En biopsia practicada en recto, al microscopio de luz se observó una proctitis inespecífica, con incremento en el número de células plasmáticas en la lámina propia y las células cilíndricas se presentaron en forma cuboide. En los bordes de las criptas del epitelio, se observaron organismos redondos densos de 2 a 4 micrómetros de diámetro por fuera del citoplasma. Pueden observarse trofozoítos, esquizontes y oocistos.

Por microscopía electrónica se observaron estadios característicos del género Cryptosporidium. Los organismos estaban adheridos a las células de absorción y los estadios observados fueron trofozoítos, esquizontes y macrogametocitos. En la zona de adhesión entre el parásito y la célula huésped se observó una banda densa originada por la célula huésped.

#### Patogenia en animales:

En huéspedes susceptibles de pocos días de nacidos la presencia de Cryptosporidium produce diarrea y un cambio en la morfología celular, las células cilíndricas se transforman a células cuboides y hay una infiltración de neutrófilos.

El daño causado por las coccidias a sus huéspedes dependen de varios factores. Algunos de los más importantes son el número de parásitos presentes en un sitio en particular. Depende del número de ooquistes esporulados ingeridos.

El grado de daño causado a un huésped por las coccidias puede ser proporcional al grado de destrucción de las células intestinales. Parece ser que hay una relación entre

el grado de patogenicidad de las especies y la profundidad en donde penetra en la mucosa intestinal, intensidad de la primoinfección, la frecuencia e igualmente la intensidad de las reinfecciones (34).

**Curso clínico de la enfermedad:**

a).- Factores intrínsecos y extrínsecos que favorecen el desarrollo de esta patología (25).

1).- Terapia medicamentosa inmunosupresiva particularmente corticosteroides

2).- Hipogamaglobulinemia congénita

3).- Defectos de inmunidad mediada por células

T.

4).- Pacientes con SIDA.

b).- Manifestaciones clínicas en humanos:

El factor determinante de gravedad en humanos es su estado inmunitario. En pacientes con función inmunitaria normal es frecuente que se desarrolle infección asintomática o de curación espontánea, mientras en pacientes con función inmunitaria anormal se desarrolla diarrea crónica que en algunos casos continúa hasta su muerte (2,3, - 15,31).

La criptosporidiosis en humanos se caracteriza por diarrea acuosa profusa sin sangre (2), esta contiene algunas veces moco pero raramente leucocitos (12).



Se ha observado que los pacientes inmunodeficientes desarrollan un síndrome coleriforme (2) con pérdida de -- grandes cantidades de líquidos que llegan comúnmente a --- tres litros al día o más y la diarrea tiene una duración - de 17 días hasta años. En contraste, los individuos sin al teraciones inmunitarias presentan diarrea con duración de una a 3 semanas relacionada con dolor abdominal (13) y vómito que ceden al tratamiento (2), otros síntomas asociados son náuseas, malestar general, cefalea, fiebre de baja intensidad (3,13,15,25), dolor epigástrico, tos, pérdida-- de peso, disnea en homosexuales no con antecedentes de dro gas inmunosupresoras (41), y de 5 a 10 evacuaciones al día las cuales pueden estar seguidas por costipación (13,14).

Cryptosporidium es causante menos común de anorexia, debilidad y agotamiento pero más común como causante de dolor abdominal en comparación con Giardia lamblia (20,23).- A diferencia de Isosporosis o sarcosporosis en esta enfermedad no se presenta eosinofilia periférica importante (2, 15).

#### c).- Manifestaciones clínicas en animales:

La enfermedad aguda de esta patología se caracteriza clínicamente por diarrea acuosa, anorexia y pérdida de peso. A diferencia de los humanos, los animales no presentan estado crónico, se ha observado que resisten la infección o bien se curan en forma espontánea (2,15).

Mediante experimentos en animales se ha observado que las manifestaciones clínicas dependen de algunos factores como son: especie, estado inmunitario y edad (2,- 15).

## 1).- Especie:

Tenemos algunos mamíferos como ratas, cricetos y conejos no desarrollan diarrea cuando se les infecta con oocistos de Cryptosporidium provenientes de terneras - mientras un inóculo semejante puede provocar diarrea, anorexia y pérdida de peso en animales jóvenes de otra especie como simios, porcinos, caprinos y aves (2,15).

## 2).- Edad:

Se han realizado experimentos en carneros - jóvenes especialmente neonatos libres de patógenos específicos, inoculados con oocistos de Cryptosporidium obtenidos a partir de terneras con diarrea a los uno, cinco, --- diez y treinta días de edad observándose que la presencia de la enfermedad fue dependiente de la edad (2); los carneros que se inocularon a los veinte días de nacidos presentaron poca o ninguna diarrea; los de treinta días permanecieron clínicamente sanos; mientras que los menores de --- veinte días presentaron diarrea que variaba de moderada a grave. El período de incubación de la criptosporidiosis en animales recién nacidos experimentalmente infectados varía de dos a diez días aunque se ha observado que en animales mayores este período se prolonga. Estos datos sugieren que los animales adultos pueden desarrollar inmunidad a esta - patología (2,15).

## 3).- Inmunidad:

La evidencia de alteración inmunitaria en - animales relacionada con criptosporidiosis ha sido observada en potrillos árabes con inmunodeficiencia combinada --- (tanto humoral como celular), los cuales murieron a los 2-

meses de edad por diarrea grave, se cree que la inmunodeficiencia incrementa la susceptibilidad a la infección ya que no se conocen casos de criptosporidiosis en potrillos con función inmunitaria normal (15).

La inmunidad es específica y de poca duración, dosis bajas de 10 mil a 100 mil ooquistes protegen contra infecciones por la misma especie.

Los becerros quedan protegidos a la confrontación a los 14 días después de la inoculación; la inmunidad puede persistir 2 o 3 meses en los becerros.

En condiciones naturales, los animales jóvenes sufren ligeros ataques que les dan un grado de resistencia contra ataques subsecuentes (34).

La respuesta inmune se manifiesta por una menor producción de ooquistes (34).

#### 4.5.- Métodos de diagnóstico:

Debido al número creciente de pacientes con infección comprobada por Cryptosporidium y otras coccidias, es importante para el laboratorio clínico estar conciente de la existencia de una o más técnicas apropiadas para la recuperación e identificación de Cryptosporidium (13).

La falla para detectar las formas parasitarias en heces de una persona infectada probablemente es debida a la combinación de la inexperiencia del observador en el reconocimiento del parásito con una menor eficiencia de las técnicas parasitológicas tradicionales de concentración de oocistos además de que hay que tener en cuenta que éstos son tan pequeños que pueden no ser observados o confundirse con levaduras (15).

Para establecer el diagnóstico de este nuevo enteropatógeno es necesario primero tener en mente esta posibilidad, emplear exámenes simples, rápidos y de bajo costo, -- discriminar la presencia de otras etiologías que ocasionan cuadros semejantes y, sobre todo, evitar al máximo el abuso de fármacos antimicrobianos que propician la yatrogenia y enmascaran el curso de la enfermedad (31).

Cryptosporidium ha sido identificado y demostrado -- por diferentes métodos parasitológicos, inmunológicos e -- histopatológicos (13).

El diagnóstico no invasivo fue reportado en 1978 en terneras y en 1980 en humanos cuando fueron detectados oocistos de Cryptosporidium en frotis fecales y teñidos con Giemsa (12).

La concentración de las muestras de heces es importante - en la enfermedad no aguda con pequeño número de oocistos- en la evaluación de familias y para estudios epidemiológicos (12).

Las muestras que han sido tratadas con formalina al 10%, dicromato de potasio al 2.5% y alcohol polivinílico- pueden examinarse para la búsqueda de oocistos usando 15- métodos diferentes (13)

- 1.- Microscopía de fases
- 2.- Microscopía de luz
- 3.- Flotación de azúcar de Sheater
- 4.- Técnica de concentración con formalina
- 5.- KOH al 10%
- 6.- Giemsa
- 7.- Tricrómico
- 8.- Acido peryódico de Schiff
- 9.- Acido peryódico de Schiff modificado
- 10.- Metenamina de plata
- 11.- Naranja de acridina
- 12.- Auramina-rodamina
- 13.- Acido resistente de Kinyoun
- 14.- Calbolfucsina de Ziehl-Neelsen
- 15.- Procedimiento para ácido resistentes

Para el hallazgo e identificación del parásito es -- necesaria la combinación de técnicas. El uso de Giemsa en- sedimentado formalizado y el de ácido resistencia de Kinyoun modificado son los que mejor ponen de manifiesto este pro- tozoario ya que con esas tinciones se elimina la necesidad de calentar o vaporizar (13) y tienen una sensibilidad más elevada.

#### 4.5.1.- Métodos parasitológicos:

Para la obtención e identificación de oocistos de Cryptosporidium se realizaron los siguientes métodos parasitológicos:

- Método de concentración-sedimentación de Ritchie
- Tinción de Kinyoun modificada

#### 4.5.2.- Inmunodiagnóstico:

La metodología empleada en la determinación de anticuerpos circulantes específicos IgM, IgG e IgA (12) contra Cryptosporidium incluye la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) ligada a la etapa endógena del parásito.

La IFI más el hallazgo en heces dará datos confiables para la detección de Cryptosporidium. Un título de -- 1:40 o mayor se debe interpretar como prueba positiva para Cryptosporidium.

El aumento de título de anticuerpos se da en 6 a 8 semanas de la infección durando así aproximadamente un año y luego empiezan a disminuir.

#### 4.5.3.- Métodos histopatológicos:

El método más útil para el diagnóstico es la evidencia de los estadios parasitarios que atacan la superficie de las células epiteliales por tanto de acuerdo a Meisel y cols es el método concluyente para diagnosticar los microorganismos tanto en humanos como en animales, sin embargo Current y Ma. señalan que si el sitio de la biopsia no está infectado entonces se perderá el diagnóstico (13),

por tanto sugieren que las técnicas de concentración y las tinciones específicas son más veraces y concretas que las biopsias (2).

El exámen histopatológico de las biopsias intestinales revelan que los parásitos se concentran en el yeyuno e íleon donde se produce un abultamiento de las vellosidades, acortamiento de los enterocitos y ligera o moderada infiltración de la lámina propia (3,25).

Para confirmar el diagnóstico se da de comer las heces a animales de laboratorio recién nacidos libres de patógenos específicos y se buscan histológicamente las distintas fases en el conducto gastrointestinal de estos animales (2,15).

#### 4.6.- Diagnóstico diferencial:

La mejor manera de describir las características decriptosporidiosis humana sería compararlas con las de giardiasis, la cual ocurre en todo el mundo, es común y reconocida por la mayoría de los médicos y es una de las condiciones a considerar en el diagnóstico diferencial (23).

Así en la criptosporidiosis la duración de la enfermedad es más corta (autolimitada en la mayoría de los casos), el dolor abdominal es más común mientras que la anorexia y debilidad menos comunes (23).

La criptosporidiosis se asemeja a la giardiasis en sus otras características clínicas como son la diarrea y dolor abdominal (23).

La gran semejanza entre una y otra estriba en que es necesaria la demostración del parásito para el diagnóstico.

La recuperación espontánea parece ser la regla para su diferenciación (23).



#### 4.7.- Tratamiento:

Se han probado más de 40 agentes antimicrobianos, incluyendo coccidiostáticos y otros compuestos antiprotozoarios, antibióticos de amplio espectro y aún antihelmínticos para tratamiento de la infección en humanos, así como experimentalmente en terneras y ratones (2,15).

No hay tratamiento específico para criptosporidiosis en pacientes inmunodeprimidos (18) ya que se desconoce el mecanismo de acción contra Criptosporidios, la recuperación es espontánea en pacientes inmunocompetentes (23).

Ningún esquema ha sido eficaz (15,20) sin embargo se posibilita el estudio de algunos medicamentos como los 5-nitroimidazoles, el cotrimoxazol y los ácidos quinolín-carboxílicos (31).

La espiramicina ha surgido como posible agente efectivo para tratamiento de criptosporidiosis en huéspedes inmunocomprometidos (1)

Hasta el momento sólo tratamiento de apoyo y sintomático parece posible (2).

#### 4.8.- Profilaxis:

Para el control de la propagación de Cryptosporidium requiere la eliminación de oocistos del medio aunque en -- condiciones favorables estos se mantienen infecciosos por largo tiempo (12).

Reducir el potencial de ingestión de oocistos de suelo, agua y alimentos contaminados (12).

Cuidado de los pacientes para minimizar el riesgo de infecciones nosocomiales.

Otras medidas son el lavado de manos, uso de guantes y batas así como habitaciones privadas para pacientes con pobre aseo higiénico (12).

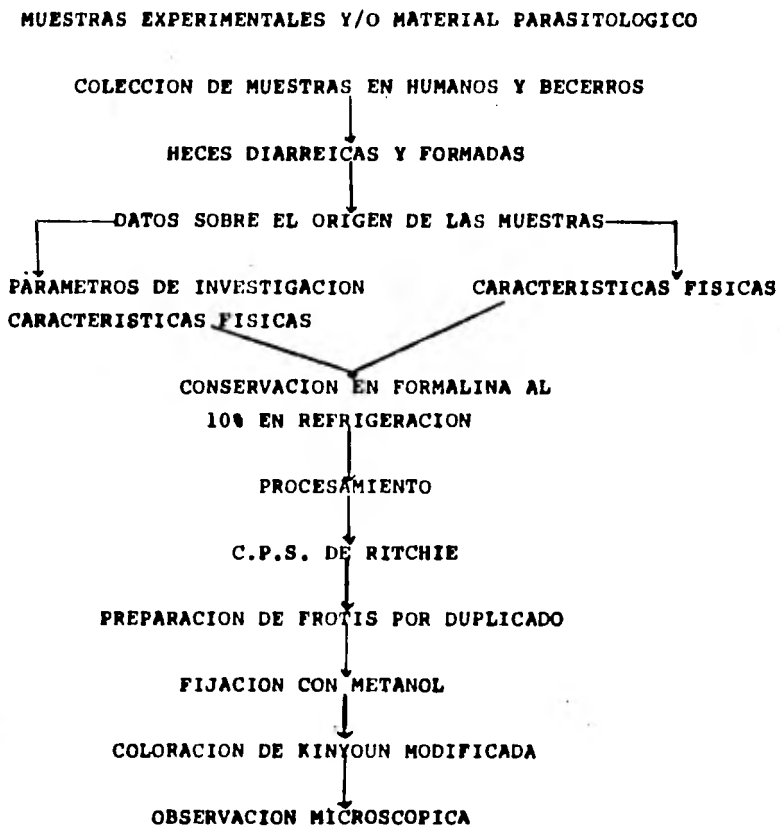
El equipo contaminado debe ser estrictamente esterilizado. La fumigación con amoníaco fue la más apropiada de descontaminación, no hay vacunas para la prevención de criptosporidiosis en humanos o animales (12).

Descontaminar las superficies con cloro comercial de jándolo de 10 a 15 minutos (12).

CAPITULO V

MATERIAL Y METODOS

5.1.- METODOLOGIA



## 5.2.- Descripción de la metodología:

En la realización de esta investigación se analizaron un total de 150 muestras de las cuales 125 fueron recolectadas de pacientes hospitalizados y de consulta externa en el Laboratorio del Hospital Militar Regional de Guadalajara,-- Jalisco. Fueron examinadas también 25 muestras de becerros-obtenidas en establos de una comunidad rural de Villa Corona, Jal.

El trabajo se realizó en los Laboratorios del Departamento de Microbiología del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Guadalajara.

La realización de este estudio tuvo como fin la búsqueda de oocistos de Cryptosporidium en una población heterogénea así como en becerros que hayan cursado o no un cuadro clínico de gastroenteritis examinando por tal motivo heces diarreicas y formadas obteniendo datos que nos permitan realizar un estudio comparativo en cuanto a su trascendencia epidemiológica.

## 5.3.- Criterios de selección de pacientes y población animal de acuerdo a los siguientes parámetros clínicos:

- Pacientes que presenten algún factor predisponente y cuadro de diarrea.
- Población heterogénea (humanos) y población animal que presentaran signos y síntomas gastrointestinales.
- Población heterogénea (humanos) y población animal que no presentaran cuadro clínico de diarrea,
- Pacientes que presentaran algún factor predisponente pero sin cuadro clínico de gastroenteritis.

#### 5.4.- Metodología del muestreo:

##### 5.4.1.- Obtención de muestras en humanos y datos sobre el origen de las mismas:

Para la obtención del material parasitológico se llevó a cabo una encuesta, la cual consistió en interrogar al paciente o sus familiares sobre los parámetros que - consideramos importantes para la realización de este trabajo: edad del paciente, si habían tenido contacto con becerros, si presentaban algún factor predisponente y cuadros--diarreicos.

La investigación del material de experimentación fue dirigido a un grupo de pacientes que acudió al Laboratorio para practicárseles exámenes de rutina los cuales fueron enviados del Colegio del Aire, un segundo grupo lo--integran pacientes de consulta externa y el tercero lo conforman pacientes hospitalizados en la sala de Pediatría de la misma Institución.

El material biológico que se obtuvo fueron heces tanto formadas como diarreicas sin tomar en cuenta otras características como color, olor, siendo la consistencia la más importante para este estudio.

##### 5.4.2.- Colección de muestras en becerros y datos sobre el origen de las mismas:

La selección de muestras se llevó a cabo en - un grupo de 25 becerros en una comunidad rural cuyas edades variaron entre .5 y 4.5 meses de edad aproximadamente, estos datos fueron proporcionados por las personas encargadas del cuidado de los mismos. El objetivo de llevar a cabo el estudio en este grupo es porque los becerros son la principal fuente de infección en humanos.

#### 5.4.3.- Conservación de la muestra:

El material de estudio debe colocarse en via les conteniendo formalina al 10% y transportarse de esta -- forma al laboratorio, si no se procesa inmediatamente deben conservarse en refrigeración a una temperatura de 4°C.

#### 5.5.- Material y reactivos:

##### a).- REACTIVOS:

Cloruro de sodio Q.P.  
Formaldehído en solución Q.P.  
Eter etílico comercial  
Metanol absoluto  
Carbol Fucsina fenicada  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%  
Aceite de inmersión

##### b).- SOLUCIONES:

Solución salina isotónica  
Solución de formaldehído al 10%  
Solución de Stock  
Solución de trabajo

##### c).- VIDRIERIA:

Embudos de vidrio o polietileno de 5 cm. de diámetro.  
Pipetas Pasteur con bulbo  
Portaobjetos de 25 X 22 mm.  
Tubos cónicos para centrífuga de 15 ml.

##### d).- APARATOS:

Centrífuga con camisas para tubos de 13 X 100 mm.

##### e).- OTROS:

Gasa cortada en cuadros de 15 cm. de lado  
aplicadores de madera  
Gradilla

**PREPARACION DE SOLUCIONES:****1.- Solución de formaldehído al 10%**

Se colocan 10 ml de formaldehído Q.P. en una probeta o matraz volumétrico de 100 ml y se completa el volúmen con agua destilada.

**2.- Solución de Stock:**

2 grs. de colorante de verde brillante se pulverizan en un mortero, disolver con agua destilada y aforar a 100 ml.

**3.- Solución de trabajo:**

Colocar 10 ml de la solución de Stock en un matraz aforado de 50 ml y aforar con agua destilada.

**4.- Solución de carbol fucsina fenicada:**

Fucsina básica 4.0 grs, fenol 8.0 grs, alcohol etílico 95% 20 ml, agua destilada 100 ml.

Se disuelve la fucsina básica en alcohol y se agrega el agua lentamente. Licuar el fenol a 56°C en Baño María, se agrega a la primera preparación. Filtrar antes de usar.

**5.6.- Métodos:****5.6.1.- Método de Ritchie:**

Fundamento: Es un método que se basa en la concentración-sedimentación de formas parasitarias como larvas, quistes, huevos sin importar la densidad que estos tengan y utilizando una serie de sustancias como el éter que a



yuda a eliminar detritus orgánicos y el formol que nos permitirá mantener la integridad de las formas parasitarias.

Limitaciones: Debido a que se usan varios tubos cónicos resulta poco económico. Las preparaciones -- quedan muy sucias porque con la sedimentación, aparte de - concentrar formas parasitarias se concentran otros materia les.

1.- Con un aplicador de madera, se colocan 1 a 2 grs. de materia fecal, aproximadamente en el vaso de precipitados y se le añaden 10 ml de solución salina, homogenizando con el mismo aplicador.

2.- Se pasa la suspensión a través de la - gasa colocada en el embudo y recibiendo el contenido en el tubo cónico.

3.- Se centrifuga durante 1' a 2000 r.p.m.

4.- Se decanta el sobrenadante y se resuspende el sedimento con solución salina, centrifugando, decantando y resuspendiendo las veces que sean necesarias -- hasta que el sobrenadante sea claro.

5.- Al último sedimento se le agregan 10 - ml de solución de formaldehído, se mezcla y se deja reposar durante 10 minutos.

6.- Se añaden 5 ml de éter, se tapan los - tubos con tapones de caucho y se agitan enérgicamente durante 30".

7.- Se centrifuga durante 2' a 1500 r.p.m.

8.- Después de centrifugar se observan cuatro capas:

1# éter en la superficie

2# un tapón de restos fecales

3# formaldehído

4# sedimento en el fondo conteniendo elementos parasitarios.

9.- Se introduce la pipeta Pasteur a través de las capas 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, hasta llegar al sedimento, se extrae con cuidado una gota del mismo y se coloca sobre un portaobjetos.

5.6.2.- Tinción de Kinyoun modificada:

Fundamento: Los ooquistes de Cryptosporidium son alcohol-ácido resistente, su pared ooquistica es de material resistente y en su interior como la mayoría de las coccidias, forman esporocistos que contienen gran cantidad de lípidos por lo que se colorea casi en su totalidad, siendo responsables de su propiedad la resistencia a los ácidos.

1.- Hacer una película delgada de la muestra sobre portaobjetos (del sedimento obtenido por el método de Ritchie sin decantar el fluido sobrenadante).

2.- Dejar secar

3.- Sumergir en metanol por 1'

4.- Dejar secar

5.- Cubrir con colorante (Carbolfucsina Kinyoun modificada por 1'

6.- Lavar con agua de la llave

7.- Decolorar con  $H_2SO_4$  al 10% hasta que no salga color, aproximadamente 1'

8.- Lavar con agua de la llave

9.- Cubrir con colorante verde brillante --  
concentrado

10.- Lavar con agua de la llave

11.- Leer con objetivo de inmersión

12.- Ooquistes ácido resistentes positivos -  
4-5 um (teñido de rojo)

13.- Levaduras, no ácido-resistentes (teñidas de verde).

CAPITULO VI

RESULTADOS

## VI.- R E S U L T A D O S

De 150 muestras de heces obtenidas para la búsqueda e identificación de Cryptosporidium, 125 se recolectaron al azar en una población heterogénea cuyas edades variaron entre un mes y setenta y seis años. Consultar tabla No. 1

Las 25 muestras restantes se tomaron en un grupo de becerros cuyas edades estuvieron comprendidas entre 15 días y 4.5 meses.

En su totalidad el material biológico fue sujeto a una técnica de concentración-sedimentación: Método de Ritchie, posteriormente los sedimentos fueron observados previamente coloreados con la tinción de Kinyoun modificada.

Una vez realizada la observación microscópica y habiendo localizado las formas sugestivas de Cryptosporidium se procedió a hacer una comparación de los cuerpos densamente teñidos de rojo sobre fondo azul-verde con los ooquistes observados en una laminilla de referencia la cual fue proporcionada por la Universidad de Houston, Texas, así como por la valiosa colaboración de la Bióloga Ma. de los Angeles Luján Cruz y el Dr. Hugo Vicente Ralde, Profesores adscritos al Departamento de Microbiología de la Universidad Autónoma de Guadalajara, quienes con sus conocimientos sobre el tema contribuyeron en la asesoría de esta investigación, además del apoyo fotográfico obtenido en la bibliografía (11), procediendo de esta forma a la separación del material conteniendo ooquistes, un total de nueve laminillas fueron remitidas a la Universidad de Houston, Texas a través del Dr. Ralde para su confirmación la cual fue realizada por Jeff Matthews, reportándose así la positividad de los casos enviados.

La tabla I muestra los resultados generales de una investigación realizada durante los meses de Julio/85 a Febrero/86 reportándose haberse encontrado oocistos de Cryptosporidium en 4 de 125 (3.2%) muestras fecales.

Dentro de los parámetros que consideramos importantes en el esquema de trabajo tenemos que el Grupo I presentó la mayor proporción de cuadros de diarrea 8 de 26 (30.7%).

Es importante señalar que hubo un porcentaje más elevado de muestras cuyos pacientes no presentaron diarrea 103 de 125 (82.4%), sobre 22 de 125 (17.6%) que sí tuvieron manifestaciones gastrointestinales.

Observamos a continuación que 2 de los 4 informes positivos se registraron en una población cuyas edades van -- más allá de los 25 años, Grupo V así como el mayor número de personas con antecedentes de contacto con becerros 10 de 48 (28.8%) y el único donde se tuvo como factor predisponente la Diabetes mellitus 8 de 48 (16.6%).

El análisis del primer reporte positivo se obtuvo en un niño de 5 meses de edad al cual se le practicó exámen C.P.S. seriado de tres muestras aproximadamente cada dos meses de su ingreso al hospital por presentar cuadro de gastroenteritis y no se manifestó antecedentes de contacto con becerros Observar tabla II.

Otro de nuestros resultados lo obtuvimos en una niña de 10 años presentando como única característica cuadro de diarrea e igualmente fue observado en el paciente de 35 años.

La paciente de 26 años declaró en la encuesta haber - tenido antecedentes de contacto con becerros además de presentar Diabetes mellitus.

Como podemos observar Cryptosporidium fue identificado en muestras de pacientes de ambos sexos, 2 del sexo masculino (50%) y 2 del sexo femenino (50%).

Se estudiaron 25 muestras de becerros menores de un año de edad con las características mencionadas en toma y manejo de muestras.

El número de reportes positivos se confirmó en la Universidad de Houston, Texas. Un total de 5 de 25 (20%) --- fueron obtenidos en el Grupo I cuyas edades variaron entre 0.5 y 2.5 meses como se muestra en la Tabla III.

Las heces de animales con diarrea fueron Cryptosporidium negativas 8 de 8 (100%) sin embargo la totalidad de casos positivos se reportó en heces formadas 5 de 17 (29.4%).

T A B L A I

TABLA GENERAL DE RESULTADOS DE 125 PACIENTES DONDE SE ENCONTRO OOCISTOS DE CRYPTOSPORIDIUM EN HECEES FORMADAS Y DIARREICAS.

Grupo	Edad de pacientes (años)	No(%) C	No(%) C.D.	No(%) S/C.D.	ACB	FP/DM
I	< 1(n=26)	1(3.8)	8(30.7)	17(65.3)	0	0
II	1-4(n=17)	0	2(11.7)	15(88.2)	3(17.6)	0
III	5-9(n=12)	0	3(25.0)	11(91.6)	1( 8.3)	0
IV	10-14(n=10)	1(10.0)	1(10.0)	10(100 )	2(20.0)	0
V	15-24(n=12)	0	1( 8.3)	11(91.6)	4(33.3)	0
VI	25+n (n=48)	2(4.1)	7(14.5)	39(81.5)	10(28.8)	8(16.6)
Total (n=125)		4(3.2)	22(17.6)	103(82.4)	20(16)	8(6.4)

Fuente: Investigación realizada durante los meses de Julio/85 a Febrero/86

n= número de muestras

No(%)C= número y % de casos positivos

No(%)C.D.=número y % de pacientes con cuadro de diarrea

No(%) S/C.D. = número y % de pacientes sin cuadro de diarrea

ACB= antecedentes de contacto con becerros

FP/DM = factor predisponente: Diabetes mellitus.

T A B L A II

RESULTADOS OBTENIDOS EN HECES DIARREICAS DE CUATRO PACIENTES  
DONDE FUE OBSERVADO CRYPTOSPORIDIUM

Edad	Sexo	C.D.	S/CD	ACB	F.P.
5 meses	M	+	-	-	-
10 años	F	+	-	-	-
26 años	F	+	-	+	+
35 años	M	+	-	-	-

M= Masculino

F= Femenino

C.D.= Cuadro de diarrea

S/C.D. Sin cuadro de diarrea

ACB= Antecedentes de contacto con becerros

F.P. = Factor predisponente.



T A B L A    I I I

TABLA DE RESULTADOS OBTENIDOS EN 25 BECERROS DONDE SE ENCONTRO OOCISTOS DE CRYPTOSPORIDIUM EN HECES FORMADAS Y DIARREICAS.

Grupo	Edad de becerros (meses)	n(%) Cryp	n(%)H/CL	n(%)H/CF
I	.5-2.5 (n=17)	5 (29.4)	7(41.1)	10 (58.8)
II	3-4.5 (n= 8)	0	8(100 )	0
	Total (n= 25)	5 (20)	15(60)	10(40)

N= número de muestras

n(%) Cryp= número y % de casos positivos

H/CL= heces de consistencia líquida

H/CF= " " " formada

**CAPITULO VII**  
**CONCLUSIONES Y DISCUSION**

VII.- CONCLUSIONES Y DISCUSION

- De acuerdo a diversos estudios realizados en humanos se pone de manifiesto que los ooquistes de Cryptosporidium pueden ser demostrados en muestra fecales que han experimentado concentración formalina-éter e identificación mediante la tinción de Kinyoun modificada que ha demostrado ser muy selectiva, es por eso que fue seleccionada en la realización de este trabajo.
- Los resultados obtenidos en la Tabla I nos muestran que la población con diarrea fueron niños menores de un año, esto es favorecido debido a que el análisis que se llevó a cabo en los meses cuando se presentan brotes epidémicos de diarrea en nuestro medio.
- Según investigaciones realizadas con anterioridad se ha podido observar que la edad en humanos no es un factor determinante para adquirir la infección y esto ha sido comprobado en nuestro medio ya que ha sido demostrado en pacientes de diversas edades como se observa en la Tabla II.
- Teniendo en consideración que la Criptosporidiosis es una zoonosis vemos que hay una relación en cuanto a la probable infección de la paciente que tuvo antecedentes de contacto con becerros y para aquellos que manifestaron no haberlo tenido, concluimos que dada la resistencia que presentan los ooquistes a las condiciones ambientales y en el mecanismo de transmisión juega un papel importante el fecalismo.
- Dado el carácter oportunista que presenta Cryptosporidium es de gran importancia la detección de oocistos ya que puede ser el causante de diarrea a nivel nosocomial, es interesante mencionar que debido a sus características --

pleomórficas y afinidad tintorial es difícil su identificación por ello debe recomendarse la implementación de -- técnicas adecuadas para su demostración.

- El empleo de las técnicas anteriormente descritas han demostrado dar resultados fidedignos en el hallazgo de las formas parasitarias correspondientes a Cryptosporidium sp. así hemos podido confirmar la presencia de este protozoario ( sin haberse observado criterios para su cuantificación) y su probable participación en estos cuadros diarréicos presentados en los cuatro pacientes.
- El protozoario no fue observado en heces formadas de los pacientes en estudio aunque cabe mencionar que en otros trabajos reportados en la literatura si se ha encontrado dicha frecuencia. En nuestros resultados pudo haber influido nuestro universo de trabajo, sin embargo, en los becerros se observa que en el Grupo I de la Tabla III, se obtuvo un 40%, esto pone de manifiesto que los animales jóvenes aún cuando sufren ataques ligeros, si su función inmunitaria es normal, estos les darán un grado de resistencia contra ataques subsecuentes, como podemos observar en el Grupo II no se observaron ooquistes de Cryptosporidium por lo tanto al aumentar la edad de alguna manera se desarrolla inmunidad.
- Cabe señalar que Cryptosporidium fue identificado exclusivamente en heces formadas en los becerros, aunque la mayor proporción de material de estudio (60%) tuvo consistencia líquida, por tanto, los animales tal vez presentaban la etapa de primoinfección y el número de ooquistes aún no era suficiente para causar un cuadro agudo de gastroenteritis.
- El análisis realizado en la población animal fue un número

ro menor de muestras en comparación con el realizado en hu manos debido a las circunstancias en que los inóculos fueron recolectados dado que en el establo donde se encontraban no había alojamientos suficientes para separarlos por no contar con espacio suficiente y el suelo estaba húmedo ya que durante el tiempo de experimentación se presentaron lluvias, este ambiente es muy favorable para que los animales adquirieran la infección, debido a la falta de abrevaderos higiénicos toman los alimentos y agua contaminados del suelo, estas condiciones agropecuarias pudieron haber influido en el porcentaje relativamente alto, por ello será necesario en un futuro hacer un estudio comparativo.

**CAPITULO VIII**

**BIBLIOGRAFIA**

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- A. Miller Richard., et-al.: "Detection of Cryptosporidium oocyst in sputum during screenig for Micobacteria". Journal of Clinical Microbiology., 1984; Vol 20 No. 6: 1192-1193.
- 2.- Amador López Raúl., "Criptosporidiosis"., Infectología. 1986; Vol 6, No, 8: 279-286.
- 3.- Arredondo G. José Luis., "Nuevas zoonosis"., Infectología. 1985; Vol 6, No. 6: 457-458.
- 4.- Barriga A. G. y col.: "Criptosporidiosis asociada con SIDA: informe de un caso". Infectología. 1985; Año V, No. 2: 33-37.
- 5.- Borchet Alfred., "Parasitología Veterinaria". Editorial Acriba Zaragoza. 608-622.
- 6.- Campbell P.N., et-al.: "Demostration of serumen antibodyes to Cryptosporidium sp. in Normal and immunodeficient humans with confirmed infections". J. Clinical Microbiol., 1983; Vol 18, No, 1: 165-9.
- 7.- Casemore P. D., et-al.: "Sporadic Cryptosporidiosis - in children". Lancet. 1983; Vol 2, No. 8351: 679.
- 8.- Casemore P.D., "Screenig for Cryptosporidium in stools". The Lancet., 1984; Vo. 1, nO. 8379: 734.
- 9.- Derrick Baxby., "Sensitive, rapid, simple methods for detecting Cryptosporidium in faeces". The Lancet. --- 1983; Vol II, No. 3359: 1149.
- 10.- Derrick Baxby., "Cryptosporidiosis"., British Medical-Journal. 1984; Vo. 289, No. 6452: 1148.
- 11.- Edwin H. Lennette y col.: Manual of Clinical Microbiology. Fourth Edition; American Society for Microbiology. Washington D.C. 1985: Section VII. Parasites, Section Editor: James W. Smith. 595-649.
- 12.- Fayer R. and B. Ungar.: "Cryptosporidium spp. and --- Cryptosporidiosis". Microbiological Reviews., 1986; - Vol 50, No. 4: 458-483.
- 13.- García L. S., et-al.: "Techniques for recovery and i-

- dentification of *Cryptosporidium* oocysts from stool--specimens". J. Clin Microbiol., 1983; Vol 18, No 1:--185-190.
- 14.- García L. S., et-al.: "Cryptosporidium". Clinical Microbiology. UCLA Clinical Laboratories.: 1-8.
  - 15.- González B. y cols.: "Criptosporidiosis". Infectología. 1985; Vol 5, No. 6: 140-145.
  - 16.- Gordon Nichols.: "Sreening for Cryptosporidium in --- stools". The Lancet., 1984; Vol 2, No. 8379: 734.
  - 17.- Herbert L. DuPont.: "Cryptosporidium and diarrhoea".- The Lancet., 1983; Vol II, No. 8355: 914.
  - 18.- Hojiyng Niels., et-al.: "Cryptosporidiosis in Libe -- rian children". The Lancet. 1984; Vol 1, No. 8379:---734.
  - 19.- Holley H., et-al.: Holley H., et-al.: "Cryptospori--- dium: A cause of parasitic diarrhoea in other wise -- healthy individuals". J. of Infectious Dis. 1986; Vol 153, No. 2: 365- 367.
  - 20.- Hunt D.A., et-al.: "Cryptosporidiosis in an urban co-- munity". British Medical Journal. 1984; Vol 289, No.-6448: 814.
  - 21.- Janoff E. Nand and Reller L. Barth.: "Cryptosporidium species a Protean Protozoan". J. Clin. Microbiology.-1987; Vol 25. No. 6: 967-975.
  - 22.- Jay, H. Lefkowitch., et-al.: "Cryptosporidiosis of -- the human small intestine: a light and electron mi--- croscopic study". Human Pathol., 1984; Vol 15: 746 --752.
  - 23.- Jokipii Liisa, et-al.: "Cryptosporidium: a frecuent - finding in patients with gastrointestinal symptoms".- Lancet. 1983; Vol II, No. 8346: 358-360.
  - 24.- L. Currents William., et-al.: Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture". Science., 1984; Vol 224, No. 4649: 603-5.
  - 25.- L. Current William.: "Human Cryptosporidiosis". Micro



- biology., 1984: 220-223.
- 26.- Laf J. Benjamín., et-al.: "Characterización of the - Cryptosporidium Antigens from Sporulate oocyst of -- Cryptosporidium parvum". Infection and Immunity., -- 1987: Vol 55, No. 10: 2436-2441.
  - 27.- Loretta L. Schlessinger., "Microbiology"., American Society of Microbiology., Washington D.C., U.S.A.--- 220-223.
  - 28.- Luján C. Ma. de los Angeles., Comunicación personal- 1986.
  - 29.- Ma. P St., "Modified Kinyoun Acidfast Stain"., Pro-- gram in Med. Technology., Univ. of Texas.
  - 30.- Mandel.: "Principles and Practice of Infectious Di-- seases". Third Edition., Vol 2: 1122-26.
  - 31.- Nasrrala R. Eduardo., "Complejidad etiológica de la- diarrea"., Infectología., 1985; Año VI, No. 6: 138.-
  - 32.- Pearl Ma. PhD., "Laboratory diagnosis of Coccidiosis" Microbiology. 1984: 220-223.
  - 33.- Pumarola A.: "Microbiología y Parasitología". 2ª Edi ción 1983; Salvat Editores, Barcelona España.
  - 34.- Quiroz Romero Héctor: Parasitología Veterinaria 2ª E dición, 1983: Salvat Editores: 120-126.
  - 35.- R. Sterlig Charles.: Cryptosporidium as a Causative- Agent of Traveler's Diarrhea". J. of Infectious Di-- seases., 1986: Vol 153, No. 2: 380.
  - 36.- Salazar S. Paz Ma., Arteaga H. I., "Manual de técni- cas para el diagnóstico morfológico de las parasito- sis" 1ª ed. Edit. Méndez Cervantes. 1890. México, D. F. 96-97.
  - 37.- Soave Rosemary.: "Terapy and prevention of Coccidio- sis" Microbiology., 1984: 227.
  - 38.- Tzipori Saul., et-al.: "Diarrhea in youn red deer a- ssociated with infection with Cryptosporidium". Jour nal of Infectious Diseases., 1981. Vol 744, No. 2 -- 170-175.

- 39.- Vicente R. Hugo., Comunicación personal, 1986
- 40.- W. Peter-Horen.: "Detection of Cryptosporidium in human fecal specimen". The Journal of Parasitology., --- 1983; Vol 69, No. 3: 622-4.
- 41.- Zar Fred., et-al.: "Asimptomatic Carriage Cryptosporidium in the stool of patients with aquired immunodeficiency syndrome". The Journal of Infectious Diseases., 1985; Vol 151, No. 1 : 195.
- 42.- Ziaet S.W. "Concentration and identification of Cryptosporidium sp by use a parasite" J. Med. Microbiol., - 1984: 205, 860-1.