

3
20

ESCUELA: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A U.N.A.M.

CRIPTOSPORIDIOSIS HUMANA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

GARCIA CABRERA EDITH

MEXICO, D. F.



1989

OCT. 27 1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Pag.
Introducción	1
Objetivos	3
1.0 Generalidades sobre <u>Cryptosporidium</u>	4
1.1 Aspectos históricos	4
1.2 Taxonomía	6
1.3 Ciclo biológico	9
1.4 Morfología	13
1.5 Epidemiología	16
2.0 Manifestaciones clínicas	18
2.1 Criptosporidiosis en personas inmunocompetentes	19
2.2 Criptosporidiosis en personas inmunodeficientes	20
2.2.1 Patogenia por el virus HIV	21
2.2.2 Complicaciones por <u>Cryptosporidium</u>	27
2.3 Mecanismo patogénico y de mala absorción	28
3.0 Diagnóstico	32
3.1 Métodos para concentración de oocistas	34
3.1.1 Flotación con sulfato de zinc	34
3.1.2 Flotación con solución de Sheather	34
3.1.3 Sedimentación por el método de Ritchie	35
3.2 Técnicas de tinción	37
3.2.1 Ziehl-Neelsen, modificada	37
3.2.2 Jenner-Giemsa	37
3.2.3 Carbol-fuchsina con dimetil sulfóxido	38
3.2.4 Safranina-azul de metileno	39
3.2.5 Kinyoun en frío, modificada	39
3.2.6 Tinción negativa para microscopía electrónica	40
3.3 Técnicas inversas	41
3.3.1 Inmunofluorescencia Indirecta	41
3.3.2 Técnica de ELISA, modificada	43
3.4 Fijación y conservación de oocistas	46
4.0 Discusión sobre métodos de diagnóstico	48
5.0 Desarrollo de <u>Cryptosporidium</u> en un medio de cultivo	51
6.0 Tratamiento	54
7.0 Discusión general	57
Conclusión	59
Bibliografía	60

INTRODUCCION

Las parasitosis en México constituyen un tema interesante y de gran trascendencia debido a que, desafortunadamente, padecemos la presencia de gran cantidad de parásitos y sus consecuencias.

A pesar de que se han observado adelantos dentro de la parasitología clínica, el conocimiento total de muchos parásitos es apenas considerable. Una mayoría de estos organismos invaden el tracto gastrointestinal provocando síntomas imprecisos y variados, y el grado de agresividad del padecimiento que producen depende, en gran parte, de las condiciones del huésped en lo que se refiere a su estado inmunológico y de nutrición.

Durante la última década, el interés sobre un parásito llamado Cryptosporidium ha aumentado, más aún por la creciente incidencia en personas inmunodeficientes, sobre todo en aquellas que padecen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Anteriormente se conocía como una causa bien definida de diarrea en animales, pero se empezó a tener noticias de casos humanos en diferentes partes del mundo, incluyendo a México.

Las investigaciones que se han realizado hasta ahora acerca del Cryptosporidium, han esclarecido bastante el conocimiento de la biología de éste, pero no por completo. - El Cryptosporidium es un protozoario perteneciente al grupo de los coccidios, se aloja principalmente en el tracto gastrointestinal y el síntoma más común que produce es una diarrea, que en niños mal nutridos y en pacientes inmunodeficientes, puede ser crónica. El hecho de que dicho parásito se puede transmitir de persona a persona aumenta el índice de propagación.

En lo que se refiere al diagnóstico, se realizaba en tejidos por medio de biopsias, pero se ha demostrado que los exámenes en heces, realizados con técnicas de tinción y auxiliados con métodos de concentración, dan mejores resultados por la facilidad y rapidez del proceso, así como el bajo costo de las mismas.

La ignorancia de muchos aspectos sobre el Cryptosporidium y como consecuencia la falta de un tratamiento específico, enfatiza la necesidad e importancia de ampliar más - las investigaciones.

OBJETIVOS

El propósito de la realización de este trabajo es el siguiente:

- Adquirir conocimiento acerca de un parásito oportunista llamado Cryptosporidium, que se ha descubierto recientemente en el organismo humano; mostrando aspectos generales sobre su desarrollo, manifestaciones clínicas, diagnóstico y posible tratamiento.

- Describir algunos métodos para la identificación del Cryptosporidium que, por sus características, provean mejores resultados y se puedan adaptar en un laboratorio clínico.

La recopilación de información se hará a partir de -- 1976, fecha en la que se documentó el primer caso de Cryptosporidiosis humana.

1. GENERALIDADES SOBRE CRYPTOSPORIDIUM

1.1 Aspectos históricos

La primera descripción y el nombre del Cryptosporidium se le atribuyen a Tyzzer que, en 1907 lo observó en la mucosa gástrica de un ratón de laboratorio, Leger en 1911 lo asignó a la familia a la que pertenece y Slavin en 1955 - confirmó la presencia de diarrea aguda en perros infectados por este parásito, lo cual contribuye que a partir de esa fecha se efectuen numerosos estudios con el propósito de saber más acerca del Cryptosporidium(41,13). Los resultados que arrojaron algunas de estas investigaciones fueron, la presencia de una variedad de especies a las que se clasificó de acuerdo al huésped, en el cual se les había encontrado.

Tzipori y colaboradores dudaron de esta clasificación, por lo que realizaron experimentos de infección cruzada entre diferentes animales, incluyendo perros, ratones, becerros, cabras y pollos y concluyeron que, debido a la amplia discrepancia del huésped y a la necesidad de especificidad de tejido por parte del parásito, podía existir una sola especie en el género Cryptosporidium. Durante este -

periodo, el concepto de Criptosporidiosis definida como -- una infección asintomática y rara, cambió a una causa im-- portante de enterocolitis y diarrea en varias especies in- cluyendo al hombre (13).

El primer caso de Criptosporidiosis humana se reportó - en 1976, en una niña de 3 años atendida en el hospital de la Universidad de Vanderbilt, Estados Unidos (43); y el - primero descubierto en México fue en 1984, en un paciente homosexual de 38 años de edad atendido en el hospital de - Infectología del Centro Médico La Raza (3).

1.2 Taxonomía.

El Cryptosporidium es un género que pertenece a la familia Cryptosporidiidae, suborden Eimeriina, orden Eucoccidida, subclase Coccidia, clase Esporozoa y phylum Apicomplexa. Actualmente, el suborden Eimeriina tiene 13 familias y alrededor de 1,500 especies conocidas; sin embargo, la mayoría de éstas pertenecen al género Eimeria y en menor extensión a Isospora. La familia Cryptosporidiidae tiene un sólo género que es el Cryptosporidium y aproximadamente 11 especies (51), en las cuales la diferenciación morfológica se ha basado en las especies del huésped del cual se ha obtenido; por ejemplo, a los organismos que se han observado en el mono Rhesus, se les denominó Cryptosporidium rhesi, a los que se han encontrado en ratones se les llamó Cryptosporidium muris y así sucesivamente (41). Aunque tal suposición atribuye que las especies de Cryptosporidium son específicas para cada huésped, esto es efectivo sólo para muchos organismos que pertenecen al suborden Eimeriina, ya que de acuerdo a resultados obtenidos en varios estudios experimentales, en los que se han realizado

infecciones cruzadas de Cryptosporidium entre diferentes mamíferos, se deduce que hay mucho menos huéspedes específicos de Cryptosporidium que como se piensa, y por lo cual, puede haber otros cambios en la nomenclatura dentro de este género (41,51).

Por ahora, sólo cuatro nombres de especies se consideran como válidas dentro de la nomenclatura, y éstas son:

Cryptosporidium muris; (Tyzzer, 1907), en mamíferos.

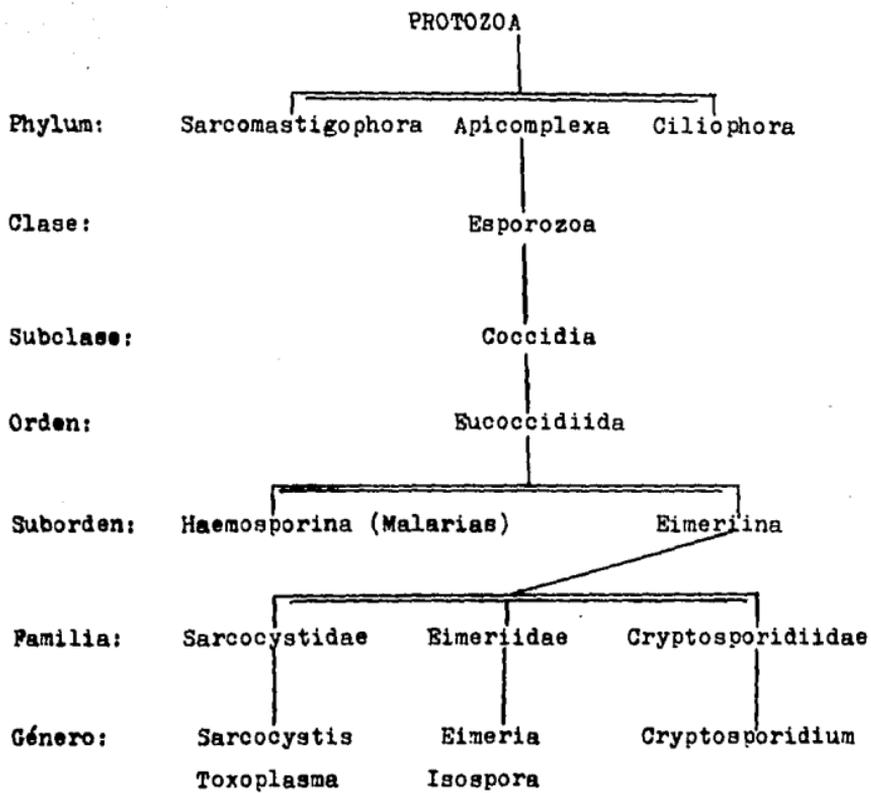
Cryptosporidium meleagridis; (Slavin, 1955), en pájaros

Cryptosporidium crotali; (Triffit, 1925), en reptiles.

Cryptosporidium nasorum; (Hoover y col.,1981), en peces

(34).

La posición del Cryptosporidium en relación con otras especies de importancia médica se muestra en el siguiente esquema (3,13,41).



1.3 Ciclo Biológico.

El ciclo de vida del Cryptosporidium es similar al de otros microorganismos de la clase Esporozoa. Los esporozoarios se pueden desarrollar de dos maneras: Heteroxénica en la cual necesitan dos huéspedes para completar su ciclo; o monoxénico, donde el desarrollo sucede en un solo huésped. En cualquiera de las dos formas se realiza una alternación de una fase sexual y una asexual (3,41); por ejemplo el Plasmodium lleva a cabo su reproducción asexual dentro de los eritrocitos humanos, mientras que la fase sexual ocurre en el mosquito anófeles (28).

El Cryptosporidium lleva a cabo su ciclo de vida de una manera monoxénica, el cual lo dio a conocer Iseki, en 1979 (45).

Fase asexual.- La infección comienza con la ingestión de un ooquiste, que es la etapa infectante, conteniendo cuatro esporozoítos, los cuales se liberan durante la digestión parcial del ooquiste, debido a la acción de enzimas digestivas cuando pasa a través del estómago (41). El esporozoíto tiene que alcanzar la célula huésped intesti-

nal adecuada, colocándose en una posición pseudoexterna; de esta manera evoluciona para convertirse en un trofozoíto - nutriéndose de la célula misma o de las que se encuentran a su alrededor. El trofozoíto se considera la etapa más - joven del parásito, contiene organelos citoplasmáticos eucarióticos y lleva a cabo la esquizogonia (generación múltiple) para dar lugar a un esquizonte con ocho merozoítos llamados de primera generación (13,41). Estos son de forma alargada y ya liberados se adhieren a otras células, para difundir de esta manera la infección; entonces se redondean llevándose a cabo un segundo proceso de esquizogonia, para formar esquizontes con cuatro núcleos que dan lugar a cuatro merozoítos llamados de segunda generación; estos merozoítos invaden nuevas células, pero esta vez evolucionan para dar lugar a macrogametocitos o microgametocitos (13,41).

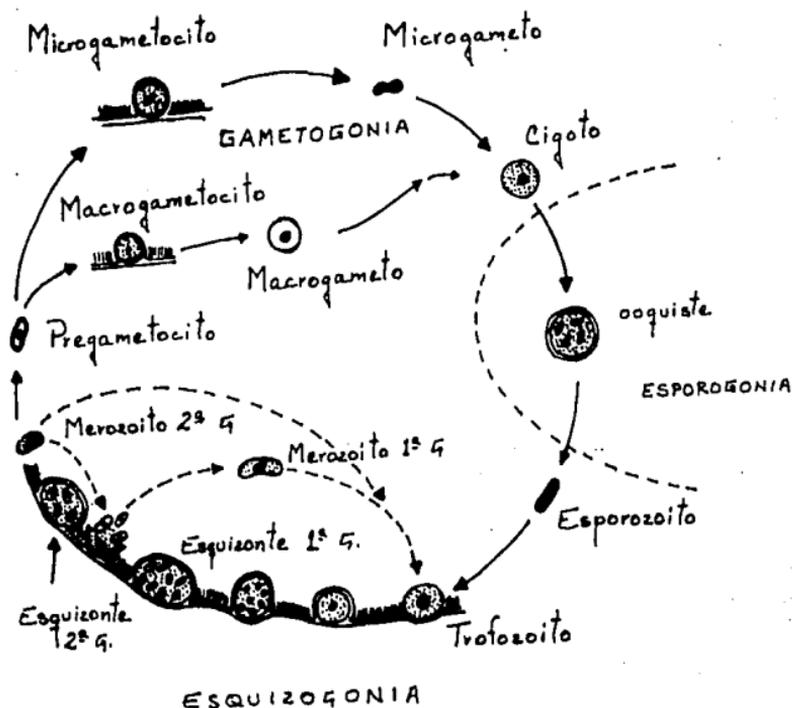
Fase sexual.- El macrogametocito sufre ciertos cambios para dar lugar a un macrogameto, mientras que el microgametocito sufre una división nuclear produciendo varios microgametos; el número exacto no se conoce pero está alrededor

de 12 a 16; éstos contienen un núcleo alargado, una mitocondria y un anillo polar de microtúbulos que podría equivaler a un flagelo auxiliar en un movimiento que no se ha definido, lo que hace pensar que la locomoción se complementa por una forma de deslizamiento o flexión (13,41).

El microgameto se libera dentro del lumen intestinal y se une a un macrogameto para dar lugar a un cigoto, el cual derivará posteriormente en un ooquiste; éste cuando está maduro contiene cuatro esporozoítos, así se libera y sale del cuerpo humano en las heces fecales. Existen varias suposiciones referentes a la formación de los esporozoítos (etapa esporogónica); se dice que probablemente se forman mientras que el ooquiste se encuentra adherido a la célula epitelial intestinal, o cuando éste ya se ha liberado. Otra idea es que el cigoto desarrolla un ooquiste con una pared muy delgada por lo que los esporozoítos se pueden liberar fácilmente dentro del huésped (13,41).

El ciclo biológico completo del Cryptosporidium se realiza durante 4 a 5 días aproximadamente (45).

El ciclo biológico se esquematiza de la manera siguiente:



La trayectoria por la que posiblemente un merozoito de primera o segunda generación puede reiniciar la esquizogonia se muestra con líneas punteadas (3,13,41,47).

de 12 a 16; éstos contienen un núcleo alargado, una mitocondria y un anillo polar de microtúbulos que podría equivaler a un flagelo auxiliar en un movimiento que no se ha definido, lo que hace pensar que la locomoción se complementa por una forma de deslizamiento o flexión (13,41).

El microgameto se libera dentro del lumen intestinal y se une a un macrogameto para dar lugar a un cigoto, al cual derivará posteriormente en un ooquiste; éste cuando está maduro contiene cuatro esporozoítos, así se libera y sale del cuerpo humano en las heces fecales. Existen varias suposiciones referentes a la formación de los esporozoítos (etapa esporogónica); se dice que probablemente se forman mientras que el ooquiste se encuentra adherido a la célula epitelial intestinal, o cuando éste ya se ha liberado. Otra idea es que el cigoto desarrolla un ooquiste con una pared muy delgada por lo que los esporozoítos se pueden liberar fácilmente dentro del huésped (13,41).

El ciclo biológico completo del Cryptosporidium se realiza durante 4 a 5 días aproximadamente (45).

Confeción de cubeta individual.-

Se adaptan dos hojas de cera para bases sobre los dientes pilares remanentes hasta llegar a la flexión de la mucosa alveolar. Todas las superficies expuestas de yeso se pintan con esmalte. Se prepara una hoja de acrílico autocurable mediante una compresión entre dos hojas de papel encerado lubricado. Se adapta sobre el modelo modificado y se le agrega un manguito. Mientras la resina acrílica todavía se haya en estado elástico se corta el exceso con bisturí y se recorta todo el acrílico que se haya sobre los pilares hasta el nivel gingival. Se practican estos agujeros para descubrir los colados para una técnica de doble mezcla. Los tejidos blandos y los dientes naturales intactos se impresionan con elastómero y los colados del anclaje con yeso. Las ansas de retención con clips para papel se fijan a cada lado de los orificios mediante acrílico plástico. Después de la polimerización se retiran del modelo, la cubeta y la cara de alivio.

La cubeta individual se ajusta hasta la flexión de la mucosa alveolar en las caras vestibulares y en la cresta milohioidea en la cara lingual.

IMPRESIONES PARA ADITAMENTOS INTERNOS

Prueba de la cubeta individual.-

Conviene probar la cubeta de acrílico para asegurarse que se le puede colocar y retirar sobre los colados sin que haya interferencia. Se recomienda controlar la exposición total de los colados por vestibular y lingual.

Recorte muscular con godiva y preparación de la cubeta.-

Se agrega lápiz de compuesto de modelar a los bordes de la cubeta individual por cuadrantes y se efectúa el recorte muscular por cuadrantes mediante la técnica de deglución. Las ventanas de las coronas venoer se ocluyen con cera plástica y se adaptan dos capas de cera sobre todos los colados de los pilares. La cera de alivio se utiliza para evitar el contacto de los elastómeros, esto se requiere, pues es imposible recolocar los colados en la gafa de yeso si las caras vestibular y lingual, contactan con la goma.

El ciclo biológico se esquematiza de la manera siguiente:



La trayectoria por la que posiblemente un merozoito de primera o segunda generación puede reiniciar la esquizogonia se muestra con líneas punteadas (3,13,41,47).

1.5 Morfología.

Los detalles de las diferentes etapas del Cryptosporidium se conocen gracias a los hallazgos realizados, mediante la microscopía electrónica, en biopsias rectales o intestinales, observándose lo siguiente:

- El trofozoíto se desarrolla dentro de una especie de vacuola, por lo que su citoplasma se encuentra rodeado por cuatro membranas. Se cree que el origen de las dos membranas externas son de la célula del huésped mientras que las dos internas pertenecen al parásito; si es así, se afirma la teoría de que la posición del microorganismo es intracelular pero extracitoplasmático. El trofozoíto forma una zona densa electrónica de adherencia en su interfase con la célula huésped (43,45).

- El trofozoíto es un organismo redondo que mide de 1.5 a $6.0\mu\text{m}$. de diámetro, contiene un núcleo simple, un nucleolo alargado y abundante retículo endoplasmático que llena la mayor parte del citoplasma (13,43).

- El esporozoíto tiene una forma alargada midiendo en promedio de 1 a $6\mu\text{m}$. por $0.75\mu\text{m}$. (45).

- El esquizonte de segunda generación con merozoítos en maduración mide en promedio 4.4μ m. de diámetro, se le observan de 2 a 4 nucleos, un nucleolo simple y una envoltura nuclear independiente (45).

- Los merozoítos maduros contienen gránulos densos, retículo endoplasmático, unos microtúbulos o fibrillas que terminan en un anillo polar y una zona densa en el centro, lo cual indica que es una estructura conoidal. Los merozoítos de segunda generación son un poco más pequeños que los de primera generación, ya que miden en promedio 4μ m. mientras que los otros miden aproximadamente 5μ m. (13,45).

- Los macrogametos miden 5.3 por 5.2μ m. y se reconocen por sus gránulos densos y granulillos que parecen estar compuestos de polisacáridos (13,45).

- Los microgametos miden 2μ m. por 0.7μ m. y contienen como ya se mencionó, un núcleo alargado, una mitocondria y un anillo polar (45).

- El microgametocito mide en promedio 4.5μ m. de diámetro (45).

- El ooquiste es esférico o ligeramente ovoide que mide

de 4 a 5 μ m. de diámetro. Se han descrito dos clases de -
ellos: uno autoinfectante, porque está formado de una pa--
red delgada y puede liberar fácilmente los merozoítos; y -
otro de pared gruesa que se excreta en las heces fecales -
y es responsable de transmitir la enfermedad (13,41,43).

1.5 Epidemiología.

La Criptosporidiosis puede manifestarse de una manera asintomática, por lo que existen numerosos reservorios peligrosos para la propagación de la enfermedad impidiendo, por lo consiguiente, valorar exactamente su incidencia(41).

Se han realizado estudios en diferentes partes del mundo con el fin de conocer las vías por las que el Cryptosporidium puede contraerse y transmitirse, concluyéndose que, en general, el modo principal de transmisión es indudablemente por diseminación bucofecal de los ooquistes, ya que éstos se han encontrado casi exclusivamente en heces y además se ha demostrado experimentalmente en varias especies animales (41,51). La transmisión del parásito por medio de heces contaminadas sucede en forma directa o indirecta. Por ejemplo se realiza directamente durante prácticas sexuales en las que exista contacto bucoanal (3,38,41). Una forma indirecta se presenta cuando el agua, comida o cualquier otro fómite se expone al medio fecalmente contaminado (9).

- Otras maneras donde existe mayor riesgo de transmi---

sión son: centros hospitalarios y guarderías de cuidado -- diario (4,31).

- El contacto estrecho con animales domésticos y/o de granja, encontrándose con mayor frecuencia al Cryptosporidium en: perros, gatos, becerros, borregos, cabras, monos, reptiles y aves. Es por esto que se piensa que la Criptosporidiosis es una enfermedad zoonótica (9,20,51).

- Viajes continuos al extranjero, sobre todo lugares como Costa Rica, Leningrado, Africa y Estados Unidos de Norteamérica, donde la incidencia es mayor (9,27,30).

- El descubrimiento de que el Cryptosporidium se ha encontrado adherido a la mucosa de la faringe humana, considera la posibilidad de que pueda haber transmisión por contacto continuo con secreciones orales (32,39).

2. MANIFESTACIONES CLINICAS

La infección por Cryptosporidium se caracteriza clínicamente por un periodo de incubación relativamente corto que varía entre 1 a 12 días con una media de 6 a 7 en promedio después del contacto inicial con el organismo, diarrea acuosa, dolor abdominal, nauseas, vómito, anorexia y pérdida de peso; la fiebre se presenta en pocas ocasiones. La severidad de estos síntomas está determinado por el estado inmunológico de la persona (3,13,14).

A continuación se dan más detalles de las manifestaciones clínicas en personas inmunocompetentes e inmunodeficientes.

2.1 Criptosporidiosis en personas inmunocompetentes.

Los síntomas de la infección se presentan levemente en las personas que tienen una función inmunológica normal. - La diarrea es acuosa y mal oliente con un promedio de evacuaciones de 1 a 3 por día, las cuales representan una pérdida de fluidos de 1 a 3 litros por día y con una duración que varía de 1 a 30 días con una media de 12 a 14; se ha comprobado que aún cuando la diarrea ha terminado los oocistos continúan excretándose por más de dos semanas -- (20,49). También se manifiestan deshidratación, debido a la pérdida de fluidos y por consiguiente descenso en el peso corporal; anorexia y vómito que sobrevienen con más frecuencia y en algunos casos son los síntomas iniciales (13), dolor abdominal que tiende a aparecer en el cuadrante superior derecho y fiebre moderada de 37.5 a 38.5°C. (20,41,54).

Cuando hay complicación con algún otro patógeno como: - Salmonella, Shigella, Campylobacter, Entamoeba histolytica o Giardia lamblia, los síntomas son más severos (45). La incidencia de Criptosporidiosis con respecto a la edad es: en niños con menos de un año a 10 años y en adultos entre 21 a 30 años, siendo más severa en los niños (8,13,50).

2.2 Criptosporidiosis en personas inmunodeficientes.

Recientemente, el Cryptosporidium ha tenido un incremento de incidencia en personas que sufren alguna alteración en el funcionamiento de su sistema inmunológico, como sucede en los casos de hipogammaglobulinemia, tratamiento con fármacos inmunosupresivos y en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (33,46).

Este síndrome (SIDA) es una nueva entidad nosológica caracterizada por deterioro de la inmunidad celular, propiciando la facilidad de contraer infecciones crónicas, oportunistas por protozoarios, micobacterias, hongos o virus, así como neoplasias linfáticas o sarcoma de Kaposi (2,3).

La causa del SIDA ha originado grandes controversias; primeramente, cuando la enfermedad parecía limitada a homosexuales promiscuos, se creía que dependía de un agente ambiental tóxico como el nitrito de amilo que se utiliza como un estimulante sexual, aunque el efecto inmunosupresor no se comprobó (18).

Una segunda hipótesis sugirió que el defecto inmune básico se debe a una sobrecarga antigénica, basándose en que

los homosexuales se exponen constantemente al semen, el -
cual puede pasar al torrente sanguíneo a través del tejido
rectal desgarrado durante las relaciones sexuales anales.
El cuerpo identifica al semen como un antígeno y reacciona
produciendo anticuerpos que actúan como autoanticuerpos, -
ya que su acción no sólo se dirige hacia el semen, sino -
también contra las células del cuerpo humano y en particu-
lar los linfocitos T, produciéndose la inmunosupresión. -
Tampoco esto se ha comprobado (18).

Estudios más recientes afirman que el agente causal es
un retrovirus que se ha colocado en el grupo de virus de -
leucemia de células T humanas. Como ya existen dos tipos
de estos virus, el nuevo relacionado con el SIDA, se le ha
llamado virus linfotrópico de células T humanas tipo III o
HTLV-III, ya que no produce leucemia (18). A últimas fe-
chas la denominación para este virus es HIV.

2.2.1 Patogenia por el virus HIV

Como todo virus, los retrovirus se reproducen únicamen-
te en las células vivas de una especie que les sirve de -

huésped. Lo que distingue a los retrovirus es su método singular de reproducción, en la que interviene una enzima llamada transcriptasa inversa, la cual deja que el virus copie la información genética de éste en una forma que pueda integrarse en el propio código genético de la célula huésped. Cada vez que se divide una célula huésped se reproducen copias virales junto con más células huésped, cada una de las cuales contiene el código viral. Una vez que el virus penetra una célula huésped, la infección es permanente. No obstante, un retrovirus puede no causar ningún efecto adverso por muchos años. Luego, en ciertas circunstancias desconocidas, puede que el material genético de la célula huésped se active y produzca nuevos virus. Estos pueden ser liberados por las células huésped o infectar a otras.

El sistema inmunológico humano está formado por un sistema complejo de células y órganos; una falla en cualquier componente puede perturbar a todo el sistema. Se cree que los trastornos del sistema inmunológico relacionados con el SIDA, se originan de un solo defecto en particular: de

la depleción gradual de un grupo especializado de glóbulos blancos denominados linfocitos T inductores o linfocitos T-4. Dichas células juegan un papel clave en la regulación de la reacción inmunitaria: la ponen en marcha. Envían señales químicas que estimulan la producción de anticuerpos y activan la maduración de varios tipos de células del sistema inmunológico (19).

El virus HIV sólo infecta al grupo de linfocitos T inductores o cooperadores, por lo tanto, puede ser que el defecto subyacente en el SIDA sea por la escasez de este tipo de células. Al disminuir las células T cooperadoras se originaría un deterioro de la respuesta de anticuerpos de la célula B, ya que las primeras prácticamente dan "permiso" a las células B, para producir el anticuerpo específico para determinado antígeno, y también ayudan a aumentar la producción de células B; también se reduciría la respuesta de las células T citotóxicas y T supresoras al antígeno y más aún, originaría una disminución en la producción de sustancias conocidas como linfocinas, que activan los diversos leucocitos, incluyendo a los linfocitos (18).

Debido a esta disminución de células T cooperadoras, la razón de células T cooperadoras/ células T supresoras, está invertida (18,33).

En resumen, una hipótesis del proceso patogénico se puede explicar de la siguiente manera:

a. Infección: El virus infecta un linfocito T cooperador quizá de un solo grupo particular de estas células.

b. Activación de células T: El virus se replica con mayor frecuencia si las células se encuentran en estado de activación, que ocurre con la presencia de un antígeno. Entonces las células T se dividen rápidamente para producir una clona de células genéticamente idénticas, capaces de combatir al antígeno. En el SIDA, algunos cofactores antigénicos como infecciones virales anteriores, múltiples infecciones por enfermedades de transmisión sexual, aplicaciones de productos hematológicos, etc... pueden activar la célula T (18).

c. Replicación: En la célula T cooperadora activada, el virus puede replicarse y diseminarse en una proporción mayor que las células T cooperadoras. Quizá sean necesarios

varios ciclos anteriores para que el agotamiento de células T origine inmunodeficiencia clínica, lo cual explicaría el periodo de latencia variable y prolongado, antes que se manifiesten los síntomas clínicos (18).

La infección del virus no sólo agota las células T cooperadoras, sino que también puede impedir que las células sobrevivientes funcionen debidamente. Estas se ven imposibilitadas de reconocer sustancias extrañas y de iniciar reacciones inmunitarias a estos antígenos, a fin de poderlos eliminar del organismo. No obstante, la pérdida de la inmunidad es selectiva y afecta primordialmente las partes del sistema inmunológico que intervienen en la defensa contra organismos víricos y hongos (19). Así pues, como se mencionó anteriormente, los pacientes con SIDA están propensos al ataque de infecciones oportunistas, entre las que se encuentran:

Infecciones virales: Herpes simple, Citomegalovirus.

I. bacterianas: Salmonella typhimurium, Mycobacterium tuberculosis.

I. micóticas: Candida albicans, Cryptococcus neoformans

I. protozoariales: Pneumocystis carinii, Toxoplasma gondii, Cryptosporidium sp (18,55).

El Cryptosporidium afecta severamente a una persona inmunodeficiente provocando comúnmente los siguientes síntomas clínicos: diarrea acuosa y mal oliente que dura desde unas semanas a varios meses o años, incluso puede permanecer de por vida, el número de evacuaciones son en promedio de 10 a 25 veces por día lo que ocasiona una pérdida de fluidos de 1 a 10 litros diarios y un marcado descenso de peso corporal, que corresponden a más del 50% del peso inicial (13,41,45).

La cronicidad de la diarrea se atribuye al hecho de que el Cryptosporidium puede iniciar varias veces la esquizogonia durante su desarrollo, originando nuevos ciclos biológicos (13,41). La deshidratación se presenta a veces tan aguda que es necesario administrar nutrientes por vía parenteral (45,46). El vómito, que también se manifiesta con frecuencia al igual que las náuseas, puede aumentar la pérdida de fluidos y por lo tanto la deshidratación es mayor. La intensidad del dolor abdominal y la fiebre, se de

ben a la complicación de otras infecciones (13,41).

Otros datos de laboratorio que no se atribuyen tanto a la infección por Cryptosporidium son: anemia progresiva, - aumento en los niveles séricos de inmunoglobulinas G y M, linfopenia, linfadenopatía, esplenomegalia, trombocitopenia y leucopenia (15,25,48,55).

2.2.2. Complicaciones por Cryptosporidium.

La Criptosporidiosis intestinal severa, puede causar - complicaciones fatales en huéspedes inmunocomprometidos, - ya sea afectando la vesícula biliar causando colecistitis, en la cual el paciente sufre de dolor abdominal en el cuadrante superior derecho y una elevación en los niveles de fosfatasa alcalina; o bien afectando el tracto respiratorio causando neumonía con o sin presencia de tos y abundante expectoración blanquecina (22,24,32,45).

2.3 Mecanismo patogénico y de mala absorción.

La infección comienza cuando el Cryptosporidium forma una unión fija a la superficie de la mucosa intestinal, - por medio de ciertas cargas electromagnéticas y por la acción de puentes de cationes divalentes o por proteínas con enlace glucosa-glucosa, facilitando así la colonización - del parásito en la superficie mucosa. Una vez que se realiza esta unión sigue la penetración a la célula epitelial y el comienzo del desarrollo del patógeno, estableciéndose una relación inicial entre éste y el huésped, a la cual se le atribuye la mayor parte de los cambios que sufre la mucosa y vellosidades intestinales (13).

La mucosa intestinal actúa como una membrana semipermeable y durante un proceso normal, el paso de agua en ambas direcciones de la pared intestinal, se realiza por medio de transporte pasivo dependiendo del gradiente osmótico, - de manera que el contenido intestinal tiende a ser isosmótico con el plasma (10). Los gradientes de presión se establecen por la absorción de solutos, mientras que el agua pasa a través de la membrana para mantener el equilibrio -

osmótico (13). La absorción de sodio desempeña un papel - importante porque rige la cantidad de agua en el intestino; también se lleva a cabo otro proceso llamado secreción que se realiza por medio del jugo intestinal, rico en contenido de enzimas como la lactasa. Los carbohidratos utilizables en la dieta son hidrolizados hasta disacáridos o mono sacáridos, algunos de éstos son absorbidos por transporte activo, mientras que otros se absorben pasivamente para pa sar finalmente al torrente sanguíneo (10).

Como se ha mencionado anteriormente, la diarrea acuosa es el síntoma más característico de la Criptosporidiosis, y la mala absorción de productos nutrientes está relacionado con la localización del Cryptosporidium, ya que por lo general se sitúa en la porción final del intestino delgado lugar donde se sabe, es el punto más específico para la ab sorción neta de fluidos (2). Durante un proceso de mala - absorción, cualquier nutriente soluble en agua ocasionará la retención de ésta dentro del lumen, causando diarrea - por desequilibrio osmótico. Por lo consiguiente, surge una deficiencia de flujo, tanto del agua como de los nutri-

entes, desde el lumen hacia los compartimientos plasmáticos (absorción); o bien una acumulación neta de fluidos en la que el agua y los electrolitos pasan al lumen desde el plasma (secreción); originando con esto último una deficiencia enzimática (por ejemplo de la lactasa) y, como consecuencia, una intolerancia a los disacáridos (en este caso la lactosa) (10,13).

La lactosa que se encuentra con el agua dentro del lumen no se absorbe, por lo que pasa al colon donde se hidroliza por medio de las enzimas bacterianas, formando monosacáridos que se metabolizan en parte, pero se absorben mal, provocando un doble aumento de solutos y agua en el colon, sobreviniendo una diarrea fermentativa (10,13). Se dice que si el 5% en promedio de carbohidratos derivados de la dieta penetrara en el colon, se produciría una presión de 100 miliosmoles (mOsm) capaces de retener 300 cm^3 de agua en el intestino, por lo tanto la fermentación de azúcares a ácidos estimularía un aumento adicional de líquidos seis veces mayor, es decir 18 litros de agua con nutrientes no absorbidos. Quizá a esto se deba el olor fétido de las -

heces, característico de la Criptosporidiosis (13).

El proceso de mala absorción se ha evaluado en diversos estudios realizando el método siguiente:

Consiste en determinar la excreción urinaria de D-xilosa a las cinco horas posteriores a la administración oral de 25.0 g. de D-xilosa; recolectando la orina excretada durante ese tiempo. También se hace una determinación sanguínea después de dos horas de haber tomado la dosis. Los valores que se obtienen son inferiores al rango normal que es: en orina de 4.0 a 8.0 g. y en sangre de 1.70 mg% (40,53).

3. DIAGNOSTICO.

La investigación de un mal diarreico sin complicaciones comprende una gran proporción de trabajos en el laboratorio microbiológico, para su diagnóstico; fallando en muchas ocasiones en la detección del agente causante (26). - Recientemente los histopatólogos, inmunólogos y microbiólogos, han puesto mayor interés en las investigaciones sobre infecciones oportunistas que afectan el tracto gastrointestinal, en los que se encuentra el Cryptosporidium, que se está manifestando casi con igual frecuencia que otros patógenos conocidos, tales como Giardia lamblia, Entamoeba histolytica, Shigella y Salmonella (13,42).

A partir del primer caso de Criptosporidiosis humana, - el diagnóstico se realizó en tejido por medio de biopsias y microscopía electrónica (33), pero en 1981, Tzipori hizo la primera identificación del Cryptosporidium en frotis fecales teñidos con colorante de Giemsa, por lo que actualmente se ha adoptado esta manera de diagnóstico (45). Se han realizado diversos estudios comparativos con el fin de desarrollar un método rápido, sencillo y lo suficientemente sensible para la identificación del parásito, aunque es

to depende en gran parte del cuidado que se tenga al realizar la técnica y también de la experiencia para reconocer al patógeno (41). A continuación se describen algunos métodos que han dado mejores resultados para este propósito.

3.1 Métodos para concentración de oquistes.

3.1.1 Flotación con sulfato de zinc (técnica Faust).

- Hacer una suspensión con agua de una pequeña muestra de heces y colar a través de una gasa.

- Centrifugar durante 45 a 60 segundos a 3,000 rpm.

- Decantar el sobrenadante, agregar más agua y volver a centrifugar. Repetir esta operación tres veces aproximadamente.

- Decantar el último sobrenadante y agregar sulfato de zinc con una densidad de 1.180. Centrifugar durante 45 a 60 segundos a 3,000 rpm.

- Tomar una asada de la superficie del sobrenadante y colocarlo en un portaobjetos para observar en fresco o dejar secar para teñir posteriormente (1,36).

3.1.2 Flotación con solución de Sheather.

- Preparar reactivo de Sheather con 500 g. de sacarosa, 320 cc. de agua destilada y 6.5 g. de fenol en cristales.

- Mezclar aproximadamente 5 g. de heces con el reactivo

y llenar un tubo de centrifuga con esta mezcla.

- Centrifugar durante 5 minutos a 1,500 rpm.

- Colocar un cubreobjetos sobre el tubo para que los oocistos se adhieran a él y colocarlo después en un portaobjetos, para hacer una observación en fresco; o bien hacer un frotis para teñir posteriormente (16). Una modificación de este método, es usar un tubo de centrifuga con rosca para tapanlo y evitar la "aerosolización" de los oocistos del parásito. Después de centrifugar tomar una asada del sobrenadante y colocarla en un portaobjetos. Los oocistos suben a la superficie del sobrenadante debido a la densidad de la solución de azúcar que es de 1.27 (16).

3.1.3 Sedimentación por el método de Ritchie.

- Emulsionar 5 g. aproximadamente de heces con agua destilada.

- Centrifugar a 2,500 rpm. durante 3 a 5 minutos.

- Decantar, agregar al sedimento 1 ó 2 cc. de formol al 10% y dejar reposar durante 5 minutos.

- Añadir 1 ó 2 cc. de éter sulfúrico y agitar.

- Centrifugar durante 3 a 5 minutos a 3,000 rpm.
- Decantar el sobrenadante y observar el sedimento en fresco, o hacer un frotis delgado para teñirlo (14,36).

3.2 Técnicas de tinción.

3.2.1 Ziehl-Neelsen, modificada.

- Preparar un frotis fecal y fijarlo con calor.
- Cubrir el frotis con carbolfuchsina y calentar hasta emisión de vapores.
- Dejar actuar el colorante durante 5 minutos; si empieza a secarse el colorante, agregar más pero sin calentar.
- Lavar con agua.
- Decolorar con ácido sulfúrico al 5% durante 30 segundos o el tiempo necesario hasta que el frotis tome un color amarillo al agregar más ácido.
- Lavar con agua y contraañir con azul de metileno (solución Loeffler) durante un minuto.
- Enjuagar y dejar secar para observar al microscopio, en objetivos 10 x, 40x y aceite de inmersión (1,7).

3.2.2 Jenner-Giemsa.

- Fijar el frotis con alcohol metílico durante 10 mins.
- Teñir durante 4 minutos con solución diluida de colorante de Jenner en proporción de 1:4 con agua amortiguada

con fosfato a pH= 6.8 (solución buffer).

- Sin lavar, agregar colorante de Giemsa diluido con solución buffer en proporción de 1:9 durante 10 minutos.

- Lavar con solución buffer. Después, cubrir el frotis con el buffer y dejar actuar durante 10 minutos.

- Escurrir el frotis y dejar secar para su observación al microscopio (36,45).

3.2.3 Carbol-fuchsina con dimetil sulfóxido.

- Disolver 4 g. de cristales de fuchsina básica en 25cc. de alcohol al 99% y agregar 12 g. de cristales de fenol disueltos en baño María. A esta mezcla, adicionar 25 cc. de glicerol Q.P., 25 cc. de dimetil sulfóxido y 75 cc. de a--gua destilada. Dejar reposar 30 minutos y filtrar. Para la solución de contraste, mezclar 220 cc. de solución acuosa al 2% de verde malaquita con 30 cc. de ácido acético -glacial 99% y 50 cc. de glicerol Q.P.

- Fijar el frotis con metanol absoluto durante 5 a 10 -segundos.

- Teñir con solución de carbol-fuchsina durante 5 minu-

tos y lavar con agua.

- Contrateñir con solución de verde malaquita durante un minuto.

- Lavar con agua y dejar secar para observar al microscopio (11).

3.2.4 Safranina-azul de metileno.

- Fijar el frotis con ácido clorhídrico al 3% en metanol al 100% durante 3 a 5 minutos. Lavar con agua.

- Teñir con safranina acuosa al 1% durante 60 segs.

- Calentar hasta emisión de vapores, adicionar más colorante y seguir calentando si es necesario.

- Lavar con agua.

- Contrateñir con azul de metileno al 1% durante 30 segundos y después, lavar con agua.

- Dejar secar y observar al microscopio (7).

3.2.5 Método de Kinyoun en frío, modificada.

- Preparar un frotis fecal delgado y secarlo al aire.

- Fijar con metanol absoluto por pocos segundos.

- Cubrir el frotis con carbol-fuchsina mezclada con tergitol al 1% durante un minuto.

- Lavar con agua de la llave hasta que desaparezca el tono rosado.

- Decolorar con ácido sulfúrico al 10% durante unos segundos.

- Lavar inmediatamente para evitar la sobredecoloración.

- Contrateñir con verde brillante o azul de metileno durante 30 segundos.

- Lavar y dejar secar para observar al microscopio (21,36). Cuando se utiliza una muestra preservada, se recomienda teñir con carbol-fuchsina sin el tergitol durante 5 a 10 mins. para dar mejores resultados (45).

3.2.6 Tinción negativa para microscopía electrónica.

- Se prepara un frotis fecal y se fija con glutaraldehído al 0.5%, durante un minuto.

- Se tiñe con ácido fosfotúngstico al 0.5% o hasta 20% pH= 7.0; o con uranil acetato al 2% pH= 7.0 durante 10 minutos. Dejar secar para observar al microscopio (6).

3.3 Técnicas inversas.

Hasta ahora se han descrito técnicas por medio de las cuales se identifican ooquistes u otras etapas biológicas del Cryptosporidium en muestras fecales o en biopsias de tejido intestinal respectivamente. Recientemente, se han probado técnicas de inmunofluorescencia indirecta por las que se demuestra la formación de anticuerpos séricos frente al Cryptosporidium tanto en personas inmunocompetentes como en inmunodeficientes. Este tipo de ensayos consiste en conjugar químicamente colorantes fluorescentes con anticuerpos sin interferir con su función, exponiendo después el conjugado a los antígenos correspondientes en cortes de tejido o frotis de microorganismos. El punto de interacción antígeno-anticuerpo produce una fluorescencia que se observa mediante microscopía ultravioleta (28,36).

A continuación se describe una técnica basada en este principio:

3.3.1 Inmunofluorescencia Indirecta.

- En este caso se emplean porciones de ileon de ratón,-

fijados en etanol al 95%, infectados con Cryptosporidium.

- Hacer diluciones seriadas del suero problema de 1:10 a 1:2560 con solución buffer salino de fosfato pH= 7.2

- Agregar estas diluciones a las secciones de tejido de ratón a incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda (caja de petri con papel filtro humedecido con solución buffer).

- Enjuagar con la solución buffer.

- Cubrir las secciones de tejido con inmunoglobulina polivalente anti-humana (de conejo) conjugada con isotiocianato de fluoresceína diluido 1:320 e incubar por segunda vez durante 30 minutos a temperatura ambiente en la cámara húmeda.

- Lavar con la solución buffer para quitar el exceso de anticuerpo polivalente.

- Teñir con azul de evano durante un minuto.

- Lavar. Cubrir con solución de glicerina al 20% en solución buffer.

- Lavar con la solución buffer.

- Examinar la placa con aceite de inmersión, usando luz

ultravioleta y filtros adecuados.

- Buscar puntos fluorescentes de un tono verde manzana Interpretar los resultados de acuerdo a la intensidad de fluorescencia para cada una de las diluciones usadas (12).

3.3.2 Técnica de ELISA modificada.

El principio del análisis de inmunoabsorbencia ligada a enzimas, es medir la cantidad de anticuerpos o antígenos existentes en un suero problema, utilizando una antiglobulina unida a una enzima y un sustrato que se hidroliza con dicha enzima, obteniéndose finalmente un producto coloreado (18,38,36). Para esta técnica modificada, se emplean ooquistes purificados con solución saturada de cloruro de sodio, los cuales se someten posteriormente a un proceso de rompimiento para liberar los esporozoítos, mismos que actuarán como antígenos.

- Suspender los antígenos en 0.05 cc. de solución buffer de fosfato (PBS) pH= 7.4, para cubrir las microplacas con fondo de poliestireno en donde se realizará la técnica Mantener así a 4°C. durante 14 horas o más para que los an

tígenos se adhieran bien a las paredes.

- Eliminar la suspensión no adherida. Adicionar 0.1 cc de PBS con albúmina sérica bovina al 1% (PBS-BSA) y dejar reaccionar durante una hora a 37°C.

- Diluir el suero problema y un suero control negativo 1:10 con PBS-BSA. Trabajar los dos sueros de la misma manera para los siguientes pasos:

- Agregar a cada microplaca preparada, 0.045 cc de los sueros y dejar reaccionar durante una hora a 37°C., o toda la noche a 4°C.

- Lavar con PBS-BSA.

- Añadir 0.04 cc. de anticuerpo caprino conjugado con fosfatasa alcalina anti-IgG o IgM humanas, diluido 1:800 con PBS-BSA.

- Incubar durante una hora a 37°C.

- Después, lavar con PBS-BSA.

- Añadir 0.04 de solución sustrato conteniendo 1 mg. de p-nitrofenil fosfato/ml en dietanolamina 10% (pH= 9.8).

- Dejar reaccionar a temperatura ambiente (~23°C) durante 15 a 60 minutos.

- Medir a $405\mu\text{m}$. en absorbancia, el grado de hidrólisis del sustrato a causa de la enzima existente en la microplaca. La densidad óptica de la fase líquida es directamente proporcional a la cantidad de enzima, la que a su vez se relaciona con la presencia de anticuerpo en el suero problema. Este estudio se realiza a intervalos de tiempo conocidos para la interpretación de los resultados.

- Calcular la media de las lecturas obtenidas de los controles negativos para IgG e IgM.

- Calcular la media de las lecturas obtenidas de los sueros problema.

- Una muestra se considera positiva si la media de las densidades ópticas es mayor o igual que la media, de los controles negativos.

Nota: las lecturas en controles positivos suelen ser mayores de 1.100 (52).

3.4 Fijación y conservación de ooquistes.

Antes de realizar cualquier método para la identificación del Cryptosporidium, se recomienda fijar el frotis fecal con calor, pasando el frotis ligeramente sobre la flama de un mechero Bunsen para ayudar a adherir los ooquistes al portaobjetos más firmemente, aunque ya haya sido fijado químicamente (7,13). Los agentes químicos que más se utilizan son: metanol absoluto y ácido clorhídrico diluido al 3% con metanol al 100%.

En algunas ocasiones es necesario conservar las muestras que contienen ooquistes de Cryptosporidium para garantizar un suministro constante de material de referencia para la enseñanza y el diagnóstico (13). El hecho de que los ooquistes puedan teñirse aún después de un cierto periodo de almacenamiento, ha llevado a la realización de varios ensayos con el fin de conocer las condiciones ideales para que los ooquistes conserven su propiedad ácido resistente. Uno de estos ensayos es el siguiente: Se prepararon alícuotas de heces conteniendo ooquistes conservados en dicromato de potasio, se sometieron a las temperaturas de $-70^{\circ}\text{C}.$,

-20°C. y a +4°C y cada mes se realizaron las técnicas de tinción de Ziehl-Neelsen y safranina-azul de metileno, obteniéndose los siguientes resultados:

Los ooquistes mantuvieron su propiedad ácido-resistente durante cuatro meses a las temperaturas de -70°C. y -20°C. mientras que a +4°C., dicha propiedad perduró durante ocho meses en promedio. La técnica de safranina-azul de metileno proporcionó mayores ventajas para llegar a estos resultados (7).

Se sabe también, que los ooquistes mantenidos en congelación pueden teñirse satisfactoriamente después de descongelarlos. Si se someten a un doble proceso de descongelamiento se tiñe el 30%, aproximadamente; sobre un tercer ciclo se alcanza a teñir un 5% y en un cuarto ciclo muy pocos ooquistes retienen la safranina (7).

4. DISCUSION SOBRE METODOS DE DIAGNOSTICO.

La fácil identificación del Cryptosporidium en el laboratorio depende, como ya se mencionó, del cuidado para realizar el método y la experiencia para reconocer al parásito, pero además, depende también de la severidad de la infección y por lo tanto del número de ooquistes que se estén excretando al momento de realizar el análisis(14,42).

La sensibilidad del método que se utilice varía de acuerdo a las particularidades de la tinción y el pH utilizado (45). Por ejemplo, tiñendo con Jenner-Giemsa los ooquistes se tornan azul celeste con un halo claro a su alrededor y el corpúsculo que contiene se tiñe más intensamente (36,45). Con la técnica Ziehl-Neelsen, los ooquistes, así como sus estructuras internas, esporozoítos y cuerpos residuales toman un color rosa o rojo, mientras que las levaduras y otros elementos se tiñen de azul o de un color casi negro (1,7). Con la técnica ácido-resistente modificada con dimetil sulfóxido, los ooquistes se presentan de un color rosa brillante a fucsia contra un fondo verde pálido. Los eritrocitos quedan sin teñir mientras que los leucocitos y otras células toman un color verde azulado y

los gérmenes, esporas y otros organelos vegetativos, toman un revestimiento café o negro. Las cualidades de penetración del dimetil sulfóxido agregado a la carbol-fuchsina eliminan la necesidad de calor o vapor y facilitan el teñido rápido; el ácido acético que se incorpora en la solución de contraste es más suave y simplifica el proceso de contraste de decoloración (11). Además, el contraste de color rosa y verde, es más fácil de leer que el rango rosa azul púrpura, de un método de Kinyoun o Ziehl-Neelsen (1,7,45). Se ha demostrado también, que los ooquistes que no retienen la carbol-fuchsina con el método Ziehl-Neelsen, se pueden teñir con safranina-azul de metileno. Esta tinción es simple y rápida y los ooquistes se observan como cuerpos vivamente coloreados de rosa anaranjado y por lo común, esféricos o ligeramente ovoides. Los esporozoítos que en ocasiones se observan dentro de los ooquistes, se tiñen ligeramente de oscuro, los demás desechos fecales toman un color casi negro con el azul de metileno. El calentamiento es importante ya que se ha comprobado que cuando no aparece vapor, los ooquistes no retienen la tin-

ción (7).

Sin embargo, algunos autores recomiendan seguir un procedimiento en tres etapas, que se detalla a continuación:

- Preparación de una muestra en fresco con Iodo, para una examinación e identificación preliminar.
- Método de concentración de ooquistes.
- Preparación de frotis, para una técnica de tinción(44).

En cuanto a las técnicas de ELISA e inmunofluorescencia indirecta, son muy importantes como auxiliares en el diagnóstico del Criptosporidiosis, ya que con ellas se identifica la presencia de anticuerpos frente al Cryptosporidium, circulantes en el cuerpo humano.

5. DESARROLLO DE CRYPTOSPORIDIUM EN UN MEDIO DE CULTIVO.

El crecimiento de este parásito en un medio de cultivo de células, provee un medio de estudio sobre su comportamiento, desarrollo y metabolismo y, mejor aún, un mecanismo para la evaluación potencial de agentes terapéuticos - (13,17). A continuación se menciona un procedimiento utilizado para este fin:

Después de obtener los ooquistes por un procedimiento de concentración, se lavan tres veces en solución salina - buffer de fosfato pH= 7.2 y se incuban en esta solución -- conteniendo glucosa 0.1%, penicilina 5,000 UI/ml, estreptomina 5 mg/ml y anfotericina-B $20\mu\text{g/ml}$ durante 3 horas a 37°C ., con objeto de matar contaminantes. Después se lavan 3 veces y se incuban de nuevo con la solución buffer - conteniendo tripsina 0.25% y taurocolato de sodio 0.75%, - durante 30 a 60 minutos a 37°C ., para obtener esporozoítos libres. Estos se lavan dos veces en la solución buffer, - se resuspenden en un medio de crecimiento que contenga 10% de suero fetal de becerro, L-glutamina $1.0\mu\text{g/ml}$, penicilina 100 UI/ml, estreptomina ($100\mu\text{g/ml}$) y anfotericina-B $0.25\mu\text{g/ml}$, y se inoculan sobre una capa de células para -

su desarrollo. Se incuban durante 4 horas a 37°C. en una atmósfera de CO₂ al 5%, para permitir la adhesión y penetración de los esporozoítos. Después, la capa de células se lava y se incuba de nuevo en las mismas condiciones, durante todo el estudio (17).

Las células que se utilizaron para este estudio fueron de pulmón fetal humano, riñón de pollo y riñón porcino. La capa de células obtenida después de la inoculación, se examina a diferentes etapas de desarrollo del Cryptosporidium (17). Los resultados que se obtuvieron son los siguientes: Después de las primeras 4 horas de incubación, algunos esporozoítos aún flotaban libres en el medio, pero la mayoría ya se había adherido a las células. A las 8 horas se observaron trofozoítos dentro de una especie de vacuola (44). La razón de que los esquizontes conteniendo 8 merozoítos representan la primera generación y los que contienen 4 merozoítos representan la segunda, es que los de primera generación aparecen a las 12 horas, mientras que los últimos lo hacen después de 24 horas (41). Las etapas sexuales (macrogametos y microgametos) se observan a las -

48 horas. Los ooquistes esporulados, que morfológicamente son idénticos a aquéllos observados en algunos animales infectados naturalmente, aparecen en los días 7, 11, 18, 28 y 31. Para comprobar la infectividad de los ooquistes obtenidos, la capa de células se incubaba a +4°C. en dicromato de potasio al 2.5% durante 4 horas, esto tiene por objeto eliminar las demás etapas evolutivas y dejar sólo los ooquistes. Estos se lavan en solución buffer y se centrifugan, repitiéndose esta operación tres veces; posteriormente se inoculan a varios ratones. Días después, se pueden observar las diferentes etapas de Cryptosporidium, aunque la mayoría de los ooquistes fueron de pared delgada, es decir autoinfectantes (17).

6. TRATAMIENTO

Hasta ahora no se cuenta con un tratamiento efectivo para la Criptosporidiosis humana (41). Se han ensayado varios fármacos, principalmente en personas inmunodeficientes, pero el éxito sólo se observa cuando la deficiencia inmune principal puede ser invertida de nuevo, por ejemplo cuando la deficiencia es causada por acción de fármacos inmunosupresivos (47).

Entre los agentes quimioterapéuticos que más se han utilizado están los siguientes:

Pirimetamina: 500 mg. diarios durante 7 días.

Metronidazol: 1.5 g. al día durante 7 días.

Anfotericina-B: 5 a 50 mg. cada tercer día, durante 40 días.

Trimetoprim-Sulfametoxazol: 320 mg.-1600 mg. diarios durante 5 días.

Furazolidona: 400 mg. diarios durante 10 días.

Espiramicina: 3 g. diarios durante 5 semanas (41,47,50)

El fármaco, que hasta ahora, ha dado mejores resultados es la espiramicina, que fue aislado del Streptomyces amboflaciens, en 1954. La espiramicina es un antibiótico ma--

crólido de amplio espectro que contiene un anillo lactona grande, el cual se sustituye con uno o más residuos de azúcar, que son importantes para su actividad. El jugo gástrico no afecta al fármaco cuando se administra por vía oral, produciendo niveles sanguíneos eficaces y prolongados con una sola dosis (10,35). En una forma general, cuando se administra a personas inmunodeficientes con Criptosporidiosis, se observa un ligero mejoramiento gradual sintomático y disminución o resolución de la diarrea, aunque los ooquistes continúen excretándose en las heces. Desafortunadamente estos casos de Criptosporidiosis se complican debido a la presencia de otras afecciones por lo que, después de un tiempo de dejar el tratamiento, sobrevienen recaídas o incluso las personas mueren sin haberseles erradicado el parásito (47). Cabe mencionar que ninguna muerte se ha atribuído al Cryptosporidium (41).

En personas inmunocompetentes, cualquiera de los fármacos antes mencionados da mejores resultados que en personas inmunodeficientes, siempre y cuando no haya complicación con otras infecciones; en algunos casos no es neces-

rio seguir un tratamiento muy prolongado, ya que la diarrea suele terminar en poco tiempo (20,41,49). A pesar de todo, aún no se puede afirmar que se ha establecido algún fármaco para el tratamiento básico de Criptosporidiosis humana.

A continuación se enlistan algunos agentes antimicrobianos que han resultado ineficaces contra la infección por Cryptosporidium, en humanos (23).

Weinstein y cols.

Sulfisoxazol
Metronidazol
Cloroquina
Primaquina
Loperamida
Pentamidina
Sulfatalidina

Sloper y cols.

Pirimetamina
Sulfadiazina
Levamisol
Colestiramina.

Stemmermann y cols.

Mepacrina
Colistina
Oxitetraciclina
Piperazina
Tibendazol
Ampicilina
Eritromicina
Penicilina
Gentamicina
Cloxacilina

7. DISCUSION GENERAL

La importancia del Cryptosporidium como un patógeno intestinal, tanto en personas inmunocompetentes como inmunodeficientes, crece día a día. Las investigaciones reflejan una extensa colaboración entre médicos, veterinarios y clínicos, aunque desafortunadamente quedan muchos puntos por aclarar. El parásito tiene una clasificación dentro de la familia Cryptosporidiidae, pero puede haber cambios en la nomenclatura debido al poco conocimiento que se tiene sobre la especificidad de huésped. Primeramente se le conocía como una enfermedad zoonótica, epidemiológicamente hablando, dado que sólo existían referencias de contagio animal-hombre, pero este concepto ha cambiado por las evidencias que hay de transmisión de persona a persona.

El ciclo de vida que lleva a cabo el Cryptosporidium, se ha esquematizado en forma general, pero algunas facetas son algo confusas, por lo que se presta a varias interpretaciones, sobre todo en la forma en que un merozoíto de primera o segunda generación puede reiniciar la esquizogonia.

En lo que respecta al diagnóstico, la mayoría de los re

sultados negativos o falsos positivos, se originan por la falta de experiencia en cuanto al conocimiento del parásito o a la mala realización de la técnica; además, un mal manejo de las muestras puede conducir al laboratorista a una contaminación con el parásito.

Desafortunadamente, el punto sobre el que menos éxito se ha tenido es el tratamiento de la enfermedad, sobre todo cuando hay deficiencia en el sistema inmunológico y en cuyos pacientes persiste el parásito aún después de la administración de los fármacos.

CONCLUSION

El Cryptosporidium es un parásito, protozooario oportu--nista, que habita las regiones microvellosas de las célu--las epiteliales del intestino delgado. El síntoma más co--mún que provoca es diarrea acuosa, que en personas immuno--deficientes puede continuar en forma crónica, hecho que se atribuye a que el Cryptosporidium tiene varios ciclos es--quizogónicos en este tipo de pacientes. Este patógeno es -fácilmente observable cuando se han seguido los métodos a--decuados para su recuperación e identificación, los aquí -presentados rinden las condiciones necesarias para conside--rarlos como adecuados y tomarlos como pruebas de rutina en el laboratorio clínico.

Los adelantos en el control de la Criptosporidiosis re--querirá de un conocimiento total en cuanto a su ciclo bio--lógico, forma de transmisión, tratamiento y, acaso lo más importante, la prevención de la deficiencia inmunológica,-cuando exista, en pacientes que padezcan esta enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. Andersen-Holten, W., Gerstoft, J. Prevalence of Cryptosporidium among patients with acute enteric infection. J. of Infect. Vol 9 277-282 (1984).
2. Ariza, C.R., Frati, A.C. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida: informe de 18 casos. Rev Med IMSS (Méx.) - 25(3) 17-25 (1987).
3. Barriga, C., Cardeña, J. Criptosporidiosis asociada -- con SIDA: informe de un caso. Infectología 5(2) - 33-37 (1985).
4. Baxby, D., Hart, C.A. Human cryptosporidiosis: a possible case of hospital cross infection. British Med J. Vol 287 1760-61 (1983).
5. Baxby, D., Hart, C.A. Gastro-enteritis due to Cryptosporidium: a prospective survey in a children's hospital. J. of Infect. 9(3) 264-70 (1984).
6. Baxby, D., Getty, B. Recognition of whole Cryptosporidium oocysts in feces by negative staining and electron microscopy. J. of Clin Microbiol. 19(4) 566-67 (1984).
7. Baxby, D.; Blundell, N. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of Cryptosporidium oocysts in faeces. J. Hyg Camb (Lond) 92(2) 317-23 (1984).
8. Baxby, D., Hart, C.A. The incidence of cryptosporidiosis: a two-year prospective survey in a children's hospital. J. Hyg Camb 96(1) 107-11 (1986).
9. Bogaerts, J., Lepage, P. Cryptosporidium spp., a frequent cause of diarrhea in Central Africa. J. of Clin Microbiol. 20(5) 874-76 (1984).

10. Bowman, W.C. y Rand, M.J.
FARMACOLOGIA. BASES BIOQUIMICAS Y PATOLOGICAS. APLICACIONES CLINICAS.
2a. edición
Interamericana
México D.F. (1985).
11. Bronsdon, M.A., Rapid dimethyl sulfoxide-modified -
acid-fast stain of Cryptosporidium oocysts in stool -
specimens. J. Clin Microbiol. 19(6) 952-53 (1984).
12. Campbell, P., Current, W. Demonstration of serum anti-
bodies to Cryptosporidium sp. in normal and immunodeficient humans with confirmed infections. J. Clin Microbiol. 18(1) 165-169 (1983).
13. Casemore, D.P., Sands, R.L. Cryptosporidium species a
"new" human pathogen. J. Clin Pathol. 38(12) -
1321-36 (1985).
14. Casemore, D.P., Armstrong, M. Laboratory diagnosis of
Cryptosporidiosis. J. Clin of Pathol. 38(12) -
1337-41 (1985).
15. Cohen, J.D., Rhlig, L. Cryptosporidium in acquired -
immunodeficiency syndrome. Digestive diseases and Sci.
29(8) 773-77 (1984).
16. Current, W.L., Reese, N.C. Human cryptosporidiosis in
immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of
an outbreak and experimental transmission. New. Engl.
J. of Med. 308(21) 1252-57 (1983).
17. Current, W.L., Haynes, T.B. Complete development of -
Cryptosporidium in Cell culture. Science 224(4649) -
603-605 (1984).
18. Daniels, G.V.
SIDA. SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA
El Manual Moderno
México, D.F. (1986)

19. El SIDA: Una crisis de salud pública. Population re--ports. serie L número 6 L1-L41 (1987).
20. Frederick, J., Duncan Jr., M.D. Cryptosporidiosis and the healthy host. New. Engl. af Med. 312(20) - 1319-20 (1985).
21. García, LS, Bruckner, D.A. Techniques for the recovery and identification of Cryptosporidium oocysts from stool specimens. J. Clin Microbiol. 18(1) 185-90 - (1983).
22. Gerstoft, A.M., Andersen-Holten, W. Cryptosporidium - enterocolitis in homosexual men with AIDS. - Scan J. Infect Dis. 16(4) 385-88 (1984).
23. González, D. Criptosporidiosis Infectología Vol 6 - 140-45 (1985).
24. Gross, T.L., Wheat, J. AIDS and multiple system involvement with Cryptosporidium. American J. Gastroent. 81(6) 456-58 (1986).
25. Guarda, L.A., Stein, S.A. Human Cryptosporidiosis in the acquired immune deficiency syndrome. Arch Pathol. Lab Med. 107(11) 562-66 (1983).
26. Guerrant, R.L., Shields, D.S. Evaluation and diagnosis of acute infectious diarrhea. Am. J. Med. 78(6B) 91-98 (1985).
27. Hunt, D.A., Shannon, R. Cryptosporidiosis in an urban community. British Med. J. 289(6448) 814-16 (1984).
28. Jawetz, E., Melnick, J.
 MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA
 9a. edición.
 El Manual Moderno
 México D.F. (1981).

29. Jokipii, L., Pohjola, S. Cryptosporidium: a frequent finding in patients with gastrointestinal symptoms. - Lancet. 2(8346) 358-61 (1983).
30. Jokipii, L., Hemila, Ma. Prospective study of acquisition of Cryptosporidium, Giardia lamblia, and gastrointestinal illness. Lancet. 2(8453) 487-89 (1985).
31. Kennet, L., Koch, M.D. Cryptosporidiosis in hospital personnel. Evidence for person to person transmission. Annals of Intern. Med. 102(5) 593-96. (1985).
32. Kocoshis, S.A., Cibull, M.L. Intestinal and pulmonary Cryptosporidiosis in an infant with severe combined - immune deficiency.
33. Lefkowich, J.H., Krumholz, S. Cryptosporidiosis of - the human small intestine: A light and electron microscopic study. Hum Pathology 15(8) 746-52 (1984).
34. Levine, N.D. Taxonomy and Review of the coccidian genus Cryptosporidium (Protozoa, apicomplexa). J. Proto zool. 31(1) 94-98 (1984).
35. Litter M.
FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL Y CLINICA.
6a. edición
El Ateneo
Argentina (1980)
36. Lynch, R., Mellor, S.I.
METODOS DE LABORATORIO
2a. edición
Interamericana
México, D.F. (1982).
37. Mata, L., Bolaños, H. Cryptosporidiosis in children - from some highland Costa Rican rural and urban areas. Am J. Trop. Hyg. 33(1) 24-29 (1984).

38. Mc. Millan, A., Mc. Neillage, G.C.G. Comparison of -- the sensitivity of microscopy and culture in the laboratory diagnosis of intestinal protozoal infection. - J. Clin Pathol. 37(7) 809-11 (1984).
39. Miller, R.A., Wasserheit, J.N. Detection of Cryptosporidium oocysts in sputum during screening for Mycobacteria. J. Clin Microbiol. 20(6) 1192-93 (1984).
40. Modigliani, R., Bories, C. Diarrhoea and malabsorption in acquired immune deficiency syndrome: a study of - four cases with special emphasis on opportunistic protozoan infestations. Gut. 26(2) 179-87 (1985).
41. Navin, T.C., Juranek, D.D. Cryptosporidiosis: Clinical, epidemiologic, and parasitologic review. Rev. Infect. Dis. 6(3) 313-27 (1984).
42. Nelson, J.D. Etiology and Epidemiology of diarrheal - diseases in the United States. Am J. of Med. 78(6B) 76-80 (1985).
43. Nime, F.A., Burek, J.D. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan Cryptosporidium. Gastroenterol. 70(4) 592-98 (1976).
44. Pearl, Ma., Soave, R. Three-step stool examination - for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with pro--- tracted watery diarrhea. J. Infect Dis. 147(5) - 824-28 (1983).
45. Pearl, Ma. Cryptosporidium. Biology and diagnosis. - Adv. Exp Med Biol. Vol 202 135-52 (1986).
46. Pitlik, S.D., Fainstein, V. Human Cryptosporidiosis: spectrum of disease. Report of 6 cases and review of - the literature. Arch. Intern Med. 143(12) 2269-75 (1983).

47. Portnoy, D., Whiteside, M.E. Treatment of intestinal Cryptosporidiosis with spiramycin. Ann Intern Med. - 101(2) 202-04 (1984).
48. Soave, R., Danner, R.L. Cryptosporidiosis en homosexual men. Ann Intern Med. 100(4) 504-11 (1984).
49. Stehr-Green, J.K., Mc.Caig, L. Shedding of oocysts in immunocompetent individuals infected with Cryptosporidium. Am J. Trop Med Hyg. 36(2) 338-42 (1987).
50. Tzipori, S., Smith, M. Cryptosporidiosis in hospital patients with gastroenteritis. Am J. Trop Med Hyg. - 32(5) 931-34 (1983).
51. Tzipori, S. Cryptosporidiosis in animals and humans.- Microbiol Rev. 47(1) 84-96 (1983).
52. Ungar, B., Soave, R. Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to Cryptosporidium - in immunocompetent and immunocompromised persons. - J. Infect Dis. 153(3) 570-78 (1986).
53. Whiteside, M., Barkin, J.S. Enteric coccidiosis among patients with the acquired immunodeficiency syndrome.- Am J. Trop Med Hyg. 33(6) 1065-72 (1984).
54. Wolfson, J.S., Richter, J.M. Cryptosporidiosis in -- immunocompetent patients. New Engl. J Med. 312(20) 1278-82 (1985).
55. Wong, B. Parasitic diseases in immunocompromised - hosts. Am. J. Med. Vol 76 479-86 (1984).