

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**



**TÍTULO:**

**COMPORTAMIENTO INMUNOLÓGICO EN LA  
CRIPTOSPORIDIOSIS**

(Trabajo monográfico de actualización)

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**EDGAR BASALDÚA VILLASANTE**



México, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

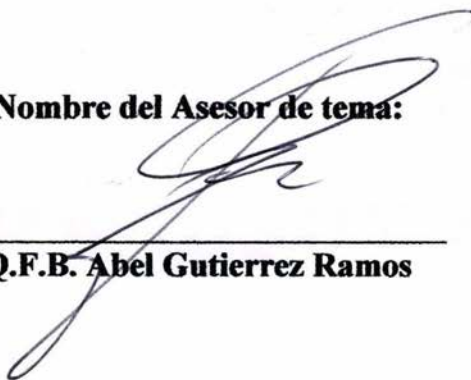
**Jurado asignado:**

**Presidente: Abel Gutierrez Ramos**  
**Vocal: Adriana Guadalupe Mejia Chavez**  
**Secretario: Marco Antonio Becerril Flores**  
**1er.sup. Rosalba Esquivel Cote**  
**2do. Berta Espinoza Gutierrez**

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

**Edificio A . de la Facultad de Química, México, D.F. Ciudad  
Universitaria.**

**Nombre del Asesor de tema:**



---

**Q.F.B. Abel Gutierrez Ramos**

**Nombre del Sustentante:**



---

**Q.F.B. Edgar Basaldúa Villasante**

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

- El objetivo principal es comprender implantación de la parasitosis y los mecanismos que utiliza el parásito para ubicarse en los diferentes organismos, □independientemente de su estado inmunológico.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Consultar en la bibliografía las diferentes formas en que los organismos hospederos responden y evolucionan ante el desarrollo del parásito en la mucosa intestinal, así como poner de manifiesto las principales técnicas diagnósticas.
- Mencionar los diferentes medicamentos más utilizados para la erradicación de dicha enfermedad.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	4
CLASIFICACIÓN	5
MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA	7
EPIDEMIOLOGÍA	9
CUADRO CLÍNICO Y PATOGENIA	13
COMPORTAMIENTO INMUNOLÓGICO	17
TÉCNICAS DE DIAGNOSTICO	24
TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN	33
ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN Y CONCLUSIONES	40
SUGERENCIAS	41
GLOSARIO	42
ANEXO I	45
ANEXO II	51
BIBLIOGRAFÍA	55

# INTRODUCCIÓN

Los brotes infecciosos actuales y pasados perjudican gravemente la salud de una población y perturban los sistemas de vigilancia y control epidemiológico. En los últimos 20 años han aparecido más de treinta enfermedades infecciosas, de las cuales 15 son ocasionadas por virus, 16 por bacterias y seis por protozoarios, es así que la patología parasitaria no ha permanecido estática, se mantiene en una dinámica constante con el ingreso de nuevos agentes etiológicos.

Las enfermedades emergentes se definen como infecciones de recién aparición en habitantes, o bien, infecciones que se encontraron mucho tiempo atrás pero con incremento de virulencia, incidencia y nivel de acción geográfica en los últimos años.

Los protozoos patógenos emergentes involucrados en procesos gastrointestinales son: las coccidias intestinales Cryptosporidium parvum, Cyclospora cayetanensis e Isospora belli. Estas coccidias realizan su ciclo de vida en el tubo digestivo; llevan a cabo reproducción de tipo asexual y sexual dentro de los enterocitos y el principal mecanismo de daño es la destrucción de las células epiteliales del borde del cepillo, de la mucosa intestinal.

La dinámica de transmisión de estas parasitosis emergentes es dependiente de los malos hábitos higiénicos, por tratarse de protozoosis transmitidas por fecalismo, la vía de entrada es la boca y la transmisión es oro-fecal, las formas infectantes son los ooquistes y los quistes, se diseminan apartir de individuo parasitados. Asimismo, estas protozoosis están consideradas dentro de las zoonosis, con una amplia variedad de huéspedes naturales que incluyen mamíferos domésticos, silvestres y aves de corral.

El diagnóstico Etiológico requiere de metodología especial, las técnicas convencionales de coproparasitoscópicos (CPS) directo y de concentración son pocos útiles para la identificación. Los primeros diagnóstico fueron obtenidos de productos de biopsias, en la actualidad estas técnicas tan agresivas han sido sustituidas por el manejo de materia fecal como producto biológico, están las tinciones y las técnicas que usan poli y monoclonales en la captura del antígeno en heces, se han utilizado inmunoensayos enzimáticos o inmunofluorecencia con excelentes resultados.

El Propósito de este trabajo es hacer una recopilación bibliográfica de actualización con comparaciones de las diferentes técnicas empleadas y los fármacos que se ha utilizado para combatir la Cryptosporidiosis tanto en humanos como en animales.

## ANTECEDENTES

En 1907, Tyzzer, describió por primera vez a Cryptosporidium, observándolo en la mucosa gástrica de ratones asintomáticos, pero fue hasta el año de 1955 que se le relacionó con diarrea grave en pavos infectados con este protozoo; desde entonces el parásito se ha observado en varias especies de animales como son: carneros, terneras, cerdos, perros, gatos, potrillos, venados, gansos, pericos y faisanes. También se ha encontrado Cryptosporidium parvum infectando la tráquea, la cloaca, la bolsa de Fabricio y el saco conjuntival de aves. (3, 36,50, 53, 54, 65, 67, 79,83)

El primer caso reportado de criptosporidiosis humana fue reportado en 1976 y hasta 1982 solo se habían reportado 7 casos; sin embargo, a partir de este mismo año, el número se ha incrementado considerablemente por lo que el concepto de criptosporidiosis se ha transformado de una rara infección asintomática en una importante causa de diarrea y enterocolitis en diversas especies animales, incluyendo al hombre. (39, 50, 79, 81)

Cryptosporidium parvum es un parásito protozoario, coccidio, con distribución mundial que se ha reconocido recientemente como una causa importante de diarrea, tanto en personas inmunocompetentes, como en pacientes inmunodeficientes, pero más comúnmente ocurre en manejadores de animales y en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), o con alguna otra inmunodeficiencia. (40,50, 53,65)

En los diferentes estudios que se han reportado en la literatura, se ha observado que en pacientes parasitados con Cryptosporidium parvum que tienen una actividad inmunológica normal, generalmente presentan diarrea autolimitada con duración aproximada de 5 días, de curación espontánea; sin embargo, los pacientes con algunas anomalías inmunológicas, desarrollan una enfermedad diarreica prolongada, grave e incurable que puede llevarlos hasta la muerte. (3,36,40,50,54)

Las especies de Cryptosporidium son transmitidas por una variedad de mecanismos. La transmisión zoonótica se consideró inicialmente como la principal forma de infección humana. Sin embargo se ha encontrado en la actualidad que la principal vía de transmisión es la vía oro-fecal, ya sea por contacto directo (durante prácticas sexuales en las que exista contacto oro-anal), ó indirecto, mediante agua, comida, fomites y otras superficies contaminadas. Los animales constituyen el reservorio más importante de la infección para los humanos y se piensa también que lo sean los homosexuales infectados. (5)

En estudios anteriores se encontró que Cryptosporidium es resistente a los antisépticos comunes y a la cloración del agua potable. (29)

Se han descrito aproximadamente 11 especies del protozoo que causan infección tanto en animales como en el hombre; la primera especie descubierta fue Cryptosporidium muris, la cual describió Tyzzer en 1907, por hallazgos de ooquistes en heces y glándulas intestinales de ratones. Posteriormente se describió una nueva especie, Cryptosporidium parvum (Tyzzer en 1912) cuyos ooquistes eran ligeramente más pequeños.

Se han descrito nuevas especies, cuyos ooquistes y otras formas del parásito son muy similares entre sí y con los descritos por Tyzzer, pero que por el hecho de aparecer en otros vertebrados, se les considero diferentes. (50)

Las especies descritas son:

- C. muris (Tyzzer 1910) en ratón.
- C. parvum (Tyzzer 1912) en ratón
- C. meleagridis (Slavin 1955) (Levine 1980) en pavos
- C. wrairi (Vetterling et al 1971) en cobayos
- C. anserinum (Proctor y Kemp 1974) en gansos
- C. bovis (Baker y Carbonell 1974) en terneras
- C. agni (Barker y Carbonell 1974) en ovejas
- C. rhesi (Levine 1980) en mono rhesus
- C. crotali (Triffit 1925) en serpientes
- C. serpentis (Levine 1980) en serpientes
- C. nasorum (Hoover, Hoerr, Carlton, Heinsman y Ferguson 1981) en peces.

La lista de animales infectados asciende a nueve mamíferos, tres aves y varias especies de serpientes.

Aparentemente la lista de hospederos es mayor, pues se ha demostrado la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta en otros vertebrados como el hombre, perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, caballos, venados y gallinas. (50,81)

La inoculación experimental exitosa de parásitos aislados de un hospedero vertebrado a otros, ha permitido demostrar su inespecificidad, así como la posible sinonimia de las especies descritas. (50, 67, 79, 81,83)

Actualmente se considera como una de las parasitosis emergentes; estas son aquellas infecciones de nueva aparición o como enfermedades que han existido desde hace siglos, pero que a últimas fechas han afectado a la población humana e incrementado su incidencia y rango de acción geográfica. (34)

## CLASIFICACIÓN

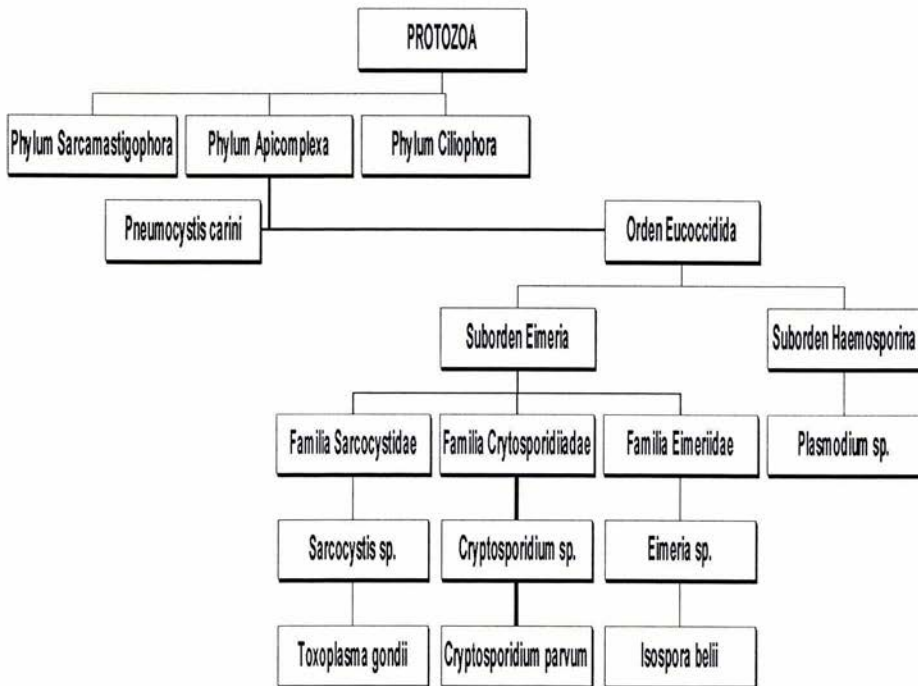
La clasificación taxonómica del género Cryptosporidium denota su estructura y su biología básica.

Las especies de Cryptosporidium pertenecen al Phylum Apicomplexa, pues al igual que otros parásitos tienen un complejo apical, pero no son cilios ni flagelos. Dado que Cryptosporidium parvum tiene tanto reproducción sexual como asexual, se coloca en la clase Sporozoocida y en la subclase Coccidiasina, porque tienen pequeños gametos intracelulares, característica de los miembros de la subclase.



Las especies de Cryptosporidium se colocan en el orden Eucoccidiorida por el desarrollo de merozoitos (primera y segunda generación) dentro de los esquizontes. Cryptosporidium, al igual que Isospora, Sarcocystis y Toxoplasma, son miembros del suborden Eimeriorina, debido a la producción de micro y macrogametos, a partir de sus micros y macrogametocitos, respectivamente. Por otro lado, como un miembro de la familia Cryptosporidiidae, el género Cryptosporidium se ha desarrollado en un sitio anatómico especial, justo debajo de la membrana de la célula hospedera, como un parásito intracelular pero extracitoplasmático. Es un parásito monoxeno, ya que solo requiere un hospedero para el desarrollo completo del ciclo de vida de las especies de Cryptosporidium. (36,39, 40, 48,65) En la figura se muestra la clasificación taxonómica de Cryptosporidium.

## TAXONOMIA DE CRYPTOSPORIDIIDAE



## MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de Cryptosporidium se ha investigado en cricetos, terneras y membrana corioalantoidea del embrión de pollo, y parece seguir el mismo patrón para las otras Coccidias. (3,36)

Cryptosporidium parvum es un protozooario y su forma infectante es el ooquiste maduro, pequeña formación esférica o elíptica de 3 a 6 micras de diámetro, en las células epiteliales del intestino se encuentran localizados en vacuolas parasitóforas, estos ooquistes se expulsan en las heces de animales enfermos listo para infectar a otros animales. (43,65)

Su ciclo biológico (Fig. No. 2), está constituido por una fase asexual en la que se encuentran estadios de trofozoitos, esquizontes y merozoitos y una fase sexual representada por los micro y macrogametos. (59)

Los ooquistes maduros con doble pared contienen 4 esporozoitos en su interior (estos sobreviven en el ambiente por largos periodos), los cuales se liberan cuando el hospedero ingiere los ooquistes, el mecanismo exacto no está bien esclarecido, pero al parecer, el desenquistamiento se favorece por la digestión de la pared quística dentro del conducto gastrointestinal principalmente en el intestino delgado. Los esporozoitos liberados poseen un complejo apical (con micronemas, una roptria y gránulos densos) auxiliar en la adhesión y fusión con la membrana del hospedero, infectando las células epiteliales del intestino delgado para transformarse en trofozoitos. (65)

El trofozoito sufre tres divisiones nucleares para formar ocho merozoitos; a esta estructura se le denomina esquizonte de primera generación, posteriormente los ocho trofozoitos formados, se liberan e infectan otras células epiteliales. En estas últimas, los merozoitos alargados, se redondean y sufren dos divisiones nucleares para formar el esquizonte de segunda generación, que contiene cuatro merozoitos de segunda generación, los cuales se liberan y vuelven a infectar células epiteliales, entonces es cuando sufren diferenciación sexual formando los micros y macrogametocitos que dan origen a los gametos. Los macrogametocitos presentan pequeñas modificaciones y se convierten en macrogametos, en tanto que los microgametocitos, sufren algunas divisiones nucleares y forman varios microgametos; el número de estos aún no se define completamente pero se piensa que son entre 12 y 16. (3, 36, 59,65)

Un microgameto se une con un macrogameto para formar un cigoto, el cual se desarrolla hasta formar un ooquiste, para así completar el ciclo de vida.

Se ha observado la existencia de dos generaciones de esquizontes, en estudios hechos en cobayos alimentados con heces que contenían ooquistes, y posteriormente se buscaron las distintas fases del parásito en el conducto intestinal de estos animales (87) encontrándose los resultados siguientes:

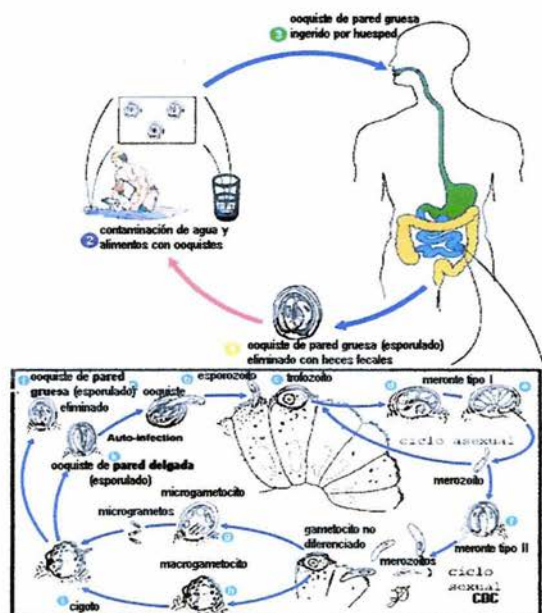
## Fases de Cryptosporidium en el conducto gastrointestinal

Fase encontrada:	Tiempo después de la inoculación:
Trofozoítos	3 a 4 días.
Esquizontes de ocho merozoítos	7 a 9 días.
Esquizontes de cuatro merozoítos	11 a 14 días.
Gametocitos	13 a 15 días.

Cabe señalar que todo el ciclo reproductivo se desarrolla a nivel de las microvellosidades de las células epiteliales. Generalmente el desarrollo ocurre en el epitelio gastrointestinal, pero se ha observado que en aves y en personas inmunodeficientes, puede ocurrir en el epitelio traqueal. (61)

Las observaciones en el microscopio electrónico de muestran que el trofozoíto forma una zona de adherencia en la interfase con la célula hospedera. En esta zona se puede reconocer pliegues membranosos del parásito, fusionados con una banda gruesa y densa formado por cuatro membranas distintas, se creía que estas membranas eran parte del parásito, pero recientes evidencias sugieren que las dos membranas externas son originadas en el hospedero por lo que puede considerarse como parásito intracelular pero extracitoplasmático y es a través de estas membranas donde se realiza el intercambio de material nutritivo. (3, 36, 43,84)(fig. No.3)

**FIG. No 2 “FORMA DE TRANSMISIÓN Y CICLO DE VIDA DE”  
Cryptosporidium parvum EN EL HOSPEDERO**



# EPIDEMIOLOGÍA

En muchas partes del mundo se ha encontrado Cryptosporidium asociado a enfermedades diarreicas, las que frecuentemente rivalizan en magnitud con Campylobacter, Salmonella, Shigella sp., E.coli enteropatógena y Giardia lamblia. (40, 43,53)

Cryptosporidium se distribuye por todo el mundo, incluyendo Este y Oeste de África (43), centro y Sudamérica (10,50), U.S.A. (43,49), Australia (84), Europa (42), Asia (43) y México (26,86)

El primer caso reportado en humanos fue en 1976 y solo se habían reportado 7 casos hasta 1982. Sin embargo a partir de este año se ha incrementado el número considerablemente.

En Nueva York, el primer caso reportado de criptosporidiosis se reportó en Agosto de 1981 en un homosexual con SIDA, el diagnóstico se hizo por medio de Biopsia intestinal. A partir de entonces se han reportado un gran número de casos. (49)

En un estudio en Melbourne, Australia por Tzipori y cols. (89) se colectaron 844 muestras durante el período de Febrero de 1981 a junio de 1982, éstas provenían de pacientes con gastroenteritis y de controles con gastroenteritis. Los resultados observados fueron que solo 36 pacientes (4%) con gastroenteritis, presentaron Cryptosporidium en sus evacuaciones. También se encontró que la frecuencia de Febrero a Mayo de 1981, fue más elevada en relación a los demás períodos. Aunado a que fue más común en los pacientes menores de 15 años.

En Bristol, Inglaterra se realizó un estudio en el período comprendido del mes de Febrero de 1983 a Enero de 1984, con 863 pacientes con diarrea, de los cuales, 329 eran niños menores de 5 años de edad y sin deficiencias inmunológicas. Los resultados mostraron a 43 pacientes con Cryptosporidium, de éstos, 24 eran menores de 5 años de edad. Este parásito fue el más común después de Campilobacter. (42)

Por otro lado, en Massachussets U.S.A., se llevó a cabo un estudio en el mismo período, del primero de febrero de 1983 al 31 de Enero de 1984 con personas inmunocompetentes y de todas las edades, encontrándose 43 muestras con ooquistes con ooquistes de Cryptosporidium, presentándose el mayor número de casos en niños de 4 años de edad y en adultos en edades entre edades entre los 30 y 39 años. (85)

En Centroamérica se encontró un panorama semejante, en un estudio realizado en Costa Rica en 1982, se estudiaron niños lactantes y preescolares con diarrea y sin diarrea, encontrándose una frecuencia de 4.4% de Cryptosporidium en pacientes diarreicos; sin embargo no se encontró en los niños sin diarrea. Todas las infecciones ocurrieron de Mayo a Junio en la población urbana de Junio a Agosto en la población rural. (50)

En 1984 se observaron dos distintos brotes de gastroenteritis en el período comprendido del 1º de Mayo al 30 de Julio entre los residentes de Brown Station,

comunidad suburbana al noroeste de San Antonio Texas. Estos brotes se debieron a una contaminación fecal de agua. En el primer brote se encontró Cryptosporidium en 251 personas, y en el segundo se encontraron ooquistes en 117 personas. Las edades fluctuaron entre 1 y 72 años, con un promedio de 32 años; ninguno era inmunocomprometido, y no había asociación entre propietario o manejadores de ganado. (29)

Janoff y Reller (43) de la Universidad de Colorado en 1986, realizaron una recopilación interesante de datos de pacientes con criptosporidiosis de 1978 a 1985, tanto en países en vías de desarrollo, como en países desarrollados. Esta recopilación incluyó pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos.

En países en vías de desarrollo, en donde se examinaron muestras consecutivas de heces de pacientes con diarrea, Cryptosporidium se identificó en una proporción del 3 al 13%. En el diagnóstico se utilizaron diferentes métodos, encontrándose la tasa más alta en la India en niños menores de 3 años y en personas de todas las edades la tasa más alta se encontró en Bangladesh. (39, 42, 50,66)

Por otro lado, en países desarrollados, los estudios realizados en pacientes con diarrea indicaron que la prevalencia de Cryptosporidium fue de 0.6 a 7.3 %, en donde la tasa más alta se observó en Estados Unidos (especialmente en Denver, Colorado) en pacientes de todas las edades. En Gran Bretaña se encontró la tasa más alta en niños menores de 5 años.

Tanto en países desarrollados como en los que se encuentran en vías de desarrollo, los grupos donde se han encontrado más incidencia de criptosporidiosis comprende un gran número de pacientes inmunocomprometidos.

En Estados Unidos se encontró en un 28 % entre homosexuales con SIDA que tenían diarrea. Por otro lado, en Haití se realizó un estudio en 131 pacientes con SIDA, de los cuales casi la mitad estaba infectada con Cryptosporidium, la mayoría de estos pacientes presentaban diarrea crónica. (43)

Algunos reportes de Costa Rica, Bangladesh e India, describen que las tasa más altas de Cryptosporidium se encuentra durante los meses más cálidos, húmedos y lluviosos. (50, 51,70). Sin embargo, en países como Australia, Finlandia y los Estados Unidos no se presenta este patrón estacional. (41, 45, 84,91)

En Florida en 1985, se presentó un brote de diarrea en el "Day-Care Center" (DCC), en donde se analizaron 84 muestras de niños entre las edades de 44 días a 5 años, de los cuales el 49% resultó positivo para la detección de Cryptosporidium. (76)

Por otra parte, Ratna y cols. En 1986, reportaron que Cryptosporidium fue el segundo enteropatógeno más comúnmente identificado en 2,252 muestras de heces enviadas para examen rutinario, siendo Giardia lamblia el primero. De 19 pacientes positivos para Cryptosporidium, 18 reportaron diarrea. (47)

Holly y Dover (41), examinaron 582 muestras de heces de diferentes individuos, encontrando 60 muestras con parásitos. De éstas, 25 (42%) tenían Cryptosporidium ocupando el primer lugar, seguido por Giardia lamblia (30%).

En Filadelfia U.S.A., se presentó un brote de diarrea en un centro de cuidado diurno, encontrándose Cryptosporidium en 13 de 20 niños, o sea en un 65% de niños sintomáticos, y solo la mitad tenían diarrea y la otra mitad eran testigos. Se encontró que el 20.4% del grupo total, fueron positivos para Cryptosporidium siendo más frecuente en niños mayores de 5 años tanto en el grupo con diarrea como en el grupo control. (10)

En lo que se refiere a México, en el Instituto Nacional de la Nutrición “Salvador Zubirán”, entre los meses de Julio de 1983 y Mayo de 1987, se realizó un estudio en 69 pacientes con SIDA que presentaban alteraciones gastrointestinales. Se encontraron agentes infecciosos en el 58% de los casos, siendo los más frecuentes Cryptosporidium y E. Histolytica, seguidos por Giardia lamblia e I. Belli. (26)

En este mismo Instituto se estudiaron 452 muestras de materia fecal de pacientes mexicanos con infección por HIV, enviadas al laboratorio de Microbiología Clínica de dicho Instituto, entre el período comprendido de Mayo de 1985 a Mayo de 1988; 256 muestras eran pacientes con SIDA, 15 de pacientes con enfermedad constitucional por HIV, 9 serotipos HIV asintomáticos, 4 de pacientes con adenopatía por HIV y 133 de pacientes desconocidos.

Los resultados obtenidos mostraron que 46 muestras fueron positivas para Cryptosporidium, 42 fueron casos de SIDA. (Ojeda, F. Comunicación personal).

Por otro lado, en 1988, en el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (Hoy Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE))\* de la ciudad de México, los doctores Vázquez Tsuji, Velazco Castrejón y Alvarez Chacón (86), realizaron un estudio de muestras de materia fecal de 22 pacientes con Diagnóstico clínico y serológico de SIDA, para la búsqueda intencionada de especies de Cryptosporidium, encontrándose en solo dos casos de Cryptosporidium, coexistiendo uno de ellos con Giardia lamblia.

Se ha observado que en los pacientes mexicanos con SIDA son más frecuentes las infecciones entéricas por Cryptosporidium e I. belli, que las neumonías por Pneumocystis carinii. (63)

La prevalencia de este microorganismo es variable, en función de las características socioeconómicas de la población, ya que es más frecuente en los lugares con problemas de infraestructura en las canalizaciones de agua potable, en las piscinas, en la eliminación de aguas residuales o con estrecho contacto con animales. Se encuentra en las heces del 1 al 3% de los habitantes de los países desarrollados (Europa y América del Norte), en el 5% de los de Asia y en el 10% de los de África. Es más frecuente en los menores de dos años. Mediante estudios serológicos se demuestra la presencia de anticuerpos en el 25-35% de los habitantes de los países desarrollados y en el 60-75% de los de países pobres. Un estudio realizado en niños de Salamanca mostró una seroprevalencia de IgG del 22,6%. En los

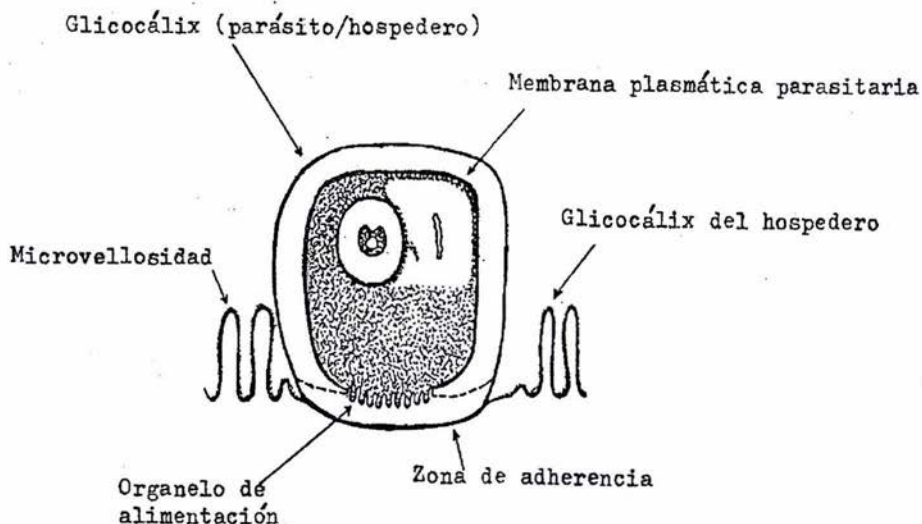
países de clima tropical, es más frecuente en los meses cálidos y húmedos, mientras que, en los de clima templado, como España, es más frecuente en otoño y en invierno. Se han descrito grandes brotes asociados generalmente a deficiencias en los sistemas de potabilización del agua; el mayor descrito hasta la fecha se produjo en Milwaukee (USA) y afectó a 403.000 personas. En el Reino Unido se describieron 18 brotes en el período de 1989 a 1999 asociado a conducciones de agua contaminada con oocistas.

La infección se transmite de persona a persona, por contacto con animales infectados, por el agua de bebida, por las piscinas o por los alimentos contaminados (frutas, verduras, zumos de frutas, moluscos, etc.), aunque un estudio llevado a cabo en Los Angeles en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) mostró que el agua potable tenía poca importancia en la transmisión de la enfermedad; las moscas también podrían desempeñar un papel como vectores mecánicos del parásito. Se ha demostrado la transmisión entre miembros de la familia, entre parejas sexuales, en guarderías, y entre pacientes y personal sanitario, e incluso se producen infecciones nosocomiales. Esto puede pasar desapercibido porque, en muchos casos, no existen síntomas clínicos importantes. Las infecciones por animales se producen, generalmente, a partir de animales de compañía infectados, de laboratorio o de granja. En un estudio llevado a cabo en Zaragoza, el 7% de los perros, el 44,4% de los terneros recién nacidos, el 17% de las vacas adultas y el 21,9% de los cerdos excretaban el parásito en las heces. La importancia de la transmisión de este parásito a través de los alimentos se refleja en los datos aportados por un sistema de vigilancia de las infecciones de origen alimentario. El *Foodborne Diseases Active Surveillance Program (FoodNet)*, comunicó en 1997 los siguientes datos: 2205 casos de *Salmonella*, 1273 de *Shigella*, 468 de *Cryptosporidium*, 340 de *Escherichia coli* O157:H7, 139 de *Yersinia*, 77 de *Listeria*, 51 de *Vibrio* y 49 de *Cyclospora*.

En los pacientes infectados por el VIH con diarrea, la presencia del parásito se demuestra en el 11-21% de los casos, siendo más elevado el porcentaje en los enfermos de países pobres. Un estudio llevado a cabo en Barcelona en 1994 sobre 1456 pacientes infectados por el VIH mostró la presencia de algún enteropatógeno en 253 (17%); la incidencia fue mayor en los homosexuales (26%) que en los adictos a drogas por vía parenteral (12%). El patógeno más frecuente fue *Cryptosporidium* (104 enfermos), seguido de *Salmonella* (78 pacientes). En otro estudio llevado a cabo en Madrid, en el 30% de los pacientes con criptosporidiosis intestinal aparecieron infecciones extraintestinales, que en el 61,5% fueron de localización biliar, y se observaron en el esputo en el 16,3% de los casos. (65)

La prevalencia de la enfermedad en países industrializados oscila entre 0.1 y 27.1%, con una media de 4.9%, mientras que en países en desarrollo los resultados son de 0.1 a 31.5% con una media de 7.9%, excluyendo los brotes epidémicos específicos y a los sujetos con SIDA. Aún cuando los estudios epidemiológicos han demostrado que la parasitosis está más difundida de lo que anteriormente se pensaba, es difícil determinar la extensión del problema, tanto a nivel médico como veterinario.

Fig.3 “Intercambio de material nutritivo entre Cryptosporidium y la célula”  
hospedera.



## CUADRO CLÍNICO Y PATOGENIA

En animales, la enfermedad aguda se caracteriza por diarrea acuosa, anorexia y pérdida de peso; no se presenta criptosporidiosis crónica. Se ha observado que hay animales que resisten la infección o curan espontáneamente, sin embargo, otros mueren (79). Algunos factores que influyen sobre las manifestaciones clínicas en animales son, la especie de que se trate, la edad y el estado inmunológico. (36)

En cuanto a la especie, se ha observado que algunos mamíferos como las ratas, ratones y cobayos, no desarrollan diarrea con la inoculación de ooquistes provenientes de ternera, mientras que especies jóvenes de simios, porcinos, caprinos y aves, presentan los síntomas característicos de criptosporidiosis con el mismo inóculo. (79)

Con respecto a la edad, experimentos realizados por Tzipori y cols. (80) con carneros neonatos y de distintas edades, libres de patógenos e inoculados con ooquistes de *Cryptosporidium* obtenidos de terneras enfermas, demostraron que la presencia de la enfermedad dependía de la edad del animal, encontrándose que los animales entre más jóvenes eran, mayores y más severos problemas tenían, y los animales de más edad, no presentaban manifestaciones clínicas. En experimentos semejantes se encontró que los lechones de más de 9 días no desarrollaban la enfermedad. (3). Esto sugiere que la presencia de la enfermedad depende de la edad del animal y de que los animales adultos desarrollan inmunidad a la criptosporidiosis.



Por otro lado, la importancia del estado inmunitario se demostró en estudios realizados en 5 potrillos árabes con inmunodeficiencia combinada (humoral y celular) que murieron a los dos meses debido a diarrea grave; se les encontraron ooquistes adheridos a la pared del estómago, intestino, conductos biliares y pancreáticos, por lo que se cree que la inmunodeficiencia incrementó la susceptibilidad a la infección, pues no hay casos de criptosporidiosis en potrillos normales. (3,36)

En las aves se ha encontrado la infección en vías respiratorias altas y se relacionan con algunos signos clínicos de gravedad variable, así mismo se han encontrado microorganismos en mucosa nasal y bronquial. (90)

En humanos, la infección por Cryptosporidium se divide clínicamente en dos categorías: a) Pacientes con función inmune normal y b) Pacientes inmunocomprometidos, como los que tienen Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida o que reciben terapia inmunosupresora.

a) En pacientes con función inmune normal. Se presenta diarrea líquida profusa, fétida, con presencia ocasional de moco, con duración de 1 a 3 semanas, anorexia, dolor abdominal, cólico, náuseas, fiebre y vómito que ceden al tratamiento sintomático (80). Ocasionalmente presentan síntomas no específicos como cefalea, mialgia, malestar general y debilidad, la diarrea y el dolor abdominal se exacerban con el alimento.(74)

Al examen físico, usualmente sólo se encuentran deshidratación; en cuanto a las anomalías radiológicas, no son específicas e incluyen la proyección de pliegues de la mucosa intestinal y desorden en la motilidad. (74)

b) En pacientes inmunocomprometidos. El desarrollo de la enteritis comúnmente es insidioso pero se incrementa severamente; en estos pacientes hay dolor abdominal, pérdida excesiva de peso y severa deshidratación. Ocasionalmente tienen períodos con síntomas disminuidos, pudiendo aplazarse y disminuirse. (74). Los pacientes con daño inmunitario pueden presentar un síndrome coleriforme con gran pérdida de líquido, tres litros o más al día y la diarrea puede durar desde días hasta años. La fisiología de esta gran pérdida de líquidos no se ha descrito bien, pero por los síntomas observados existe la posibilidad de que la causante sea una enterotoxina parecida a la toxina del cólera, hasta ahora no identificada.(3,59,80)

Se ha observado que algunos pacientes con deficiencia nutricional pueden presentar un curso de la infección semejante al que presentan pacientes con deficiencia inmune. (5,61)

Se han hecho pruebas de absorción intestinal en pacientes con criptosporidiosis, y en todos ellos se encontró esteatorrea, prueba de D-xilosa anormal e intolerancia a la lactosa, sugerentes daños a la mucosa del intestino delgado. (26,74). Los niveles séricos de fosfatasa alcalina y gamma-glutamyl-transpeptidasa están elevados, pero los niveles séricos de transaminasas y bilirrubinas son normales.

Radiológicamente, en pacientes inmunocomprometidos se encuentra dilatación en los conductos biliares, en la pared del intestino y desorden en la motilidad. (74)

Por otro lado, se ha descrito acortamiento de las vellosidades, criptas hipertróficas, disminución en la altura de las células de absorción, pérdida de la polaridad nuclear y vacuolización citoplasmática extensa. (26,78)

Cryptosporidium parvum, al parecer tiene varios ciclos esquizogónicos en el paciente inmunocomprometido, por lo que la infección puede continuar en forma crónica por meses o años. (59)

En los humanos, a diferencia de los animales, se ha observado que la edad no es un factor determinante para la infección (36); sin embargo, el mayor determinante de la gravedad en humanos, es el estado inmunológico del individuo (71,78,79), ya que la criptosporidiosis en pacientes inmunocompetentes es una enfermedad benigna, en donde el proceso es autolimitado y de corta duración, por lo que su curso es muy distinto al que tienen los pacientes inmunocomprometidos, en quienes este estado puede ser determinante en su muerte.

Pitlik y cols. (62), en 1983 realizaron un estudio de criptosporidiosis humana, hicieron comparaciones entre pacientes inmunocomprometidos y pacientes con función inmune normal, encontrándose diferencias importantes que a final de cuentas los inmunocomprometidos fallecieron mientras que los inmunocompetentes se recuperaron.

La localización de Cryptosporidium es preferentemente intestinal, especialmente en el último tercio del yeyuno y el íleon; pero se ha constatado la posibilidad de colonizaciones más amplias, tomando también el intestino grueso, estómago, duodeno, conductos biliares y el aparato respiratorio de los mamíferos. (43,90). En algunos pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida se ha encontrado Cryptosporidium en epitelios de bronquios y alvéolos (13,31), también se ha encontrado en pacientes con hipogammaglobulinemia en epitelio traqueal y glándulas accesorias (79,80).

A pesar de que el yeyuno es el más seriamente afectado, se describe también la presencia de este parásito en otras localizaciones, tales como: faringe, estómago, duodeno, vesícula biliar, íleon, apéndice y recto. Se observan como pequeñas estructuras esféricas basófilas, situadas en hileras o acumulaciones a lo largo del borde ciliado de las células epiteliales, provocando cambios como atrofia leve o moderada de las vellosidades, crecimiento de las criptas e infiltración mononuclear de la lámina propia.

Los factores específicos de virulencia de Cryptosporidium incluyen una serie de candidatos moleculares identificados por métodos inmunológicos y moleculares. Entre estos posibles determinantes de virulencia se encuentran:

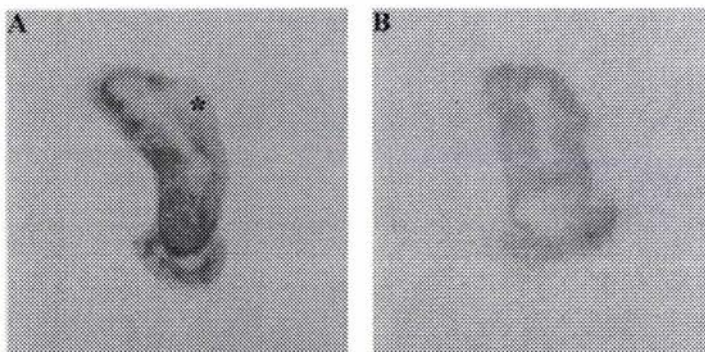
**Factores de adherencia** - Algunas de las moléculas caracterizadas incluyen: CSL ("circumsporozoite-like"), gp900, complejo gp15/40/60, TRAPC-1 ("thrombospondin related adhesion protein"), cp47 y Cps 500. La interacción de las glicoproteínas en zonas específicas de la membrana celular del huésped puede contrarrestar los movimientos

peristálticos y preservar la adherencia. Es probable que la utilización de moléculas redundantes maximice la oportunidad de adherencia; la selectividad de adhesión puede atribuirse a las diferencias cualitativas y cuantitativas de dichas glicoproteínas

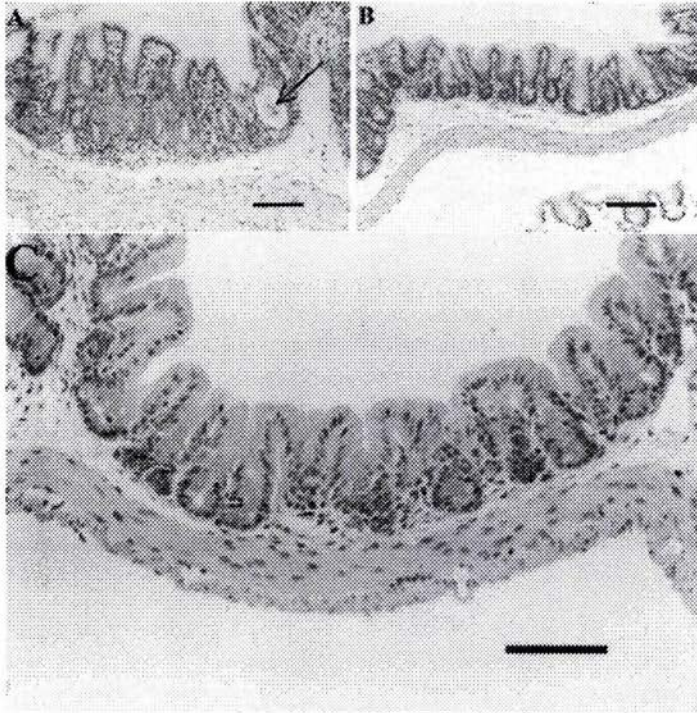
**Toxinas** - La mala absorción intestinal presente en la criptosporidiosis se ha relacionado con aumento en la secreción de H<sub>2</sub>O y Cl<sup>-</sup>. La citocinas pro-inflamatorias IL6, IL8, TNF- $\alpha$  y el reclutamiento de células inflamatorias ( PMN, células mononucleares) dan lugar a la liberación de PGE2 y TNF- $\alpha$  , y por lo tanto, a aumento de la permeabilidad celular, uno de los factores de patogenicidad asociados a este parásito. Aún no se ha determinado el efecto tóxico potencial de fosfolípidos o de una enterotoxina.

**Daño celular** - Producido por el parásito, y el debido a la respuesta inflamatoria. Se ha documentado la desorganización de las uniones celulares, pérdida de la función de barrera, liberación de lactato-dehidrogenasa e incremento en la muerte celular. Fosfolipasas, proteasas, o hemolisinas son moléculas que potencialmente pueden causar el daño tisular.

**Histopatología:** Los cambios histopatológicos asociados a este organismo incluyen: diferentes grados de atrofia de las microvellosidades, estas presentan romas, acortadas, ensanchadas y fusionadas, edema de la submucosa, infiltrado inflamatorio mononuclear e hiperplasia de las criptas que se ven elongadas y deformes. El grado de severidad de las lesiones se correlaciona con el número de organismos infestantes. Se pueden encontrar lesiones en todo lo largo de la mucosa pero los cambios más severos se presentan en el yeyuno distal y en el íleon. Los estadios del parásito se observan en la zona apical de la membrana del enterocito. En ratones de nueve semanas de edad se tomó una muestra de tejido cecal de una semana de infección se encontró una espesura difusa conteniendo numerosos dilataciones. La superficie del epitelio estaba torcida y se destacaba del Lumen excesivamente, en la lamina propia había macrófagos, fibroblastos, agregados nodulares de linfocitos, abscesos con neutrofilos, células necrosadas, la submucosa presentaba edemas, el íleon distal presentaba en ocasiones hiperplasia tal y como muestran las figuras siguientes:



La figura anterior muestra de tejido intestinal afectados con IBD (A) muestra sin afectación y (b) de 8-semanas de infección en ratones disminuidos en TCR $\alpha$ , demostrando la mayor cantidad de sitios afectados. En la figura A se observa la amígdala intestinal indicada con un asterisco.



Esta figura muestra una sección histológica de tejido intestinal embebido en parafina, esta muestra fue tomada de un ratón de 4 semanas de infección y con TCR $\alpha$  abatido, teñida con hematoxilina y eosina. La barra en cada figura corresponde a 100  $\mu$ m. (a) Ratón infectado en 1 semana de la edad con los oocistos de *C. parvum* y tratado con agua solamente. Observe la hiperplasia epitelial, la dilatación de la glándula, y la presencia de la ruina en la glándula dilatada indicada por una flecha. Un filtrado linfocítico está presente en la lamina propia. (b) Infectado de 1 semana de edad con los oocistos *C. parvum*. El aspecto del mucosa intestinal es indistinguible del control no infectado (c)

## COMPORTAMIENTO INMUNOLÓGICO

Se han realizado pocos estudios sobre el comportamiento inmunológico de *Cryptosporidium parvum*, pero se ha visto que las células T tienen una importante participación en la respuesta inmune contra este protozoo, también parece estar involucrada la mucosa del intestino donde ocurre dicha reacción. Son muchos los mecanismos de defensa que intervienen en la recuperación contra la criptosporidiosis pero no son totalmente conocidos. (19)

En el año 2000 se probó cual era el número mínimo de oocistos de *Cryptosporidium parvum* capaz de provocar una infección patógena en ratones adultos inmunosuprimidos. Después de un experimento piloto se demostró que un solo oocisto podía infectar a ratones inmunocomprometidos, posteriormente se realizó a gran escala. Los grupos de ratones fueron inmunosuprimidos con dexametasona 1, 2 fosfato (DEXp) puesta en su agua,

después de 8 días de inmunosupresión se inocularon los grupos con oocistos 1, 5, 10 y 10 oocistos encapsulados en agarosa, por ratón. Los oocistos en las heces fueron monitoreados por medio un anticuerpo monoclonal basado en un ensayo de inmunofluorescencia (IFA). En la necropsia se colectaron el bazo y la parte terminal del ileon, el peso del bazo fue usado como medida para ver el grado de inmunosupresión de la DEXp. La parte terminal del ileon se fijo y se sumergió en parafina para realizar cortes con microtomos y realizar el estudio histopatológico con ayuda de marcaje con hematoxilina y eosina, los oocistos fueron contados por medio de microscopio de campo brillante. La dosis mínima necesaria para provocar una infección en ratones inmunosuprimidos fue de 1 a 10 oocistos de Cryptosporidium parvum. (92)

En experimentos donde se utilizaron ratones atímicos, con número insuficiente de linfocitos T, se observó que fueron incapaces de autolimitar el problema, mientras que en ratones blancos eutímicos hubo únicamente infecciones transitorias. (43)

Aunque los estudios realizados sugieren que es la participación de la inmunidad celular la importante para el control de la enfermedad, también se ha observado que se requiere de la inmunidad humoral para eliminar la infección, ya que, en pacientes con hipogammaglobulinemia, en quienes se demostró la normalidad de la función de las células T, se observó que presentaban una severa infección. (11,16, 24, 28, 47,71)

Se han realizado estudios en ratones para observar la respuesta inmunológica, encontrándose comparativamente en un grupo control, un mayor número de linfocitos T-cooperadores y células Thy-1+ en las placas de peyer de los animales infectados. Por otro lado, los macrófagos y las células dendríticas interdigitantes, también están aumentados considerablemente en las placas de Peyer del yeyuno de los animales infectados. (29)

### GRUPOS MÁS SUSCEPTIBLES.

La criptosporidiosis en pacientes inmunocompetentes es un problema autolimitado ya que solo desarrolla una diarrea que dura unos cuantos días y tiene un curso muy distinto al que tienen los pacientes inmunocomprometidos que experimentan diarrea incontrolable y amenazante para la vida. (19)

En pacientes inmunocompetentes, no hay predominio de la enfermedad en algún sexo y puede pasar asintomático o curar espontáneamente sin infecciones asociadas.

Los grupos más afectados por Cryptosporidium parvum en orden de frecuencia e importancia son:

- 1.- Pacientes inmunocomprometidos
  - a) Pacientes con Síndrome de inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).
  - b) Pacientes con Hipogammaglobulinemia
  - c) Pacientes que reciben terapia inmunosupresora.
- 2.- Pacientes inmunocompetentes.
  - a) Manejadores de ganado

b) Viajeros.

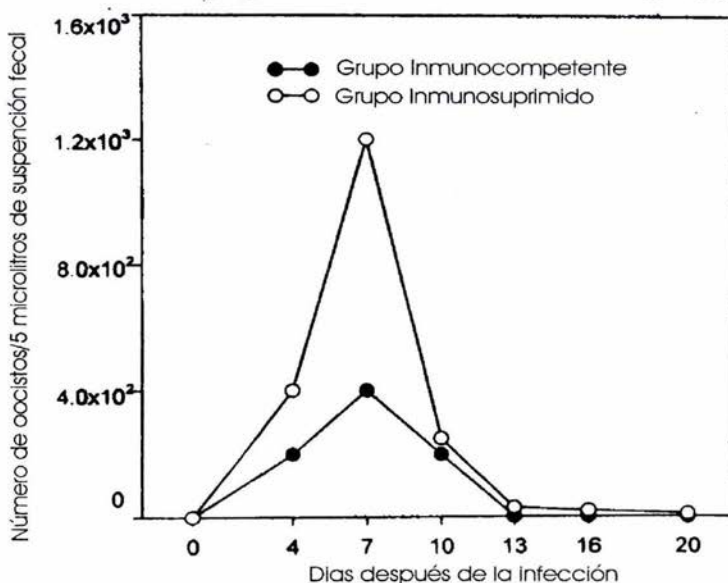
Se sabe que la infección con Cryptosporidium parvum puede presentarse en diversas partes del intestino como en el ileon, yeyuno y el cecum, y que comienza en una parte y puede movilizarse cambiando de localización. (19)

La primera línea de defensa de la mucosa intestinal son los linfocitos intraepiteliales (IELs) conocidos como Células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, con el predominio de los primeros. Estos liberan citocinas para una apropiada estimulación. Otras células T son los NK pero están en pequeñas cantidades. (19)

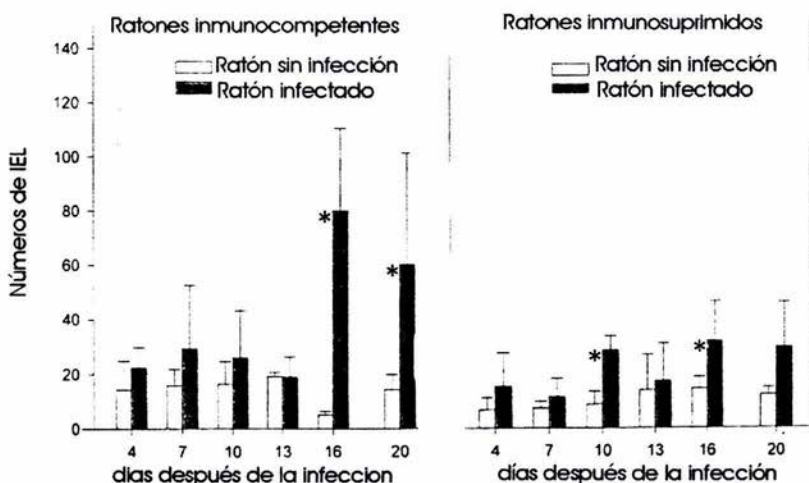
La infección por Cryptosporidium parvum afecta a IELs en la mucosa del intestino aumentando el número de las células de T CD8 y una proporción de la sustancia de activa a las células CD4 alterando la expresión de citocinas.(19)

En experimentos en ratones se observa que empiezan a arrojar oocistos a partir del 4 día postinfección (PI), el pico máximo se presentó al 7 día PI posteriormente el número va decayendo hasta llegar a cero el día 20 tanto para inmunocompetentes como inmunosuprimidos. El cambio del número de IELs se muestra que va incrementado, estos se contaron en las tres diferentes secciones del intestino, en los inmunocomprometidos (IMC) se le atribuye el aumento al yeyuno y al ileon. Figura 4a y 4 b (19)

**Figura 4 Cinética de cantidad de Oocisto por días después de la infección, comparación de inmunosuprimidos y inmunocompetentes**



**Fig. 4b: Muestra la cinética de IELs en el intestino delgado, observándose un aumento de estos tanto en ratones inmunocompetentes como en los inmunosuprimidos.**



El cambio de localización de los IELs, en los IMC la mayoría se encontraba en el área basal del epitelio 80.4 %, el resto estaban en zonas intermedias, en la etapa temprana de la infección gran cantidad de IELs migra a zonas intermedias o áreas apicales.

El cambio de subgrupos de linfocitos T se comparó la población de CD4 y la CD8, por medio de la citometría de flujo que indicó un significativo aumento en CD4 en los días 4 y 7, incluso para los controles. Para el día 13 la población de CD4 decreció dado por el incremento de IELs, en contraste, la población de células T CD8 permanecían constantes hasta el día 7 PI pero incremento significativamente los días 13, 16 y 20 PI. (19)

Con lo anterior se deduce que los IELs están dinámicamente involucrados en la respuesta inmune en ratones cuando hay infección por *C. parvum*, aumentando su número en gran escala entre los días 16 y 20 PI y cambiando sus localizaciones por el día 10 PI. La población de CD4 aumenta en fases tempranas de la infección (días 4-7) y la población de CD8 subsecuentemente aumenta significativamente a partir de los días 16-20 PI. (19)

Todo este mecanismo mantiene controlado a *C. parvum*, se especula que es por la citotoxicidad de CD8. (19)

En un estudio realizado durante 1996 y 1997, en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia Humana (VIH), se demostró que *Cryptosporidium parvum* afecta a los pacientes seropositivos y no así a los seronegativos en un porcentaje del 4.8% de 125 pacientes seropositivos. También se encontró que la frecuencia con la cual se encuentran los ooquistes está relacionada con el conteo de linfocitos T CD4+, usualmente se manifiesta

más en pacientes con conteo inferior a 100 células/mm<sup>3</sup> y presencia de síntomas gastrointestinales. Las observaciones se hicieron "en fresco"; luego al hacer frotis y tinción de Ziehl-Neelsen modificado. (40)

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son mediadores inmunológicos importantes en el control de la infección y se ha demostrado, la asociación entre el déficit de los linfocitos T y la persistencia de la infección. Se detecta la presencia de anticuerpos del tipo IgG e IgM en todos los enfermos, incluidos los infectados por el VIH. Aparecen a los seis días de la infección y se mantienen durante muchos meses, incluso más de un año. También es posible detectar la presencia de IgA en el líquido duodenal de los pacientes, apareciendo a los 4-6 días de la infección y desapareciendo a los 15-20 días; según algunos datos experimentales, estos anticuerpos podrían estar implicados en la resolución del cuadro clínico.

La proteína CSL, de aproximadamente 1300 kDa es la glucoproteína apical de los esporozoítos y merozoítos y su neutralización con anticuerpos monoclonales protege de la infección en un modelo *in vivo*. Es la responsable de la infectividad del esporozoito, ya que se une a las células epiteliales intestinales y, por lo tanto, es un blanco prometedor en el diseño de vacunas. (65)

Se sabe que una deficiencia de TCR- $\alpha^{-/-}$  conduce a una enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) creando auto anticuerpos contra tropomiosina y produciendo sesgos en los anticuerpos específicos del suero con incremento de la reactividad de antígenos bacteriales entéricos, esto como consecuencia de una disfunción de un componente humoral para la inducción y el mantenimiento. Todo esto indica que las células B están involucradas en el desarrollo de IBD. Por el contrario a las observaciones, la deficiencia en ratones de TCR- $\alpha^{-/-}$  x I $\mu^{-/-}$  (deficiencia de células T y B) desarrolla lesiones más severas que la deficiencia de TCR- $\alpha^{-/-}$  x I $\mu^{+/+}$ , lo que sugiere que las células B no son requeridas para desarrollar lesiones y que pueden suprimir la formación de lesiones en TCR- $\alpha^{-/-}$  (89)

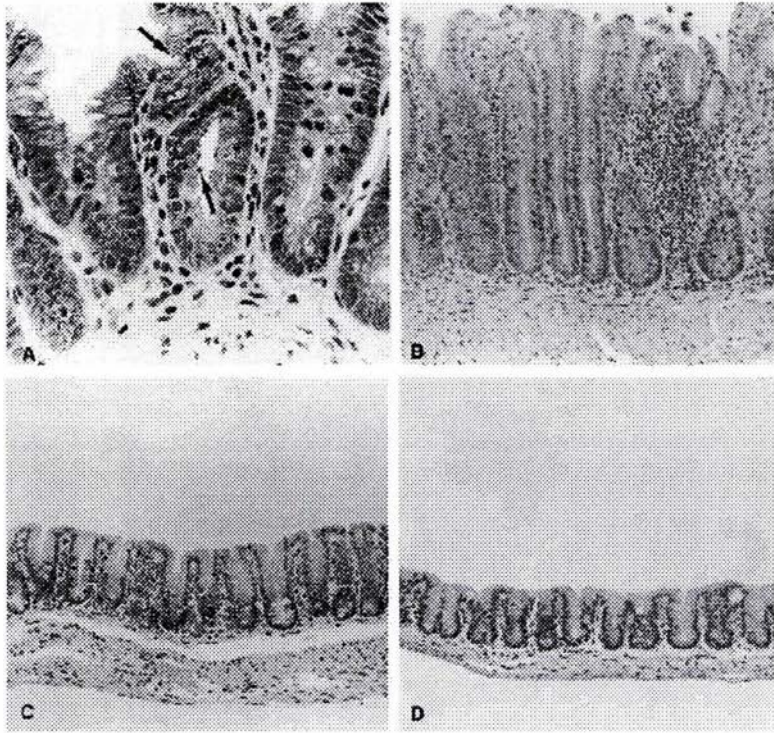
La colitis en ratones esta mediada por las células T en una deficiencia de dos interleucinas (IL) 10 y 2. Como en TCR- $\alpha^{-/-}$  hay infiltración de células B en lesiones intestinales y se han detectado anticuerpos anticolon en ausencia de IL-2. Se sugiere que las células B no son necesariamente implicadas en el desarrollo de la lesión. (89)

Las lesiones son similares tanto en la deficiencia de TCR- $\alpha^{-/-}$  x JH $^{-/-}$  como en TCR- $\alpha^{-/-}$  x JH $^{+/+}$ , solo que en la primera hay una hiperplasia ó no presentan cambios histológicos y las ubicaciones de la colonización son algo distintas. En la deficiencia de TCR- $\alpha^{-/-}$  x JH $^{+/+}$  hay infiltraciones de linfocitos, macrófagos y neutrofilos (Fig.5b), hay elongación de las glándulas, abscesos y edemas moderados en la submucosa. Las lesiones son progresivas.

En la deficiencia de TCR- $\alpha^{-/-}$  x JH $^{-/-}$  no se detectan lesiones cecales (figura 5c), por otro lado, en el epitelio medio existe una hiperplasia ocasional. En este estudio se ve demostrada que las células B son un componente necesario para la inducción de lesiones cecales en la deficiencia de TCR- $\alpha^{-/-}$  en una infección persistente de C. Parvum. Por otro lado se observa que en la deficiencia de TCR- $\alpha^{-/-}$  x JH $^{-/-}$  no se desarrollan lesiones



inflamatorias, lo que implica células B en la inducción de IBD en un ratón con  $\text{TCR-}\alpha^{-/-}$ . (89)



**Fig.5** A.- tejido del ileon de ratón,  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  X  $\text{JH}^{-/-}$  que muestra una infección persistente de C. parvum (flecha), B.-tejido cecal de ratón  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  X  $\text{JH}^{+/+}$  que muestra una infiltrado en la lamina propia, de leucocitos (particularmente linfocitos) elongando las glándulas hipercelularmente y se ve C. parvum. C.- tejido cecal de ratón  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  X  $\text{JH}^{-/-}$  muestra una infección persistente de C. parvum, con una estructura normal. D.- muestra de tejido cecal de ratón con  $\text{TCR}\alpha^{+/+}$  X  $\text{JH}^{+/+}$  con una infección transitoria con C. parvum, con una estructura normal. (89)

Se ha mencionado que las células T son muy importantes para combatir la parasitosis de este protozoo, y también se ha demostrado que la deficiencia de  $\text{TCR-}\alpha$  reportada con anterioridad, muestra una infiltración extensiva de células B, y la deficiencia de  $\text{TCR-}\beta$  x  $\text{TCR-}\delta$  solo muestra unas pequeñas agregaciones de células B, esto es la principal diferencia entre estas deficiencias entre las lesiones originadas por cada deficiencia. (88)

Algunos experimentos donde se inocularon oocistos de Cryptosporidium parvum en ratones deficientes de  $\text{TCR-}\beta$  x  $\text{TCR-}\delta$  muestran resultados que indican que aunque las células T  $\gamma\delta$ , no son necesarias para la inducción de inflamación intestinal en ratones

deficientes de células T  $\alpha\beta$ , infectados con Cryptosporidium parvum, su presencia altera la morfología de las lesiones que sobrevienen.

Una observación importante de las lesiones intestinales en la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) con deficiencia de TCR- $\alpha$  es la infiltración de células mononucleares, donde predomina la presencia de células B y células T  $\gamma\delta$  con una pequeña población de células TCR  $\alpha^{-}\beta^{+}$  y NK. También se han detectado infiltrados de IgD<sup>+</sup>. Los infiltrados de células B se encuentran en distintos puntos y también hay presencia de linfocitos difusamente. Esto hace pensar que las células B tienen un rol mínimo en la resolución de una infección de Cryptosporidium parvum.

Se ha encontrado que la presencia de células T  $\gamma\delta$  influyen en la proliferación o tráfico de células B, y también pueden ser centros de producción germinales y folículos linfoides, las células T  $\gamma\delta$ , se asocian a la producción de anticuerpos no específicos que incrementan el daño, desarrollando autoinmunidad e IBD, sin embargo las células T  $\gamma\delta$  no son requeridos para el desarrollo de la infección por Cryptosporidium parvum, pero si influyen en el tipo y el grado de severidad de las lesiones. (88)

Resumiendo lo anterior se puede sintetizar que los mecanismos responsables en la resolución en modelos experimentales involucran:

- Los linfocitos T CD4, en la criptosporidiosis aguda y crónica.
- La generación de interferón gamma, aunque su intervención en la resistencia es poco claro. Su importancia parece ser mayor en las infecciones secundarias.
- La IL-12, probablemente por la inducción de interferón gamma.
- Los anticuerpos, con un papel de menor importancia en la resolución de la enfermedad.

## TÉCNICAS DE DIAGNOSTICO

Antes de 1978, todos los diagnósticos de criptosporidiosis, se efectuaban por biopsias intestinales, ya que no se había detectado el parásito en heces. Posteriormente a esta fecha, el diagnostico se ha efectuado por la detección de ooquistes en las heces. (10)

Para establecer el diagnóstico de estos parásitos se puede recurrir a varias técnicas apropiadas, que pongan en evidencia la presencia de ooquistes de Cryptosporidium en la materia fecal.

Existen dos tipos de técnicas las cuales nos permiten solo la identificación del parásito y otras que nos permiten identificarlos y contarlos al mismo tiempo, estas técnicas son cualitativas y cuantitativas respectivamente.

Las técnicas cualitativas solo se basan en la presencia de oocistos de Cryptosporidium parvum presentes las heces o de muestras provenientes de biopsias. Estas técnicas nos permiten diferenciar e identificar los ooquistes de C. parvum de las levaduras.

Para mejores resultados de las técnicas cualitativas se puede realizar una concentración ya sea por flotación o sedimentación como son las técnicas de Faust y Ritchie, la de Sheatter y la de Telemán-Miyagawa.

En la actualidad y con los avances de la ciencia se han podido realizar un análisis cuantitativo que nos permiten evidenciar si la presencia de C. parvum es una infección masiva, moderada o leve. Las técnicas han evolucionado hasta casi poder saber con exactitud el grado de invasión y gravedad de la infección.

Las técnicas que se han empleado para el diagnostico de Cryptosporidium parvum son:

- a) Diagnóstico clínico
- b) Biopsias
- c) Técnicas de concentración por flotación o sedimentación
- d) Tinción de Kinyoun y otras tinciones
- e) Métodos inmunológicos
- f) Hematocitómetros
- g) Contadores Coulters
- h) Técnica de PCR semicuantitativa y cuantitativa
- i) Marcaje con fluorescencia con anticuerpos monoclonales
- j) Citometría de flujo
- k) Técnica de citometría de flujo de dos colores y usando partículas inmunomagnéticas

Estas técnicas mencionadas son empleadas en diversas áreas y con diversas finalidades, pero todas con el objetivo de poder combatir la infección por este parásito cuando se presenta en el humano o en diversas especies de animales.

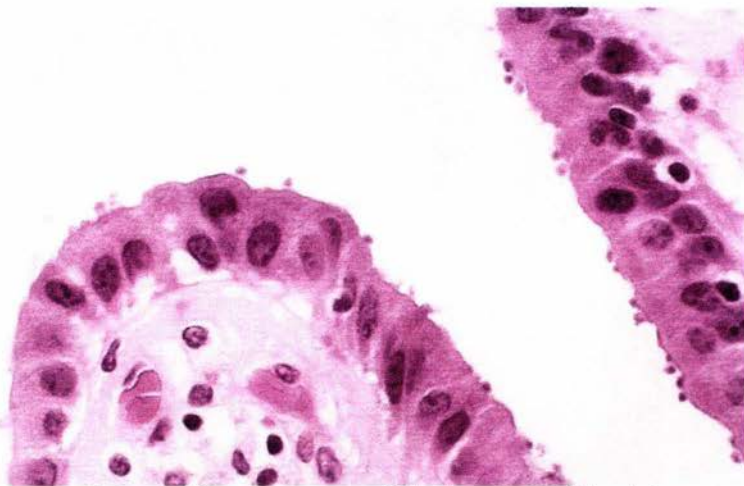
# FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS

## A. TÉCNICAS CUALITATIVAS.

- 1) Diagnóstico clínico
- 2) Biopsia
- 3) Concentración por flotación ó sedimentación
- 4) Examen en fresco
- 5) Tinción de Kinyoun y otras tinciones (dimetilsulfoxido, auramina-rodamina)
- 6) Métodos inmunológicos (ELISA, Anticuerpos monoclonales, IF, IFA)

El **diagnóstico clínico** se realiza a través de la sintomatología, la cual puede ser variable, ya que en pacientes inmunocompetentes, luego del periodo de incubación (4-14 días), comienza con un cuadro de diarrea aguda explosiva y profusa, acompañada de cólicos que persisten generalmente hasta 2 ó 4 semanas, puede presentarse asimismo pérdida de peso, náuseas y vómitos. En cambio, en el huésped inmunosuprimido, el cuadro es más grave, ya que la duración es más prolongada y se acompaña de síntomas generales marcados, de largo tiempo de duración (más 5 meses), pérdida de peso importante, flatulencias y vómitos.

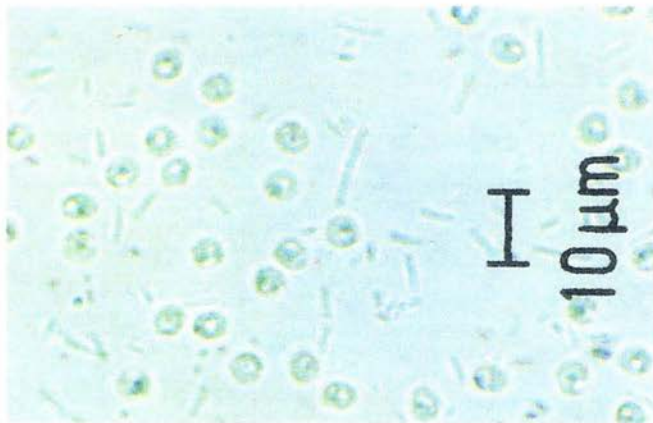
Otro camino para realizar el diagnóstico clínico es por medio de una **biopsia**, es dando de comer las heces sospechosas, sin preservadores, a animales de laboratorio recién nacidos, libres de patógenos. Si la muestra es positiva, los animales presentan una enteritis grave con diarrea verdosa muriendo a los dos o tres días de haber comenzado los síntomas; entonces se procede a la búsqueda de las distintas fases del parásito en el conducto gastrointestinal. (3, 36, 68,86)



Cryptosporidium parvum en células intestinales (biopsia)

La finalidad de las técnicas de **concentración por flotación ó sedimentación**, como la de **Faust y Ritchie**, es la de permitirnos recuperar en mayor cantidad los ooquistes, que son la forma diagnóstica en heces. También se puede recurrir a técnicas especiales, específicas para Cryptosporidium como la de **Sheatter** que es también de concentración-flotación y que usa una solución de azúcar con densidad de 1.27, mayor que el peso específico de los ooquistes del parásito. (3, 50,86). Además puede utilizarse el método de concentración por sedimentación de **Teleman-Miyagawa** modificado este método permite obtener un sedimento rico en ooquistes y sin presencia de material que impida la observación.

Cuando las **preparaciones en fresco** se observan en el microscopio y con contraste de fases, se puede observar varios tipos de ooquistes; indemnes, desenquistados, no esporulados, etc. (68,86)



Cryptosporidium parvum, ooquistes examen en fresco

Las técnicas cualitativas generalmente usadas ya con anterioridad y que utilizan contraste de fases, son las preparaciones en fresco se observan al microscopio de contrastes de fases ya que son más fáciles de distinguir, detectándose que poseen una doble pared y una estructura interna formada por esporozoitos y cuerpos residuales que no son claramente visibles.

Entre las tinciones se encuentran la **Kinyoun**, técnica modificada de **Ziehl-Neelsen**, la tinción de **auramina-rodamina (A-R)**, tinción de **Giemsa**, **PAS** modificado y la **Safranina** (14, 32, 60, 68,86). También tenemos evaluaciones por medio del microscopio de contraste diferencial y con ayuda de anticuerpos fluorescentes para detectar a los oocistos potenciales (7)

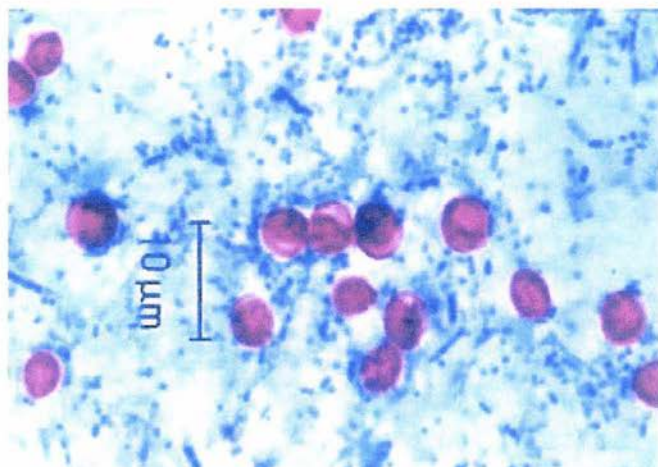
Para un diagnóstico de rutina rápido y específico, es de suma utilidad la observación del frotis del material fecal teñido con la técnica de **Ziehl-Neelsen modificada con dimetilsulfóxido (DMS)**, que es una técnica muy sencilla y específica para la detección de Cryptosporidium, ya que permite visualizar al parásito con objetivos seco débil e

inmersión, pudiendo diferenciar entre los ooquistes del parásito y las levaduras circundantes. (49).

Cryptosporidium aparece como una estructura esférica o ligeramente ovoide de 4 a 6 micras de diámetro, que por ser ácido-alcohol resistente retiene en colorante fucsina, apareciendo de color rojo rubí brillante con diferentes grados de intensidad, mientras que las levaduras, detritus alimenticio y el fondo, se tifen de verde intenso o azul, dependiendo del colorante que se use como contraste. (14, 60, 68,86)

La tinción de **auramina-rodamina (A-R)**, en donde los ooquistes se tifen de amarillo brillante (fluorescente sobre un fondo oscuro), observándose como una estructura circular de doble pared brillante e inclusiones densas y opacas en su interior. (60)

Hoy en día se reconoce la técnica de **Kinyoun** como método normalizado para la identificación de Cryptosporidium parvum y otras especies de Cryptosporidium, los ooquistes se observan de forma circular, con doble pared, con un halo alrededor del quiste y pequeñas inclusiones de color rojo en el interior. (60)

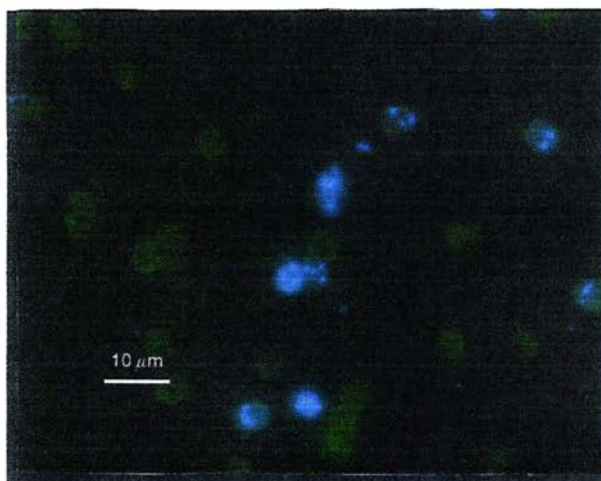


Cryptosporidium parvum, tinción ácido alcohol (T. Kinyoun)

En cualquiera de las anteriores situaciones, la muestra de materia fecal deberá fijarse con formol al 10% ó alcohol polivinílico para evitar contagios. (86)

Las **técnicas inmunológicas** más empleadas son **ELISA** en la cual se utilizan dos tipos de anticuerpos, uno que se adhiere al antígeno parasitario y otro que se adhiere al primer anticuerpo utilizado, visualizándose una aglutinación si es positivo.

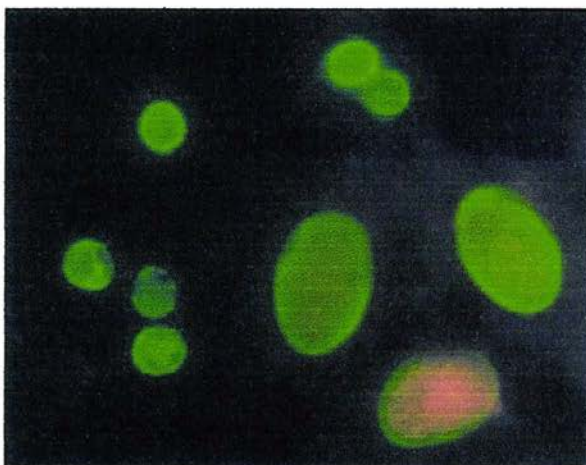
La técnica de la **inmunofluorescencia indirecta**, en la cual también hay intervención de dos anticuerpos pero el segundo anticuerpo esta marcado con alguna sustancia fluorescente. (85,86)



Cryptosporidium parvum. Tinción fluorescente de hidrócloruro de diamino fenilindol (DAPI)

Una técnica que ha resultado ser altamente específica en la detección de ooquistes de Cryptosporidium parvum en materia fecal usando anticuerpos monoclonales.

Para el marcaje con anticuerpos se puede realizar con por medio de un marcaje rápido ácido que es un método de **inmunofluorescencia con anticuerpos directa (IFA)** o **por medio de mancha rápida ácida (ASF)** en los cuales se tiene el criterio de la aparición de estructuras del mismo tamaño, forma y una fluorescencia verde brillante de la misma intensidad que las del control positivo. (37)



Inmunofluorescencia con anticuerpos directa (IFA). Quistes de Giardia y ooquistes de Cryptosporidium parvum

Los kits actuales utilizan el isotiocianato de fluoresceína con anticuerpos monoclonales.  
(30)

Charles y Sterling y Michael Arrowood (77) de la Universidad de Arizona desarrollaron un método de inmunofluorescencia utilizando una inmunoglobulina M como anticuerpo monoclonal, demostraron que este método tiene tanto una sensibilidad como una especificidad de 100% comparada con la técnica de Ziehl-Neelsen modificada.

Este método fue comercializado por los laboratorios Meridias Diagnostic como el "Merifluor Cryptosporidium kit". (33, 69,77)

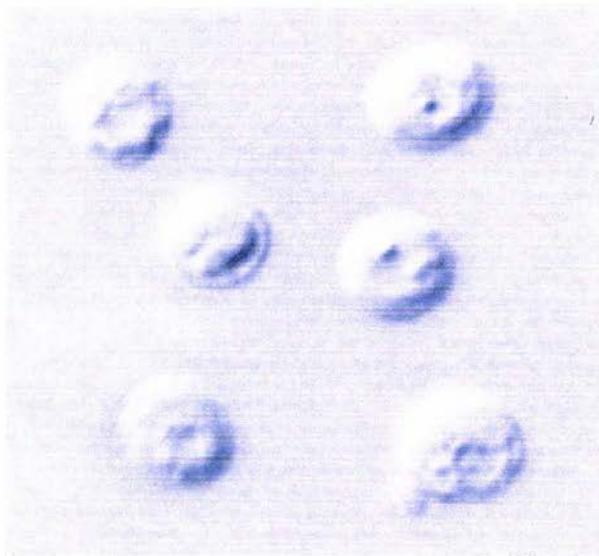
## B. TÉCNICAS SEMICUANTITATIVAS Y CUANTITATIVAS.

- 1) Conteo por hematocitómetro
- 2) Contador coulter
- 3) Técnica semicuantitativa PCR (44)
- 4) PCR (20)
- 5) Marcaje con fluorescencia
- 6) Citometría de flujo

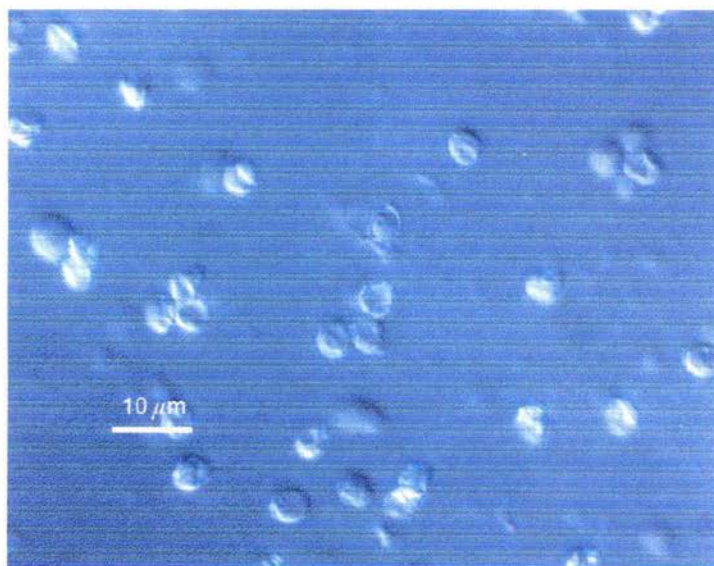
Dentro de los métodos cuantitativos tenemos al **Hematocitómetro** que se realizan en una improvisada cámara de Neubauer (línea brillante), bajo contraste de fase con una magnificación de 400X y con una carga de muestra estandarizada. Las 4 rejillas de 1 milímetro situadas en cada uno de los compartimentos se cuentan y se obtiene un número total de oocistos. Este método tiene una variante que es con un Hematocitómetro con cámara deslizante. (7)

La evaluación al microscopio puede hacerse con contraste diferencial de fases (DIC) y epifluorescencia, donde se usa una luz fluorescente usando el objetivo de 25X, Pero cuando se requiere un diagnóstico exacto y más preciso se utiliza un marcaje con anticuerpos monoclonales fluorescentes, actualmente estos anticuerpos son marcados con fluorescencia de isotiocianato (FITC) y requiere de filtros epifluorescentes, excitados a 450-490nm, con un haz dicromico de 510 y un filtro de barrido de 510-520nm, además de que requieren de centrifugación para aumentar en contacto de antígeno anticuerpo así como de una incubación, se toma alícuotas y se ponen en un portaobjetos el cual se le coloca un cubre objetos especial de vidrio y se sella. Está técnica nos permite identificar a los oocistos que son potenciales de los oocistos vacíos y con estructura interna y contarlos en su totalidad tomando en cuenta las diluciones. (7)





Cryptosporidium sp. Contraste diferencial de fases (DIC)

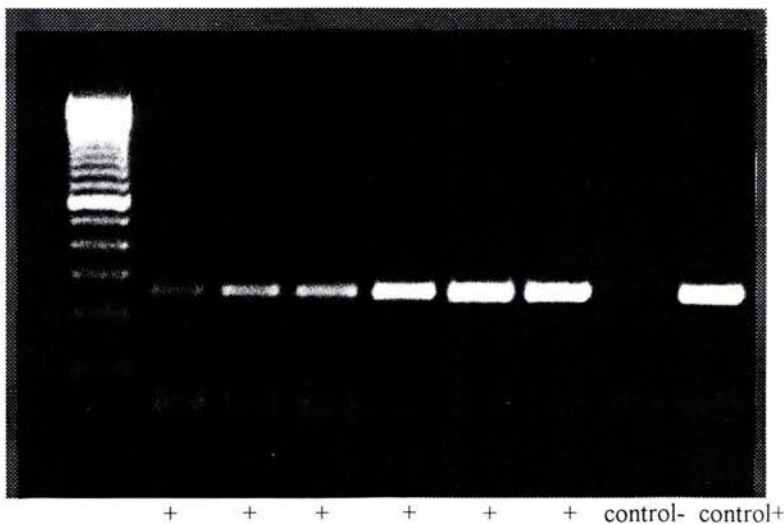


Cryptosporidium parvum. Contraste diferencial de interferencia (DIC)

En el **contador Coulter** se utilizan muestras frescas de oocistos, primero se realiza una primera inserción con un stock por medio de contraste diferencial para confirmar la monodispersión y homogeneidad de los oocistos y calibrar el Coulter, también nos permite ajustar la apertura del tubo en el que se realizara el conteo y dar el rango de tamaño de partículas que se contarán (por lo general el intervalo va de 3.5 a 6.5 micras), (7)

La **PCR** es una de las técnicas moleculares que es utilizada para el diagnóstico de Cryptosporidium y se basa en la detección material genético del organismo en cuestión, por medio de una amplificación de DNA (pueden ser pares de bases (20) ó un gen específico (44)). Esta técnica requiere de primers ó iniciadores específicos para amplificar la porción que se requiera. La PCR tiene 3 pasos, la desnaturalización en la cual el DNA se abre para que el primer se una a este y pueda empezar la amplificación, esta última recibe en nombre de anclaje, por último viene la extensión, seguida de una cuarta fase que se llama extensión final, donde se deja un tiempo establecido para que todas las amplificaciones sean terminadas. Cabe aclarar que cada fase tiene un tiempo y una temperatura establecida dependiendo del primer o de la porción del DNA ha amplificar, por lo regular en este diagnostico la desnaturalización va de 15 segundos a 1 minuto a una temperatura de 94 °C, el anclaje se da de 1 minuto a una temperatura de entre 50-60°C, la extensión va de 1-2 minutos a una temperatura de 72 °C, la extensión final se le puede dar de 5-6 minutos a una temperatura de entre 50 a 72 °C. Para que este tipo de técnicas se han cuantitativas se requiere una realización de un curva estándar, para poder comparar los productos obtenidos de la PCR, para esta curva se requieren muestras puras de oocistos y controles para la comparación de los productos de las muestras. La concentración de los productos puede estimarse por medio de imágenes densitométricas o por medio de corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamina y revelados con bromuro de etidio, estos son expuestos a rayos ultravioletas de 245nm y fotografiados. (20,44)

### Reacción de la Polimerasa en Cadena ( los resultados positivos se evidencian con una banda)



Se han realizado **inmunoensayos** que nos permiten ver la viabilidad del parásito ya que las demás técnicas solo realizan el conteo total de oocistos sin importar si están viables o no. En esta técnica se realiza por medio de anticuerpos específicos monoclonales

y anticuerpos policlonales, los cuales fueron desarrollados a partir de oocistos, de esporozoitos enquistados y esporozoitos, por tanto esta técnica nos permite la cuantificación de esporozoitos liberados. Lo más importante de esta técnica es que no presenta ningún tipo de reacción cruzada por que tiene una alta especificidad contra un antígeno del esporozoito (15). Otra manera de discriminar los oocistos viables y los no viables es por medio del mRNA, hsp70, en el cual se extraen la proteína 70 (hsp70) del mRNA y utiliza un oligo (dt)<sub>20</sub> marcado con granos magnéticos o por medio de incubación de oocistos lisados con DNasa I. La viabilidad de cada cepa fue determinada por toma de yoduro de propidio (PI). Se le aplica PCR utilizando los mismos primer para cada cepa que son específicos para Cryptosporidium parvum. Después de la extracción de mRNA se corre la RT-PCR con inhibidores de RNAsas. Los productos son analizados corriendo en un gel de agarosa y revelados con bromuro de etidio visualizados en un transiluminador de UV. El gravamen de la viabilidad de los oocistos que usaban el RT-PCR demostró una diferencia dramática en contenido del mRNA al comparar oocistos fresco e inactivados. Al comparar los parásitos inactivos, la sensibilidad de la RT-PCR fue significativamente mas alta usando el lisado con DNasa (técnica directa de la extracción del mRNA) que al usar gránulos magnéticos. (35)

La **citometría de flujo** utiliza la medición de la dispersión lateral y delantera de la suspensión de la muestra (con oocistos) por medio de la interrupción de rayo láser. Para este método se requiere de una solución estandarizada de oocistos puros para calibrar el aparato y el láser por lo regular es de argon a una longitud de onda de 488 nm.

Hay una variante de la técnica de citometría de flujo que suele ser más exacta en la que se utiliza un anticuerpo monoclonal específico, el cual se conjuga con partículas superparamagnéticas (biomag) con **isotiocianato de fluoresceína (FICT)** y **r-ficoeritrina (PE)**, esta conjugación se procesa en un citómetro de flujo equipado con un láser de Argon de 488 nm y un software especial para el análisis, al igual que en la técnica normal se detecta la dispersión delantera (FSC) y las dispersiones laterales (SSC), estas son llevadas a escalas logarítmicas por tanto los detectores para FICT (FL1) y PE (FL2) tienen que ser llevados a estas escalas. Lo que se obtiene por resultado una optimización de la técnica de citometría de flujo normal, ya que esta técnica tiene mas sensibilidad ya que el marcaje con estos aparece doblemente más fluorescente y marcados con FITC, PE, por si solos o combinados, lo que da la sensibilidad son las partículas superparamagnéticas. (57)

## USO Y APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE DIAGNOSTICO

Las diferentes técnicas mencionadas tienen un fin único, el cual es la identificación de Cryptosporidium parvum, pero tiene diversas aplicaciones las cuales van desde determinar el foco de infección o la forma de contagio hasta establecer un diagnóstico clínico en un determinado paciente.

La técnica de **PCR** es empleada más comúnmente para determinar la presencia de Cryptosporidium parvum detectándolo en sus diferentes habitats, por ejemplo, se sabe que Cryptosporidium parvum puede transmitirse en aguas municipales destinadas al consumo

humano, este experimento fue realizado en Canadá, arrojando como resultado la determinación de cuan contaminada estaban sus aguas con la presencia de este parásito. (20) También se desarrollo un método semicuantitativo para detectar infecciones de bajo nivel, utilizando tejidos provenientes de ratones, la cual utiliza una secuencia de un gen CP15/60, que nos permite estimar la presencia del parásito dentro del intestino, esta técnica permitió el desarrollo intracelular de C. parvum, así como ver la evolución de este cuando es expuesto a radiaciones gamma en diferente intensidad encontrándose que las dosis de radiación optimas (donde no hay productos de PCR) son de 25 a 35 Krad. (44)

Por otro lado esta técnica ha permitido detectar los diferentes genotipos de C. parvum que afectan a las diferentes especies entre ellas incluida la raza humana.

Las técnicas que han permitido la detección de Cryptosporidium parvum dentro de animales para el consumo humano son la de **marcaje rápido ácido** y en de **mancha ácida rápida**, estas técnicas por si solas son eficientes pero se ha encontrado que la combinación de estas dos nos permite una determinación cercana al 100%, esto se encontró en un estudio realizado en oriente donde el principal portador de este parásito son los ostiones, teniendo como criterios el corte histológico marcado que incluye azul de picromatil de Feugen, IFA y AFA, ésta combinación tiene suma importancia por que da negativa para con 46 enteropatógenos humanos. (37)

También se ha detectado la presencia de C. parvum en molusco destinados para el consumo humano, la detección se realizo con técnicas de marcaje que contiene **isotiocianato de fluoresceína** y utilizando el tracto gastrointestinal y agallas de dichos molusco, se encontró que 21 de 38 especies distintas de molusco presumían la presencia de oocistos de C. parvum (55.2%) cabe aclarar que se utilizaron diversas técnicas los cuales dieron falsos negativos (verde de malaquita, Safranina, azul de metileno, carbol-fucsina, auramina rodamina y Ziehl-Neelsen modificada) (30)

Otra forma de diagnosticar oocistos viables dentro de las aguas turbias del ambiente son los **inmunoensayos** que utilizan anticuerpos monoclonales específicos como el Mab CP7 y algunos anticuerpos policlonales, lo cual tiene una alta especificidad y precisión.

La **citometría de flujo** en sus dos variantes, hematocitometro, contadores coulter, marcaje con fluorescencia, son utilizadas para cuantificar la cantidad de oocistos presentes en las heces y para su identificación se utilizan las diferentes tinciones ya mencionadas.

## TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN

Hasta el momento no se ha encontrado un tratamiento adecuado para la criptosporidiosis; se han probado una gran variedad de terapias aun sin éxito. (3, 36, 79,65)

En personas inmunocompetentes donde la infección se autolimita, sola se les administra tratamiento de apoyo para la rehidratación y el alivio sintomático, ya que curan espontáneamente. (3, 50, 79,80) Se puede emplear paromomicina (65)

Sin embargo, en los sujetos inmunocomprometidos en donde sí es necesaria la administración de tratamiento adicional, ninguno de los medicamentos ensayados, tanto en la criptosporidiosis humana, como en la producción experimentalmente, ha demostrado ser eficaz. (36, 50, 73,80), pero algunos médicos recomiendan paromomicina y azitromicina durante 4 semanas. (53,65)

Se han probado más de cuarenta antimicrobianos, incluyendo coccidiostáticos y otros compuestos antiprotozoarios, antibióticos de amplio espectros antihelmínticos, pero ningún esquema ha sido eficaz.

Los medicamentos usados en la criptosporidiosis humana han sido los siguientes:

**Weinstein y cols. (1981):** Metronidazol y Loperamida.

**Sloper y cols. (1982):** Oxitetraciclina, Metronidazol, Eritromicina, Penicilina, Trimetroprima-Sulfametoxazo y Gentamicina.

**Stemmermann y cols: (1980):** Metronidazol, Trimetroprima-Sulfametoxazol,

Los medicamentos usados experimentalmente son:

**Monn y cols. (1982) en ternera:** Trimetroprima, Metronidazol.

**Tzipori y cols. (1982) en ratón:** Etopabate, Nicarbizina, Sulfaquinixalina, Furaladona, Enterolite-N, Sulametazina, Trinamida, Amprol, Fenamidina; zooquin, Halofuginosa, Salinomicina, Emtril, Aprinocida y Ampraliom. (79)

## MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS MEDICAMENTOS.

Los mecanismo de accion de los fármacos que se han empleado en contra de este parásito han sido diversos, a continuación se describirán los mecanismo de los fármacos que siguen vigentes en diversasa presentaciones y que siguen empleándose en contra de *Cryptosporidium parvum* y otro tipos de infecciones.

**Bactrim (Trimetroprima-Sulfametoxazol):** Estos dos fármacos tienen una asociación sinérgica, es decir se potencian sus efectos, ya que la sulfá se absorbe mas lentamente que el trimetroprima y se distribuye ampliamente en varios líquidos del organismo como el pleural, sinovial peritoneal y ocular. Los dos principios activos interfieren con la síntesis de Acido tetrahidrofólico de las bacterias, este ácido es un intermediario esencial para la producción de acidos nucleicos.

**Eritromicina:** es un antibiótico macrolido de ampliespectro, se absorbe en el tracto gastrointestinal y se difunde a todos los tejidos, su mecanismo es la inhibición de síntesis proteicas ya que se una a una subunidad del ribosoma 50.

**Espiramicina:** es un antibiótico macrólido antibacteriano, los macrólidos penentran y se acumulan en los fagocitos, monocitos y polimorfo nucleares, tiene una accion sinérgica ya que las concentraciones intrafagocitarias son altas en el hombre y esto explica la actividad de la espiromicina en contra de bacterias intracelulares.

**Furazolidona:** antimicrobiano y antidiarreico, derivado de una nitrofurano, el grupo nitro confiere la actividad antibacteriana, ya que interfiera en la síntesis de la pared celular inhibiendo las enzimas en la degradación aerobia o anaerobia de la glucosa y el piruvato, induce a profagos y altera el ADN bacteriano, pero se absorbe muy poco en el tracto gastrointestinal.

**Gentamicina:** esta recomendada para infecciones de vías urinarias, permanece por largo tiempo en el organismo, este principio activo actúa inhibiendo la síntesis proteico de los microorganismos ya que se une a un aminoglucósido, este fármaco se ve potenciado si se combina con Carbenzilina.

**Loperamina:** es utilizada para detener la diarrea aguda, reduce la movilidad peristálticos, ya que inhibe la liberación de la Acetilcolina y prostanglandinas.

**Metronidazol:** es un antirprotozoario antimicrobiano de bajo peso molecular, se difunde por todos los tejidos y líquidos del organismo, incluyendo el líquido cefalorraquídeo. Su mecanismo de acción es la reducción química intracelular que se lleva a cabo por mecanismos únicos del metabolismo anaerobio. Metronidazol reducido, es citotóxico, pero de vida media corta, interacciona con el DNA para producir una pérdida de la estructura helicoidal, rotura de la cadena e inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular.

Se clasifica como: Antibacteriano sistémico; antiprotozoario, antihelmintico.

**Oxitetraciclina:** es un bacteriostático que se difunde bastante debido a su unión a una proteína plasmática, este actúa inhibiendo la síntesis proteica de los microorganismos.

**Penicilina G:** inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana, se absorbe ampliamente en el organismo, la penicilina G benzatinidica inhibe la biosíntesis de un mucopéptido de la pared celular en la etapa de multiplicación activa.

Tanto en la criptosporidiosis humana como en la experimental, ningún tratamiento ha tenido eficacia.

Un aspecto importante de la infección es la relativa resistencia en cuanto a la edad de los hospederos (**resistencia innata**), ya que por instantes la criptosporidiosis es más común en niños que adultos y en roedores esta distinción es más marcada, esto puede deberse que en edades tempranas la flora normal no está desarrollada. Estudios precisos han demostrado una importante interacción de los carbohidratos de lectina en la infección intestinal en el hospedero.

## RESISTENCIA

La mayoría de las pruebas farmacéuticas se han realizado en animales en los cuales las especies de Cryptosporidium son la causa común de morbilidad (4), causando algunos de ellos reducción en la excreción de ooquistes y en formas experimentales los ratones presentan alteraciones histológicas pero sin manifestaciones clínicas de la infección. (4,82)

Los **ooquistes** de Cryptosporidium son resistentes a los desinfectantes comunes como: yoduros, ácido cresílico, hipoclorito de sodio, cloruro de benzalconio (17) y los aldehídos (4). La viabilidad de los ooquistes puede mantenerse de 9 a 12 meses IN VITRO (22,65).

Gracias a su pared gruesa, los ooquistes de *Cryptosporidium* resisten los tratamientos químicos usuales: no sufren alteración después de ser expuestos a 80 ppm de cloro/30 min, e incluso resisten 24 h en el cloro utilizado para blanqueado de ropa.

El empleo de ozono (1 ppmx5 min), la congelación o calentamiento (>72° C durante 1 min o 45 °C por 10–20 min) son métodos más efectivos. Cabe mencionar que permanecen viables al cabo de una semana en la mayoría de los congeladores caseros. Debido a su tamaño, únicamente los filtros capaces de remover partículas de 1 µm resultan confiables. (65)

Los métodos efectivos para la inactivación de los ooquistes incluyen la exposición a temperaturas bajas (debajo de 0 °C) o altas (arriba de los 65 °C) durante 30 minutos (17), también el tratamiento con fenol al 10%, y con amoníaco al 5%.

La **prevención** de la infección puede lograrse, evitando la exposición al agua no tratada y a vegetales no cocidos, sobre todo cuando uno viaja.

También es importante tomar precauciones cuando se está en contacto con personas o animales infectados por Cryptosporidium parvum.

## PROFILAXIS

Se ha observado que un azúcar simple puede competir o bloquear los sitios receptores reduciendo así la colonización. Se examinaron los efectos de monosacáridos y disacáridos sobre la susceptibilidad de la colonización en ratones infantes encontrándose que una dosis sencilla de sacarosa reduce significativamente la infección con Cryptosporidium parvum así como la dosificación 24 horas antes de la infección tiene un efecto preventivo. La isomaltosa tiene efecto similar pero en menor grado.

La explicación que se maneja es que la sacarosa y la isomaltosa inducen una diarrea osmótica que es un mecanismo de lavado mecánico sacando los oocistos antes de que pudieran infectar al epitelio, así como también se cree que la alteración morfológica, como el engrosamiento es relevante para aumentar la resistencia de las células ante la colonización. (38)

Por otro lado, en pollos, tres pruebas han demostrado la eficacia de anticriptosporidiosis dos de ellos comerciales como los derivados anticoccidiales diclazuril y toltrazuril, y el extracto de ajo. Al nivel recomendado, los diclazuril redujeron el rendimiento del oocistos de pájaros por 14.6% el toltrazuril tiene una eficacia de 52.1 % al nivel recomendado de dosis. De cualquier forma estas dosis tienen un alto significado en la reducción de ganancia de peso. La eficacia del extracto de ajo fue de 24.4%.

Ninguno de estos fármacos que también fueron probados con C. Parvum en ratones, mostró alguna actividad significativa anticriptosporidial sin embargo el peso de los polos se vio reducida mientras se aumentaba la dosis debido al efecto toxico. El ajo se sabe que tiene actividad antiviral, antibacterial y fungicida pero la efectividad como agente profiláctico en terapia jamás ha sido probado contra C. Baileyi. La dosis alta de ajo disminuyo el rendimiento de oocistos en los pájaros. Esta observación permito usarlo el allicin un producto contra C. parvum. Como conclusión se obtiene que ningún fármaco puede ser recomendado para quimioterapia o quimiprofilaxis para la criptosporidiosis avícola. (75)

## TRATAMIENTO DE SOPORTE

Hasta ahora, lo que se le puede ofrecer al paciente con criptosporidiosis es el tratamiento de soporte, el cual difiere según la magnitud y la duración de la diarrea. Debe mantenerse un nivel electrolítico en caso de deshidratación, con una solución glucosada que contenga sodio, bicarbonato y potasio. La hidratación intravenosa es necesaria después del vómito recurrente, acidosis severa, hipocalcemia, hipopotasemia, y niveles bajos de magnesio.



La administración de agentes antidiarreicos no específicos como loperamida, Kaopectate y colestiramida, han resultado efectivos en la disminución de la diarrea.

La alimentación parenteral es útil, pues ayuda a disminuir el número de evacuaciones.

La rehidratación y la reducción de agentes inmunosupresores, tales como los esteroides, son comúnmente el principal soporte de la terapia. (64)

Para la sintomatología se empleo con cierto éxito la octreótida, loperamida, el difenoxilato y la tintura de opio. (65)

## FARMACOS EN CONTRA DE C.PARVUM

En humanos, el tratamiento con diferentes drogas ha tenido poco éxito. De 21 pacientes con SIDA tratados con **Furazolidona** durante 2 meses, sólo uno obtuvo mejoría. Varios de estos pacientes, y otros más desde entonces, han mostrado mejoría sintomática pero con propagación persistentes de ooquistes, cuando se han tratado con tetraciclina, Furazolidona o con una combinación de quinina y clindamina. (43)

Más prometedor ha sido el uso de la **espiramicina**, un antibiótico macrólido, con el que un número considerable de pacientes han mostrado mejoría (21, 25, 43,64). EL mecanismo de acción de la espiramicina contra las especies de Cryptosporidium no se conoce. El mejoramiento clínico puede ser por un efecto directo sobre el protozoario, o puede deberse a los efectos sobre copatógenos. (64)

El tratamiento con **alfa-difluorometil-ornitina**, también se ha asociado con el mejoramiento clínico en numerosos pacientes con SIDA y criptosporidiosis. Sin embargo, la toxicidad hacia la médula ósea y hacia el área gastrointestinal, son un impedimento significativo para el uso de esta droga. (43, 73,74)

Se sabe que Cryptosporidium parvum utiliza una única vía de metabolismo para la síntesis de poliaminas, formando un metabolito intermedio que es la **agmatina** que producida por descarboxilación de arginina pasando a agmatina para que se de la conversión de putresina, espermina y espermidina.

Se ha encontrado que una dosis oral en ratones infantiles de **agmatina** por 8 días reduce significativamente la infección, incluso se encontró que una sola dosis de **agmatina** por un día (el día de la infección) reduce significativamente la infección de C. Parvum. Estos datos sugieren que la **agmatina** rompe el metabolismo de C. Parvum, resultando en una reducción en la habilidad del parásito para colonizar en ratones infantiles. (55)

Se cree que esta vía única utilizada por Cryptosporidium parvum tiene una desventaja que puede ser utilizada para reducir la infección de este ya que con anterioridad se descubrió que una dosis oral de putresina reduce significativamente la infección de C. parvum en ratones infantiles. La hipótesis manejada es que se de **agmatina** por vía exógena

puede romper la síntesis de poliaminas dejando la vía del hospedero relativamente sin infectarse.

Se ha observado una inesperada actividad de la  $\beta$ -**ciclodextrina**, que es usada como excipiente en la industria farmacéutica fue observada en contra de *C. Parvum*.

Las **ciclodextrinas** son oligosacáridos cíclicos naturales, y se han utilizado mucho en la industria farmacéutica en combinación de fármacos lipofílicos para optimizar la biodisponibilidad.

Se han realizado pruebas de viabilidad y de infectividad para demostrar que las  $\beta$ -**ciclodextrinas** por sí solas son eficaces en contra de la infección de *Cryptosporidium parvum*. Esto se demostró en ratones dando como resultado que las  $\beta$ -**ciclodextrinas** tienen un efecto preventivo 2 horas antes de la inoculación y 1 o 2 días después de la inoculación dado cada 1 hora. Este excipiente ha demostrado que provoca la hemólisis de eritrocitos por removiendo el colesterol de la membrana y los fosfolípidos como efecto secundario.

Por otro lado, se han hecho una gran cantidad de trabajos sobre el tratamiento sobre el tratamiento de esta coccidia en los pollos. Como la mayoría de estos agentes son coccidiostáticos, el tratamiento necesita ser prolongado; se ha tratado con drogas que son comunes a las usadas en los humanos. Se ha pensado que debe ponerse atención hacia las drogas empleadas en los animales como **quinoleínas, ionóforos y análogos de la tiamina**. Hay una preparación veterinaria llamada Amprolio, la cual se usa en animales y quizá sea efectiva en humanos. (8)

Sobre la base de los antecedentes anteriores, podemos establecer ciertos puntos de importancia, como son:

- *Cryptosporidium parvum* también puede infectar a personas cuya función inmunológica es normal.
- Algunos autores aseguran que la criptosporidiosis es más común que la infección por *Pneumocystis carinii* en pacientes con SIDA.
- En el laboratorio, la búsqueda de *Cryptosporidium parvum* debe hacerse en forma intencionada, ya que no es fácil su identificación por técnicas de rutina.
- Actualmente no existe un esquema de tratamiento eficaz, por lo que solo se aplica tratamiento sintomático.

Por último, la federal drugs administration (FDA) ha dado la autorización para la comercialización de **Alinia (nitazoxanida)** como tratamiento de suspensión oral para niños con diarrea causada por *Cryptosporidium parvum* y es la primera innovación en el ámbito de *Giardia lamblia*, este producto está disponible desde febrero del 2003, otra forma farmacéutica de la nitazoxanida es el Daxon que está disponible en tabletas dispersables y polvo granulado de dosis única. Este medicamento se absorbe en el tracto gastrointestinal en grandes cantidades, inhibe la polimerización de la tubulina en el parásito, en especial de los helmintos. En varios organismos parasitarios (*Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*) la nitazoxanida es reducida a un radical tóxico en un organelo del metabolismo de los carbohidratos.

## ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN Y CONCLUSIONES

El reconocimiento de la Cryptosporidium parvum como un agente etiológico de una enfermedad emergente, surgió ante la imposibilidad de identificar, diagnosticar y controlar al microorganismo patógeno por métodos convencionales, causante de brotes diarreicos en grupos inmunosuprimidos y en pacientes inmunocompetentes, así como en epidemias en diversos grupos de animales de granjas y domésticos.

Por tanto se fueron desarrollando diferentes técnicas diagnósticas para su detección, aislamiento e identificación del parásito en muestras de agua, alimentos y biológicas, que permitieron a los investigadores observar la complejidad e importancia de la enfermedad causada por Cryptosporidium parvum conocida como “**Criptosporidiosis**”, dentro del marco de salud pública de algunos países.

En cuanto a su transmisión que por lo regular es asociada a la calidad del agua y a ciertos productos alimenticios, se puede deducir y estimar que las poblaciones más vulnerables, son aquellos grupos en los cuales no hay agua potable, servicios de saneamiento y con una educación deficiente y a sus malos hábitos higiénicos ya que su transmisión es en sí oro-fecal, estos grupos también son susceptibles a otras enfermedades diarreicas.

También hemos podido observar que este parásito es en sí un organismo oportunista ya que en su mayoría afecta a personas inmunocomprometidas y a niños con las defensas bajas, aunque esto no es una regla ya que también se ha observado que afecta a personas con su actividad inmunitaria normal ocasionándoles una diarrea aguda que se autolimita en aproximadamente cinco días. No se ve una tendencia de éste parásito a algún tipo de sexo en especial ya que afecta tanto a mujeres hombres y niños.

Los métodos de diagnósticos actuales ya no son tan invasivos como eran anteriormente ya que se realizaban por medio de biopsias, ahora ya se puede identificar este parásito por medio de diferentes técnicas, para su diagnóstico rápido podemos emplear la técnica de Zielh-Neelsen modificada con dimetilsulfoxido (DMS) y hasta técnicas muy específicas y cuantitativas como lo es la PCR y la citometría de flujo.

Considerando la información publicada, en México hay tendencia a tratar la criptosporidiosis exclusivamente como producto morbilo de un parásito oportunista en enfermos de SIDA, hecho que deja al margen a la mayoría de zonas rurales y urbanas pobres y vulnerables de la investigación epidemiológica y del resultado de sus hallazgos.

## SUGERENCIAS.

Dado que los procedimientos convencionales del tratamiento de agua para su potabilización no eliminan al Cryptosporidium parvum se puede realizar los siguientes procedimientos:

- ❖ Poner filtros con poros menores a una micra ya que mayores no lo retienen debido a la estructura elástica de los ooquistes.
- ❖ Puede emplearse el método de Ozono y una red de Ultravioleta con filtración con los filtro antes mencionados.
- ❖ Hervir el agua en casa si no se cuenta con filtros o agua potable, ya que las altas temperaturas destruyen al parásito y se comprobado que es un método eficaz.
- ❖ Hacer brigadas en zonas endémicas para un seguimiento de este parásito e informa a la población de las medidas a seguir en contra de este tipo de infecciones a parte de potabilizar el agua.
- ❖ En las plantas potabilizadoras podrían iniciarse procesos de coagulación y floculación, el coagulante más utilizado es el sulfato de aluminio (alúmina). Actualmente ha cobrado importancia el uso de compuestos de aluminio poliméricos como el polihidroxiclорuro de aluminio (PACl), habiéndose demostrado que posee ventajas con respecto a la alúmina. Sulfato de aluminio (7,58 % de  $Al_2O_3$ ); PACl (18 % de  $Al_2O_3$ ), Poliamina cuaternaria (coadyuvante de coagulación); y Poliácridamida (coadyuvante de floculación).
- ❖ En la Facultad de Química, en la materia de Parasitología debería implementarse un protocolo en busca de este parásito ya que es el causante de una de la enfermedades emergentes de los últimos tiempos.

## GLOSARIO.

**ASF:** marcaje rápido ácido empleado para las bacterias que se vuelven visibles cuando son sometidas al análisis de tñido con ácido rápido de Ziehl-Neelsen.

**DEXp:** DEXAMETASONA 1,2 FOSFATO, utilizada generalmente para Artritis, tendinitis, bursitis, sinovitis, dermatitis, urticarias, eczemas, inflamación de las vías respiratorias, reacciones alérgicas localizadas o generalizadas, tumores del tejido linfoide, edema de ubre (asociado a diuréticos), piasias por compresión, neuritis, polineuritis

**DIC:** contraste diferencial de fases , técnica en la cual Intervienen dos o más colorantes y cada uno diferencia una estructura. El colorante que se usa en segundo lugar es de color diferente al del primero, denominándose colorante de contraste.

**DMS:** dimetilsulfóxido se utilizó originalmente como solvente en las industrias, no reacciona con los solutos, polar, se mezcla fácilmente con el agua y la mayoría de los solventes orgánicos, puede actuar como oxidante o como reductor, tiene la habilidad de penetrar en la piel intacta y tiene acción antiinflamatoria.

**FITC:** marcaje con anticuerpos monoclonales fluorescentes, marcados con fluorescencia de isotiocianato

**IBD:** enfermedad inflamatoria intestinal, se define como una inflamación crónica del tubo digestivo que puede acompañarse de complicaciones y manifestaciones extradigestivas.

**IELs:** linfocitos intraepiteliales constituidos por células situadas por encima de la lamina propia y la membrana basal entre las células intraepiteliales. Su función no está comprendida completamente, se sabe que son células T diferenciadas y maduras que al estimularse a través de TCR proliferan pobremente para producir un aumento de diversas citocinas, se sabe que median la acción citotóxica y citolítica.

**IFA:** inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal. Inmunofluorescencia con anticuerpos directa.

**IgA:** inmunoglobulina que se encuentra en secreciones corporales, producida por las placas de Peyer, amígdalas y otros tejidos linfoides.

**IgD:** inmunoglobulina se encuentra por lo general en la superficie de linfocitos B junto con las IgM, su función aun es desconocida.

**IgG:** inmunoglobulina que es la más abundante en el suero de los adultos se produce en las respuestas inmunitarias humorales secundarias, única que puede pasar por la placenta

**IgM:** inmunoglobulina que se encuentra en las superficies múltiples de las células B, siendo una macroglobulina, tiene actividad fijadora polivalente. Predomina en la respuesta inmunitaria primaria temprana.

**IL 2:** interleucina de origen celular de células  $T_H2$  activadas, células Tc, células NK, sus efectos principales son la proliferación de células T activadas, funciones de células NK y Tc, proliferación de células B y expresión de IgG2

**IL 6:** interleucina de origen celular de linfocitos  $T_H2$  activados y otras células somáticas, tiene efecto sinérgico con IL-1 o TNF induce fiebre, crecimiento de células B y producción de Inmunoglobulinas.

**IL8:** interleucina que origen principal celular de macrófagos y otras células somáticas, es un quimioatrayente para neutrófilos y células T

**IL12:** interleucina que origen principal celular de células B y macrófagos, tiene como efecto la proliferación de células Tc y NK activadas, producción del interferon gamma (IFN), promueve la inducción de células  $T_H1$ ; suprime funciones de las  $T_H2$ , promueve la respuesta inmunitaria mediada por células.

**IMC:** inmunocomprometidos, se les dice cuando el organismo carece o tiene alterado uno o varios mecanismos de defensa.

**NK:** natural killers son linfocitos granulados que contienen perforinas y granzimas para matar células blanco.

**PCR:** reacción de cadena de la polimerasa técnica que consiste en prolongar un segmento especial de pares de bases de ADN obtenidos de un organismo con el fin de hacer mas facil su detección.

**PROTEINA CSL (CIRCUMSPOROZIOTE-LIKE):** factor de adherencia, glucoproteína apical de esporozoitos y merozoitos de aproximadamente 1300 kDa

**T CD4:** linfocito T, correceptor para el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, marcador para células T cooperadoras; señalamiento; receptor para virus de inmunodeficiencia humana

**T CD8:** linfocito T, correceptor para el complejo mayor de histocompatibilidad clase I, marcador para células T citotóxicas; señalamiento.

**TCR:** receptor de célula T para antígeno, es un complejo de 8 cadenas cuando menos, de las cuales 4 de éstas cadenas son conocidas como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\gamma$ . por lo general van en dímeros  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ .

**TCR  $-\alpha$ :** tipo de receptor de células T con fenotipo de superficie  $CD4^+CD8^-$  (cooperadores)  $CD4^+CD8^+$  (citotóxico)  $CD4^+CD8^+$  (función desconocida aun)

**TCR  $-\alpha^- \times I\mu^-$  ó  $\times JH^-$ :** (indica deficiencia de células T y células B)

**TCR-β:** tipo de célula T receptora para CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> (cooperadores) CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> (citotóxico) CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (función desconocida aun)

**TCR-γ:** tipo de célula T para CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (citotóxico)

**TCR-δ:** tipo célula T receptora para CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (citotóxico)

**T<sub>H</sub>:** célula te cooperadora son necesarias para la producción de anticuerpos, por lo regular en presencia de antígenos proteicos, en su mayoría son células T CD4<sup>+</sup>, las células cooperadoras activan a la células B y esta colaboración puede darse de dos maneras por medio de citocinas o por contacto directo entre células.

**TNF-α factor de necrosis tumoral:** proviene de macrófagos activados, tiene efectos similares a IL-1, que son coestimular células T y a las células presentadoras de antígeno, crecimiento de células B y producción de inmunoglobulinas, activación de fagocito, inflamación y fiebre, hematopoyesis, aparte produce trombosis vascular y necrosis tumoral.

**TRAPC-1 THROMBOSPONDIN RELATED ADHESION PROTEIN:**  
trombospondina relacionada con una proteína de adhesión

# ANEXO I

## PROTOCOLO SUGERIDO

### **DETECCIÓN DE** ***Cryptosporidium parvum* EN** **DIFERENTES MUESTRAS**

Seleccionar la muestra ( materia fecal ó muestra de agua)

#### **Muestra Fecal.**

Es bueno realizar un examen en fresco o directo a toda muestra que nos llega, como un ejercicio de rutina y tal vez al observarlo nos evite realizar mas técnicas con la posible al identificación del parásito con este paso.

#### **Examen directo o en fresco**

Nos permite la detección de trofozoítos o quistes de protozoarios, y huevos o larvas de helmintos en buena cantidad.

#### **Procedimiento:**

Colocar 2mg de heces por separado en ambos extremos de una lámina portaobjetos. Agregar una gota de solución salina al 0.85% en uno, y una de solución yodada de D'Antoni o Lugol en el otro. Se homogenizan y colocan cubreobjetos o celofán recortado. Si hay moco o sangre, separarlos y teñirlos con azul de metileno de Loeffler para observar leucocitos y/o identificar amibas. Si la muestra es líquida, tomar la alícuota con una pipeta Pasteur. - Leer al microscopio (100x, 400x)

#### **CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA**

Este paso puede realizarse por medio de las técnicas la de Ritchie que es de sedimentación o la de Ferreira que es de flotación estas dos técnicas han demostrado su eficacia al emplearse. Un método alternativo que también ha probado su eficacia es la Sedimentación espontánea en tubo.

#### **Concentración de Ferreira**

Se emplean 5 gramos de materia fecal, el dispositivo de Ferreira y sulfato de Zinc con densidad 1.192, fijar con calor y metanol para posteriormente realizar la Tinción de Ziehl-Nielsen



## **Técnica de Sedimentación espontánea en tubo**

Esta técnica, que detecta con alta sensibilidad diversos enteroparásitos, desde amebas hasta huevos y larvas.

### **Procedimiento**

- Homogenizar 2-5g de heces con 10-20ml de solución salina fisiológica.
- Verter la mezcla en un tubo cónico de centrifuga de 50ml de capacidad, filtrándola a través de gasa.
- Completar el volumen del tubo con más solución salina y tapar el mismo, herméticamente. Agitar y dejar reposar por 45 minutos como mínimo.
- Tomar con una pipeta dos alicuotas: una de la mitad del sedimento y otra del fondo del tubo. Colocarlas en portaobjetos diferentes y a la alicuota del fondo agregarle gotas de Lugol, luego cubrirlas con laminillas de celofán.
- Observar al microscopio (100x, 400x) (4,5)

**La aquí propuesta es la de Ritchie.**

### **Concentración de Ritchie ó técnica de formol-éter,**

Utilizado para concentrar huevos, quistes y larvas sin importar la densidad que estos tenga, nos ayuda a eliminar bastante detritus orgánico con el éter y el formol nos ayuda a mantener la integridad de las formas parasitarias ya que es un fijador.

### **Material.**

Reactivos.

- ❖ Cloruro de sodio Q.P.
- ❖ Formaldehído en solución Q.P.
- ❖ Éter etílico comercial

### **Soluciones.**

- ❖ Solución salina isotónica
- ❖ Solución de formaldehído al 10%

Formaldehído	10mL
Agua destilada	90mL

Se colocan 10 mL de Formaldehído en un probeta o matraz volumétrico y se completa a 100 mL con agua destilada.

### **Vidriería.**

- ❖ Embudos de vidrio de 5 cm de diámetro
- ❖ Vaso de precipitados de vidrio de 50 mL
- ❖ Pipetas Pasteur con bulbo
- ❖ Portaobjetos
- ❖ Cubreobjetos
- ❖ Tubos cónicos para centrífuga de 15 mL

### **Aparatos.**

- ❖ Centrífugas con camisas para tubo de 13 x 100 mm
- ❖ Microscopio compuesto

### **Otros.**

- ❖ Gasa cortada en cuadro de 15 cm de lado
- ❖ Aplicadores de madera
- ❖ Gradilla

## **PROCEDIMIENTO**

- 1) Colocar 1 a 2 gramos de material fecal con ayuda del aplicador de madera en el vaso de precipitados y añadir 10 mL de solución salina, homogenizar con el mismo aplicador.
- 2) Pasar la suspensión a través de la gasa colocada en el embudo y recibir el contenido en el tubo cónico.
- 3) Se centrifuga durante 1 minuto a 2000 rpm.
- 4) Decantar el sobrenadante y se resuspende el sedimento con solución salina, volver a centrifugar y resuspender la veces que sean necesarias hasta obtener un sobrenadante de color claro.
- 5) Al último sedimento agregarle 10 ml de solución de formaldehído, se mezcla y se deja reposar 10 minutos.
- 6) Pasando este tiempo añadir 5 mL de éter, se tapan los tubos con tapones de caucho y se agitan enérgicamente durante 30 segundos.
- 7) En este paso podemos hacer una modificación ya que la técnica habitual es de centrifugar durante 2 minutos a 1500 rpm se puede realizar de 1500 a 2000rpm por 10 minutos para con esto aumentar la sensibilidad es decir tener una mayor concentración del parásito.
- 8) Después de centrifugar, se observan 4 capas; 1ra) Éter en la superficie; “da) un tapón con restos fecales; 3ra) Formaldehído y 4ta) sedimento en el fondo del tubo, conteniendo los elementos parasitarios.
- 9) Se introduce una pipeta Pasteur con cuidado de no mover mucho ni obtener muestra de las tres primeras capas y extraer con cuidado una gota del sedimento y colocarla en un portaobjetos.
- 10) Aplicar la tinción de Ziehl-Neelsen modificada
- 11) Observar al microscopio con aceite de inmersión a 100x.

### **Muestreo y análisis de agua.**

Realizar el muestreo procediendo a recolectar muestras en cada sistema de distribución de agua en los lugares afectados o donde se desea comprobar la existencia de este parásito. Esto incluye las fuentes de abastecimiento (nacientes, pozos, ríos), los tanques de almacenamiento y las redes de distribución; en estas últimas deberá recolectarse un mínimo de tres muestras de agua. En cada fuente de abastecimiento se recolecta un galón de agua; en los tanques de almacenamiento y la red de distribución se recolecta un mínimo de un litro de agua; se debe recoger la muestra en frascos estériles y se transportan en hieleras aproximadamente a 4°C.

#### **Procesamiento de las muestras de agua.**

- 1) Filtrar la muestra de agua a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.45µ y 47 mm de diámetro
- 2) Si se desea el enriquecimiento se puede utilizar agua peptonada pH 7.2 en Erlenmeyer de 500ml estériles. Cada membrana se coloca en este medio y se incuba por 18 - 24 horas a 37°C
- 3) Si solo se requiere el análisis se proceder a lavar esta membranas con la menor cantidad de solución salina isotónica dentro de un tubo de ensaye, esto con el fin de desprender de la membrana los ooquistes que se quedaron atrapados en ella
- 4) Colectar los lavados y centrifugarlos durante 2 minutos a 2000 rpm, tomar una muestra del sedimento y colocarla en un portaobjetos
- 5) La fijación de las muestras puede realizarse con formalina al 10% o pueden ser fijadas al calor y con metanol
- 6) Realizar la Tincion de Ziehl-Neelsen modificada
- 7) Observar al microscopio con aceite de inmersión a 100x

#### **TINCION DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADA**

Se realiza un frotis de heces fijadas con metanol, teñidas con carbol fucsina al 1% por tres minutos, posteriormente se decolora con ácido sulfúrico al 10% y contratada con verde brillante al 1% durante 30 segundos, la observación al microscopio se realiza con aceite de inmersión a 100x.

**Reactivos:** fucsina básica fenicada - solución de ácido-alcohol (3% de HCl en etanol de 95°) azul de metileno.

#### **Método:**

- 1) Extender la muestra y desecar con ayuda de un encendedor y pases suaves
- 2) Fijar con alcohol metílico y enfriar
- 3) Agregar Fucsina durante 5 minutos en caliente
- 4) Decolorar hasta desaparición del color con ácido-alcohol
- 5) Lavar con agua
- 6) Aplicar el Azul de metileno durante 1 minuto

- 7) Lavar con agua
- 8) Dejar secar a temperatura ambiente
- 9) Observar al microscopio con aceite de inmersión al 100x

**NOTA:** ya que esta tinción se basa en la característica de los parásitos de ser ácido-alcohol resistentes se puede tratar la muestra fecal con agua oxigenada a una concentración final de 5 volúmenes durante 10 minutos, lo que provoca que todos los ooquistes sean ácido alcohol resistentes y por tanto se incrementa más la sensibilidad de las tinciones.

## **RESULTADOS**

Se considera positivo si se observa cuando menos un quiste ooquiste claramente.

También es bueno que se sigan estos pasos cuando se realiza una toma de muestra de agua por si es positiva la detección poder informar a la autoridades correspondientes del lugar y la zona de la cual procede la muestra:

## **DESCRIPCIÓN DEL SITIO**

- Nombre del sitio
- Ubicación del sitio
- Distancia entre el lugar de la muestra y la residencia más cercana
- Tipo de sitio (origen de los desechos, rellenos sanitarios, represas superficiales, vertederos)

## **PREOCUPACIONES DE LA COMUNIDAD**

- Registro de quejas del público relacionadas con el sitio, el medio ambiente y la salud
- Preocupaciones por la salud y de otro tipo identificadas durante las reuniones comunitarias
- Registro de acciones llevadas a cabo por el estado o la unidad de salud del municipio en o cerca del sitio, como respuesta a los aspectos de salud, preocupaciones o quejas

## **DATOS SOBRE EFECTOS EN LA SALUD**

- Registros y estudios sobre salud comunitaria que puedan haberse realizado en la comunidad
- Identidad y fuente de bases de datos sobre efectos en salud pertinentes

## **INFORMACION DEMOGRAFICA**

- Población cercana potencialmente afectada por el sitio

- Indicadores de poblaciones sensibles en la vecindad del sitio (escuelas, guarderías, hospitales, asilos)
- Edad y sexo
- Número aproximado de personas que utilizan agua de pozo para beber si procede de uno la muestra
- Clasificaciones de arroyos y usos del agua corriente hacia abajo del sitio Agricultura, acuicultura, ganadería caza, pesca cerca del sitio
- Resumen de los datos de monitoreo en todos los medios ambientales, incluyendo información pasada y presente

## **ASEGURAMIENTO Y CONTROL DE LA CALIDAD**

- Información de laboratorio sobre colecta, transporte, almacenamiento y análisis de la muestra (uso de estándares certificados, blancos, calibración del equipo, de los porcentajes de recuperación y del método seleccionado)

## **INFORMACION SOBRE RUTAS AMBIENTALES**

### **Agua Subterránea o Profunda**

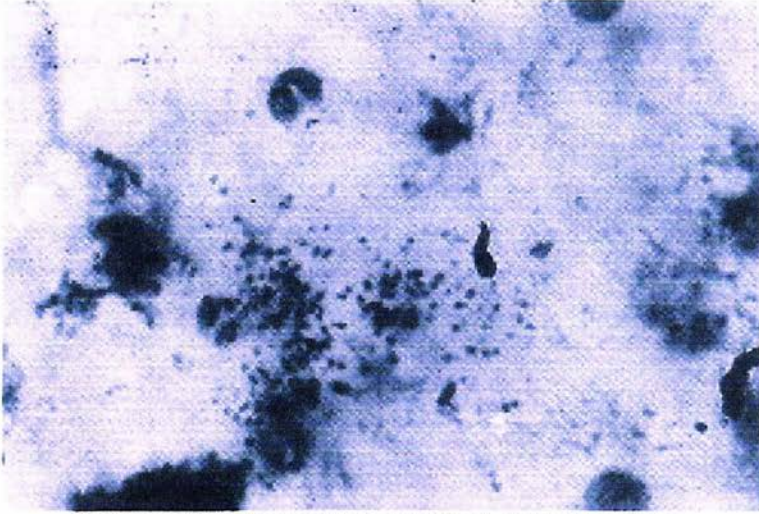
- Mapa de contornos de la tabla de agua y de pozos de monitoreo si los hubiere

### **Agua Superficial**

- Mapa de inundaciones (de un siglo)
- Datos del muestreo y descripción del muestreo incluyendo tabla de resumen

**Por último para un mejor resultado y exactitud de la identificación de *C.parvum* puede utilizar algún protocolo que emplee la PCR como método primordial.**

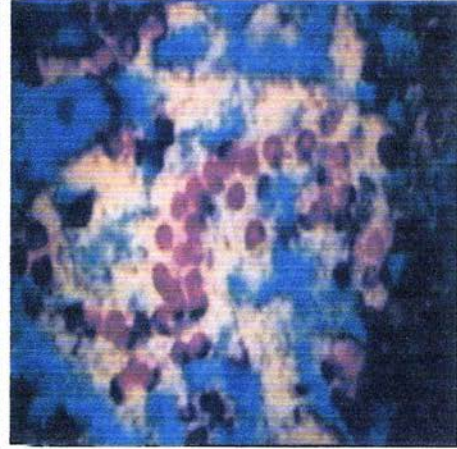
## ANEXO II



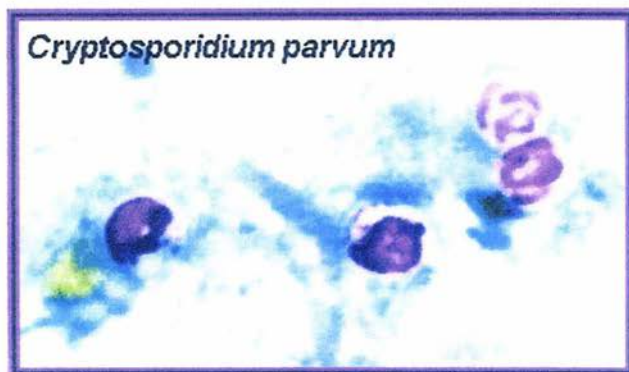
*Cryptosporidium parvum* en materia fecal. Examen en fresco



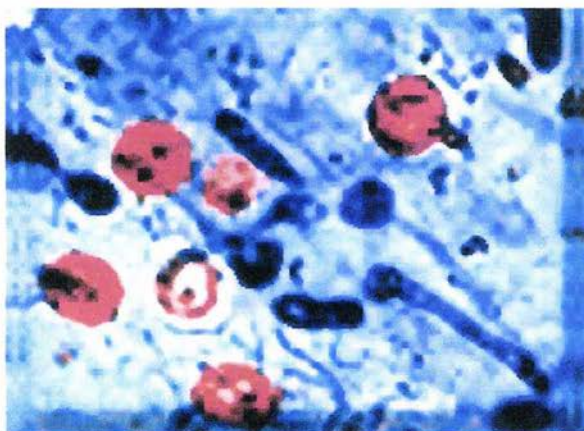
*Cryptosporidium*, Tinción de kinyoun



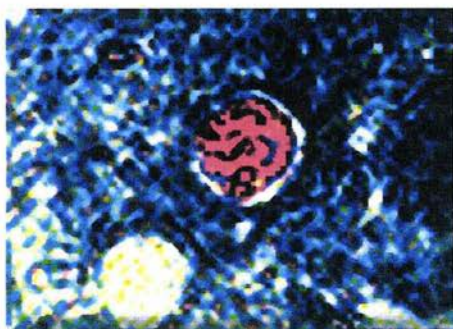
*Cryptosporidium* con 4 esporozitos T. kinyoun



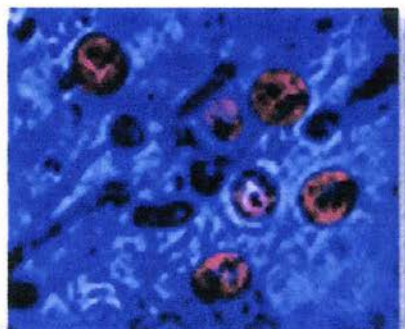
Oocistos de *Cryptosporidium parvum* teñidos de rojo brillante o púrpura, como se ve en esta preparación, Tincion ácido alcohol.



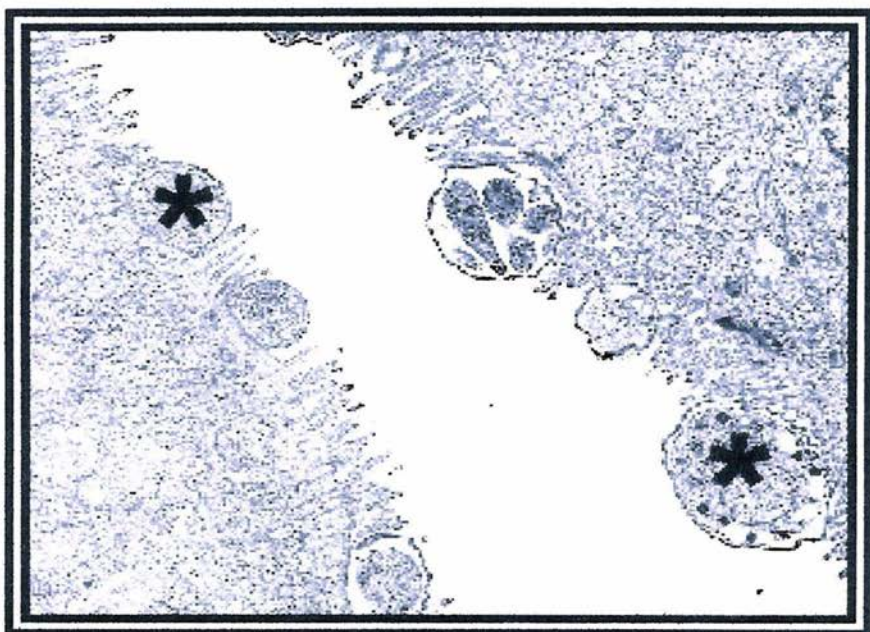
Ooquistes de *C.parvum*. Tincion ácido alcohol



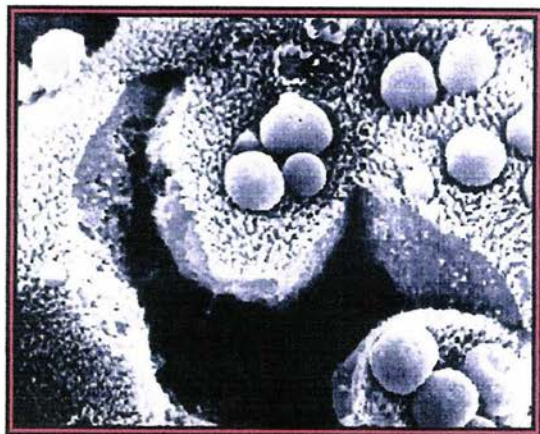
Ooquiste de *C.parvum*. T. ácido alcohol



Trofozoitos de *C.parvum*.1000x

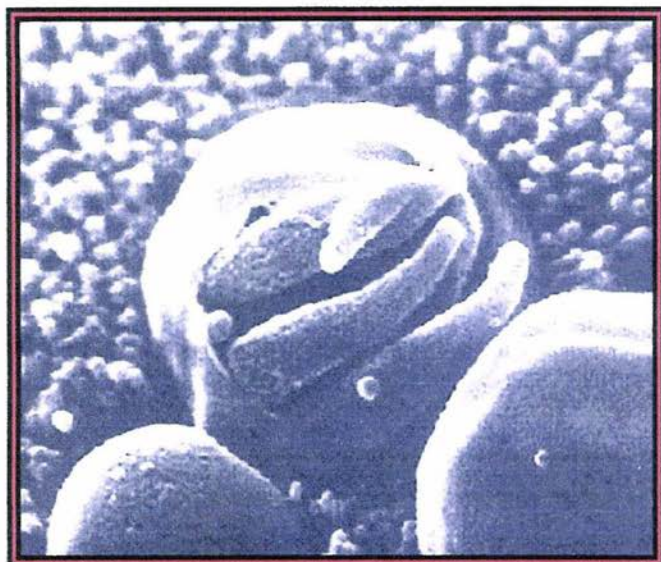


Micrografia electronica que muestra etapas severas de *Cryptosporidium* (dos estan macardos con asterisco) en el epitelio intestinal de una oveia



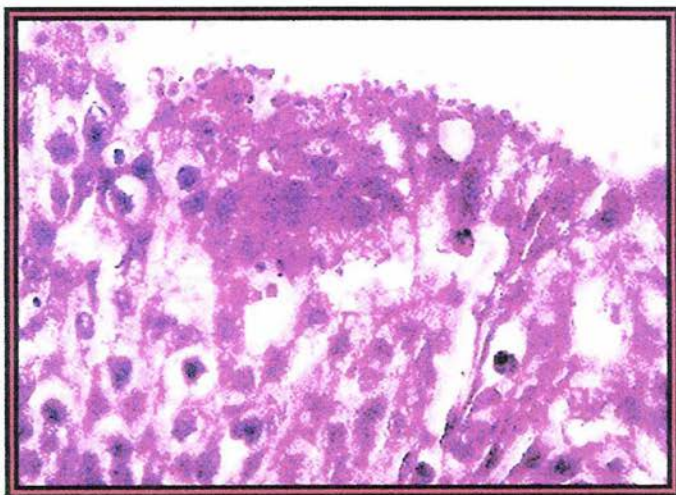
Micrografia electrónica de barrido muestra a *Cryptosporidium* habitando el trato intestinal.  
Muestra de un tejido animal  
(foto obtenida de : Gardiner *et al.*, 1988, An Atlas of Protozon Parasites in Animal Tissues, USDA Agriculture Handbook No. 651.)





Micrografía electrónica muestra un meronte roto con merozoitos adentro. Muestra de tejido animal.

(foto obtenida de : Gardiner *et al.*, 1988, An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues, USDA Agriculture Handbook No. 651.)



Biopsia de la traquea de un pavo con numerosos *Cryptosporidium*. Tinción Kinyoun  
(foto obtenida de: Gardiner *et al.*, 1988, An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues, USDA Agriculture Handbook No. 651.)

## BIBLIOGRAFIA.

1. Akill, D. And Harp J.A.. "A factor derived adult rat and cow small intestine reduces Cryptosporidium parvum infection in infant rats". J. Parasitol. 86/5/979-982 (2000)
2. Albert, G. Bell, L.M., Kirkpatrick,C.E "Outbreak of Cryptosporidiosis in a Day Care Center". Pediatrics/77/152-157 (1986).
3. Amador López R. "Criptosporidiosis". Rev. Infect. Mex. 6/8/279-290 (1986).
4. Angus, K.W. Hutchinson, G., Campbell, I., and Snodgrass. "Prophylactic effects of anticoccidial drugs in murine Cryptosporidiosis". Vet. Rec. 114/116-168 (1984)
5. Barriga, A.G., Cardeña, C.J., Estrada, P.S., Padierna, O. L., Cruz, C.G. Ruiz, S.D., Gómez, C.G., Peredo, L.V, "Criptosporidiosis asociada con SIDA: informe de un caso". Infectología 5/2/33-36 (1985).
6. Baby,D., Blundell, N., and Hart, C.A. "The development and performance of a simple, sensitive method for the detección of Cryprosporidium oocysts in feces". J. Hyg. Camb. 93/2/317-323 (1984).
7. Bennett, J.W., Mark, R. G., Le Moëneic, S., Schaefer F.W. and Lindquist H.D.A. "a comparison of enumeration techniques for Cryptosporidium parvum oocysts" J. Parasitol. 85/6/1165-1168 (1999).
8. Berk, R.N., wall, S.D, Mc. Ardle, C.B., McCutchan, J.A., Clemett, A.R. Rosenblum, J.S. Premkumer, A. And Megibow, A.J., "Cryptosporidiosis of stomach and small intestine in patients wiht AIDS" Am. J. Roentgenol 143/549-554 (1984)
9. Berkowitz, C.D., and Seidel, J.S., "Spontaneous resolution of cryptosporidiosis in a child with acquired immunodeficiency syndrome". Am. J. Roentgenol 143/549554 (1958).
10. Blanco, R.R., Samayoa, J.C., "Diarrea y criptosporidiosis en Guatemala". Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 45/3/139-142 (1988)
11. Booth, C.C., Shavin, G., and Doormashkin, R.R., "Immunodeficiency and criptosporidiosis (Clinical Patological Conference), Br. Med. J. 281/1123-1127 (1980).
12. Boher, Y., Cáceres, D.G., Urbina, G., gonzáles, R., Pérez, Schael, I. Y tapia, F. J. "La infección por Cryptosporidium afecta la densidad de los subgrupos leucocitarios de las placas de Peyer intestinales". Rev. Mex. Parasitol. 3/1/223 (1990).
13. Brady, E.M., Margolis, M.L., Korseniowsky, O.M., "Pulmonary cryptosporidiosis in acquired immune deficiency syndrome". JAM 252/89-90 (1984).
14. Bronsdon, MA., "rapid dimethyl Sulfoxide modified Acid fast stain of Cryptosporidium sp. Oocysts in stool specimens". J. Clin. Microbiol. 19/6/952-953 (1984).
15. Call, J.L., Arrowood, M., Xie T.L., Hancock K. And Tsang V.C.W. "Immunoassay for viable Cryptosporidium parvum oocysts in turbid enviromental waters samples". J. Parasitol. 87/1/203-210 (2001)
16. Campbell, P., Currente, W.L. "Demonstration of serum antibodies to Cryptosporidium sp. in normal and immunodeficient Humans with confirmed infections". J. Clin. Microbil. 18/1/165-169 (1983)

17. Campbell, I., Tzipori, S., Hutchinson, G., and Augus, K.W. "Effects of disinfectants on survival of Cryptosporidium oocysts". *Vet. Rec.* 111/414-415 (1982).
18. Castro-Hermida J.A., Freire-Santos F., Oteiza-López A.M. and Ares-Mazás E. "Unexpected activity of  $\beta$ -Cyclodextrin against experimental infection by Cryptosporidium parvum". *J. Parasitol.* 86/5/1118-1120 (2000)
19. Chai Y.J., Guk S.M., Han K.H. and Yun K.C. "Role of intraepithelial lymphocytes in mucosal immune responses of mice experimentally infected with Cryptosporidium parvum". *J. Parasitol.* 85/2/234-239 (1999)
20. Chung E., Aldom J.E., Carreno R.A., Chagla A.H., Kostrzynska M., Lee H. Palmaterr G. Trevors J.T., Unger S., Xu R., De Grandis S.A. "PCR-based quantitation of Cryptosporidium parvum in municipal waters samples". *J. Microbiol.* 119-128 (1999).
21. Collier, A.C., Miller, R.A., and Meyers, J.D., "Cryptosporidiosis after marrow transplantation: person to person transmission and treatment with spiramycin". *Ann. Intern. Med.* 101/205-206 (1984)
22. Current, W.L., and Haynes, T.B., "Complete development of Cryptosporidium in cell culture". *Science* 224/603-605 (1984).
23. Current, W.L., and Long, P.L., "Development of human and Calf Cryptosporidium in chicken embryos". *J. Infect. Dis.* 148/6/1108-1113 (1983).
24. Current, W.L., Reese, N.C, Ernest, J.V. Bailey, W.S., Heymen, M.B., and Weinstein, W.M., "Human Cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient. Persons". *N. Engl. J. Med.* 308/21/1252-1257 (1983)
25. Chandrasekar, P.H., "Cure of chronic Cryptosporidiosis during treatment with azidothymidine in a patient with the acquired immune deficiency syndrome". *Am. J. Med.* 83/2187 (1987)
26. Chavarria, P., Valdovinos, M.A., Robles, D.G., tena, M., Pasquet, A., y Wolpert, E., "Alteraciones gastrointestinales en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida". *Rev. Invest. Clin. Mex.* 39 supl./25-33 (1987).
27. D'Antonio, R.G., Winn, J.P., Taylor, T.L., Gustafson, W.L. Current, M.H., Rhodes, G.W., "A waterborne outbreak of Cryptosporidiosis in normal host" *Ann. Intern. Med.* 103/886-888 (1985)
28. De Hovitz, J.A., Pape, J.W., M. Boncy, and W.E. Johnson, Jr. "Clinical manifestations and therapy of Isospora belli infection in patients with the acquired immunodeficiency syndrome". *N. Engl. J. Med.* 315/87-90 (1986).
29. Du pont, H.L. "Cryptosporidiosis and the Healthy host". *New Engl. J. Med.* 312/20/1319-1320
30. Freire-Santos F., Oteiza-López A.M., Vergara, C.C.A., Ares M.E., Álvarez E. S. and García M.O. "Detection of Cryptosporidium oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption" *J. Parasitol.* 86/4/853-854 (2000)
31. Forgacs, P., Tarhis, A. "Intestinal and bronchial cryptosporidiosis in an immunodeficient homosexual man". *Ann Intern. Med.* 99/793-764 (1983)
32. García, S-L., Brucker, D.A., Brewer, T.C. y Shimizu, R.Y. "Techniques for the recovery and identification of Cryptosporidium oocysts from stool specimens". *J. Clin. Microbiol.* 25/1/185-189 (1983)

33. García, S-L., Brewer, T.C., and Bruckner, D.A. "Fluorescent detection of Cryptosporidium oocyst in human fecal specimens by using monoclonal antibodies". *J. Clin. Microbiol.* 25/1/119-121 (1987).
34. Garza A. V. "Criptosporidiasis: Nueva enfermedad, nueva amenaza relacionada con el agua" internet.
35. Gobet P. And Toze S. "Relevance of *Cryptosporidium parvum* hps70 mRNA amplification as a tool to discriminate between viable and dead oocysts". *J.Parasitol.* 87/1/226-229 (2001)
36. González, B.C., Reyes, M.E., Conde, G.C., Calderon, J.E., "Cryptosporidiosis" *Infectología* 5/6/140-145 (1985).
37. Grazyk T.K., Farley C.A., Fayer R., Lewis E.J. and Trout J.M. "Detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cyst in the tissues of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) carrying principal oyster infectious diseases" *J. Parasitol.* 81/5/1039-1042 (1998)
38. Harp A. J. "Oral dosing of neonatal mice with sucrose reduces infection with *Cryptosporidium parvum*" *J. Parasitol.* 85/5/952-955 (1999)
39. Hart, C.A., D. Baxby, and N. Blundell. "Gastroenteritis due to Cryptosporidium a prospective survey in a children's hospital". *J. Infect.* 9/264-270 (1984)
40. Hernández A.L., Mora B. N. And Porras A. "Hallazgo de protozoarios en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) internet
41. Holley, H.P., Dover, C. "Cryptosporidium common cause of parasitic diarrhea in otherwise healthy individuals". *J. Infect. Dis* 153-365-368 (1985)
42. Hunt, D.A., Shannon, R., Palmer, S.R., Jephcott, A.E. "Cryptosporidiosis in an urban community". *Brit. Med.J.* 289/29/814-816 (1984).
43. Janoff, E.N., and Reller, L.B. "Minireview Cryptosporidium species, a Protean Protozoan". *J. Clin. Microbiol.* 5/6/967-975 (1987)
44. Jenkins M. C., Trout J. And Fayer R. "Development and application of an improved semiquantitative technique for detecting low-level *Cryptosporidium parvum* infections in mouse tissue using Polymerase Chain Reaction" *J. Parasitol.* 84/1/182-186 (1998)
45. Jokipii, L., Pohjola, Jokipii Amm. "Cryptosporidium a frequent finding in patients with gastrointestinal symptoms". *Lancet* 2/358-361 (1983).
46. Kim, Ch. W. "Chemotherapeutic effect of arprinocid in experimental Cryptosporidiosis". *J. Parasit.* 73/3/663-666 (1987).
47. Lasser, K.T., Lewin, R.J., Ryninis, F.V. "Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia". *Hum. Pathol.* 10/2/235-240 (1979)
48. Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R. Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G. and Page, F.C. "A newly revised classification of the protozoa". *J. Protozool.* 27/1/37-3-58 (1980).
49. Ma. P. And Soave R. "Threestep stool examination for Cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea". *J. Infect. Dis.* 174/5/824-828 (1983)
50. Mata, L., Bolaños, H., Pizarro, D. Y Vives, M. "Criptosporidiosis en niños de Costa Rica: estudio transversal y longitudinal". *Rev. Biol. Trop.* 32/1/129-135 (1984).
51. Mathan, M.M., S. Venkatesan, R. George, and M. Mathew, "Cryptosporidium and diarrhea in southern Indian children". *Lancet* 11/1172-1175 (1985).

52. Mead J.R. and You X., "Suceptibility difference to *Cryptosporidium parvum* infection in two strains of gamma interferon knockout mice" *J. Parasitol.* 84/5/1045-1048 (1998)
53. Medrano P.Y. y Viera P.I. "Clínico patológico" internet
54. Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C., and Rubin, C.E. "Diarrhea associated wiht a Cryptosporidium in an immunosupressed patient". *Gastroenterology* 70/6/1156-11160 (1976).
55. Moore D., Waters R., Wannemuehler J. And Harp J.A. " Treatment with agmatine inhibits *Cryptosporidium parvum* infection in infant mice" *J. Parasitol.* 87/1/211-213 (2001)
56. Morgan U.M., Xiao L., Hill B.D., O'Donoghue P., Limor J., Lal Alfat. And R.C. and Thompson. "Detection of the *Cryptosporidium parvum* Human Genotype in a Dugong (*Dugong dugon*)" *J.Parasitol.* 86/6/1352-1354 (2000).
57. Moss M.D. and Arrowood M.J. "Quantification of *Cryptosporidium parvum* oocysts in mouse fecal specimens using immunomagnetic particles and two-color flow cytometry" *J.Parasitol.* 87/2/406-412 (2001).
58. Nachakin, I., Jones, A., Hasyun, H. "Routine parasitological examination for Cryptosporidium". *J. Infect. Dis.* 154/2/369-370 (1986)
59. Navin, R.T., and Juranek, D.D., "Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic and parasitologic review". *Rev. Infect.Dis.* 6/313-328 (1984)
60. Ojeda Román, F., Sifuentes, J., y Macías, H.A., "Estudio comparativo de cuadro métodos de diagnóstico de coccidia en heces". I.N.N. Salvador Zuberan. (Comunicacion personal)
61. Osterholm, M.T., "Timing of sympton and oocysts excretions in human *Cryptosporidiosis*". *N. Engl.J. Med.* 317/3/168-169 (1987).
62. Pitlik, S.D., Fainstein, V. Garza, L., Bolivar, R., Rios, D., Hopfer, R.L., Mansell, P.A., "Human *Cryptosporidiosis*; spectrum of dideades. Report of six cases and review of the literature". *Arch. Intern Med.* 148/2269-2275 (1983)
63. Ponce de león, S., Macías, E.A., Cruz, A., Calva, J., Tinoco, J.C., Ruiz, C. Ojeda, F., Bobadilla, M., Rolón, A.L., Villalobos, V., Castillo, A., Ruiz Palacios, G.M."Los primeros cinco años de epidemia de SIDA en México". *Salud Publica.* 30/544-554 (1988)
64. Portnoy, D., Withside, M.E., Buckle, I.E. and Mcleod, D. "Treatment of intestinal cryptosporidiosis with spyramicin". *Ann. Intern. Med.* 1101/202-204 (1984).
65. Rodriguez J.C. y Royo G. "*Cryptosporidium* y criptosporidiosis", Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario de Elche. Universidad Miguel Hernández. Elche (alicante).
66. Tatman, S., J. Paddock, E. Macdonald, D. Whitty, M.. Jong and R.Cooper. "Ocurrence of Cryptosporidium oocyst in fecal samples submitted for routine microbiological examination". *J. Clin. Microbiol.* 22/402-404 (1985).
67. Reese, N.C., Current, W.L., Ernest, J.V. and Bailey, W.S. "Cryptosporidiosis of man and calf; a case report and results of experimental infections in mice and rats". *Amer. J. Trop. Med.* 31/226-229 (1982).
68. Rossanigo, C. E., "Técnicas de diagnóstico de la criptosporidiosis en la diarrea neonatal". *Amer. J. Trop. Med.* 31/226-229 (1986).
69. Rusnak, J., Hadfield, T.L., Rhodes, M.M. and Gaines, J.K. "Detection of Cryptosporidium oocysts in human fecal specimens by an indirect

- immunofluorescent assay with monoclonal antibodies". *J. Clin. Microbiol.* 27/5/1135-1136 (1989).
70. Shanid, N.S., A. Rhaman., B.C. Anderson., L.J. Mata, and A.S. Anyal "Cryptosporidiosis in Bangladesh". *Br. Med. J.* 290/114-115 (1985).
  71. Sloper, K.S., Chronic malabsorption due to cryptosporidiosis in a child with immunoglobulin deficiency". *Gut.* 23/80 (1982)
  72. Soave, R., Armstrong, D., "Cryptosporidiosis and cryptosporidiosis in a child with immunoglobulin deficiency". Review, *Infect. Dis.* 8/1012 (1986)
  73. Soave, R., Armstrong, Danner, R.L. Honing, C.L., Ma. P., Hart, C.C., Nash, T., and Roberts, R.B., "Cryptosporidiosis in homosexual men". *Ann. Intern. Med.* 100/504-511 (1984)
  74. Soave, R., and Johonson W.D. Jr. "Cryptosporidiosis and *Isospora belli* infections". *J. Infect. Dis.* 157/2/225-229 (1988).
  75. Sréter T. Széll and Varga I. "Attempted Chemoprophylaxis of Cryptosporidiosis in chickens, using diclazuril, toltrazuril or garlic Extract. *J. Parasitol.* 85/5/989-991 (1999)
  76. Stehr-Grenn, J.K., McCaig, L., Remsen, R, H.M., Rains, C.S., Fox, M. And Juranek, D.F. "Shedding of oocyst in immuno-competent individuals infected with Cryptosporidium". *Am. J.* 157/2/225-229 (1988)
  77. Sterling, R.S., and Arrowood, M.J. " Detection of Cryptosporidium sp. infection using a direct immunofluorescent assay". *Pediatr. Infect. Dis.* 5/suppl/139-142 (1986)
  78. Treir, J.S., Moxey, P.C., Schimmel, E.M., "Chronic intestinal coccidiosis in men; intestinal morphology and response to treatment". *Gastroenterol.* 66/927 (1974).
  79. Tzipori, S., "Cryptosporidiosis in animals and humans". *Microbiol. Rev.* 47/4/84-96 (1983)
  80. Tzipori, S., Angus, K.W., Campbell, I., and allan, f. "Diarrhea in lambs experimentally infected with Cryptosporidium isolated from calves". *Am. J. Vet. Rest.* 42/1400-1404 (1981)
  81. Tzipori, S. And Campbell, I., and Angus, K.W. "Prevalence of Cryptosporidium antibodies in 10 animal species". *J. Clin. Microbiol.* 14/455-456 (1981).
  82. Tzipori, S., Campbell, I. And Angus, K.W. "The therapeutic effect of 16 antimicrobial agents on Cryptosporidium infection in mice". *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 60/187-190 (1982)
  83. Tzipori, S., McCarthey, E., Lawson, F.H.K., Rowland, A.A., and Campbell, I. "Experimental infection of piglets with Cryptosporidium". *Res. Vet. Sci.* 31/358-368 (1981).
  84. Tzipori, S., Smith, M., Birch, Ch., Barnes, G. And Bioshop, R. "cryptosporidiosis in hospital patients with gastroenteritis" *Am. Trop. Me. Hyg.* 32/5/931-934 (1983)
  85. Ungar, BL., Soave, R., Fayer, R., Nash, T.E., "Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to Cryptosporidium in immunocompetent and immunocompromised patients". *J. Infect. Dis* 153/3/570-577 (1986).
  86. Vazquez, T.O., Velazco, C.O., Alvarez, CH.R., "Criptosporidiosis, ¿Un problema frecuente en SIDA?. *Infectologia.* 8/5/245-250 (1988).
  87. Vetterling, J.M., Jervis, H.R., Merrill, T.G., Sprinz, H., "Cryptosporidium sp. from the guine pig *cavis porcellus* with an imediation of genus". *J. Protozool.* 18/243-247 (1971).

88. Waters W.R., Wannemuehler J.M., Sacco R.E., Palmer M.V. Haynes J.S., Pesch B.A. and Harp J.A. "Cryptosporidium parvum-induced inflammatory bowel disease of TCR- $\beta$ - x TCR- $\delta$ -deficient mice". *J. Parasitol.* 85/6/1100-1105 (1999).
89. Waters R.W., Palmer V.M., Wannemuehler, Sacco E.R. and James A. Harp. "B cells are required for the induction of intestinal inflammatory lesion in TCR $\alpha$ -deficient mice persistently infected with *Cryptosporidium parvum*". *J. Parasitol.* 86/5/1073-1077 (2000).
90. Weitz, J.C., Tassara, R., Muñoz, P., Mercado, R., Atias, A., "Cryptosporidiosis del aparato respiratorio". *Rev. Med. Chile.* 114/7/691-692 (1988).
91. Wolfson, J.S., Richtor, J.M., Weber, D.J., McCarthey, D.M. and Hopkins, C.C. "Cryptosporidiosis in immunocompetent patients" *N. Engl. J. Med.* 312/1278-1282 (1985)
92. Yang S. Benson K.S., Du C. and Healey. "Infection of immunosuppressed C57BL/6N adult mice with a single oocyst of *Cryptosporidium parvum*". *J. Parasitol.* 86/4/884-887 (2000)