

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Luis Antonio Becerril Sánchez

Presenta la tesis que para ser **Biólogo:**

Frecuencia de *Cryptosporidium* en pacientes
ambulatorios con el síndrome de inmunodeficiencia
adquirida (SIDA) de diagnóstico reciente.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice	1
1.Introducción	2
1.1. Taxonomía	2
1.2. Historia	3
1.3. Morfología	4
1.4. Ciclo de vida	5
1.5. Mecanismo de infección.	8
1.6. Manifestaciones clínicas.	8
1.7. Prevalencia.	9
1.8. Diagnóstico.	11
1.9. Tratamiento.	12
1.10. Prevención.	14
2. Justificación.	14
3. Objetivos.	15
4. Hipótesis.	15
5. Clasificación de la investigación.	15
6. Material y Métodos.	15
6.1. Población objetivo	15
6.2. Tamaño de la muestra	16
6.3. Criterios de inclusión.	16
6.4. Criterios de exclusión.	16
6.5. Criterios de eliminación.	16
6.6. Ubicación del estudio.	16
6.7. Procedimiento.	16
6.7.1. Obtención del material biológico.	16
6.7.2. Tinción Zielh-Neelsen.	17
6.7.3. Coproparasitoscópicos (Faust).	17
7. Resultados.	18
8. Discusión.	32
9. Conclusiones.	36
10. Referencias.	37

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. TAXONOMÍA.

Reino: Protista

Subreino: Protozoo

Phylum: Apicomplexa

Clase: Coccidia

Subclase: Coccidiasina

Orden: Eucoccidiarida

Suborden: Eimeriorina

Familia: Cryptosporidiidae

Genero: Cryptosporidium

Los seres vivos se dividen en 5 reinos: Mónica, Protista, Plantae, Fungi y Animalia. Los Protistas incluyen a los protozoarios que son un grupo heterogéneo de organismos unicelulares, eucariontes, con más de 65,000 especies; de éstos, la mitad son fósiles. Se reconocen 7 phyla en el subreino, uno de estos es el Phylum Apicomplexa, se define por la presencia de un complejo apical (visible al microscopio electrónico) que consiste de un anillo(s) polar(es), roptrías, micronemas, gránulos densos, conoide, microtúbulos subpeliculares y microporos generalmente presentes en algún estadio; cilios ausentes; sexualidad por singamia y todas las especies son parásitas. Los microorganismos de la Clase Coccidia, presentan gamontes maduros, típicamente intracelulares, sin mucron o epimerito; generalmente sin sicigia y si ésta presente involucra marcadamente a los gametos anisogámicos. El ciclo de vida es por merogonia, gametogonia y esporogonia. La mayoría de las especies son parásitos de vertebrados. El Orden Eucoccidiarida reconoce la presencia de merogonia; en vertebrados é invertebrados y el suborden Eimeriorina que identifica al microgamonte y el macrogameto con un desarrollo independiente; sin sicigia; el microgamonte ordinariamente produce gran cantidad de microgametos; cigoto inmóvil; esporozoitos típicamente encerrados en el esporoquiste dentro del ooquiste; monoxenos o heteroxenos. (Levine et al., 1980; Cavalier-Smith., 1998)

1.2. HISTORIA.

A principios del siglo veinte (1907), Ernest Edward Tizzer, observó al microscopio por primera vez a un microorganismo que obtuvo de las glándulas intestinales de rata de laboratorio, inicialmente no lo reconoció como patógeno; posteriormente, lo encontró con mayor frecuencia y en 1910 propuso el género *Cryptosporidium*. En 1912 le asignó la especie, *C. parvum* y en 1955 se le reconoció como patógeno causante de diarrea en pavos. La cryptosporidiosis en humanos se reportó en 1976 (seis décadas después de su hallazgo) (Marshall et al., 1997; Learmonth et al., 2004; Navarro-Martinez et al., 2003; Carey et al., 2004). En pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se reconoció como patógeno emergente causante de diarrea. Sin embargo, fue hasta 1987 que se reconoció como agente causal de cuadros diarreicos en individuos inmunocompetentes. Actualmente, a *Cryptosporidium* se le considera un agente patógeno, que produce síntomas gastrointestinales a un gran número de vertebrados, aproximadamente a 152 especies de mamíferos (Learmonth et al., 2004; Navarro-Martinez et al., 2003; Carey et al., 2004). En pacientes inmunocompetentes las especies que se reportan con mayor frecuencia son: *C. hominis* y *C. parvum* (genotipo bovino) (Learmonth et al., 2004; Carey et al., 2004). Sin embargo, otras especies también se encuentran en pacientes inmunocompetentes o inmunocomprometidos: *C. andersoni*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. felis*, *C. canis*, *C. parvum* (genotipo en ciervo), *C. parvum* (genotipo en cerdo) (Leoni et al., 2003; Pedraza-Díaz et al., 2000; Xiao et al., 2001; Ong et al., 2002) y dos nuevas especies relacionadas con *C. canis*, que aun no se han caracterizado genéticamente, pero, se encontraron en niños inmunocompetentes de Nueva Zelanda. (Learmonth et al., 2004)

1.3. MORFOLOGÍA.

Actualmente, se conoce la morfometría de los ooquistes de 11 especies de *Cryptosporidium* (Fall et al., 2003). *C. canis* presenta características morfológicas muy semejantes a *C. parvum* (Tabla 1), La diferenciación con otras especies del género, solo se logró por medio de análisis filogenético de la secuencia del gen 18s rRNA y por polimorfismos del gen HSP70 (Carey et al., 2004). Mediante microscopía electrónica se han reconocido los diferentes estadios de *Cryptosporidium* basados en el modelo de *C. parvum* y *C. muris*. El **esporozoito** mide aproximadamente 4.9 x 1.2 µm, es alargado, con la parte anterior en punta y la posterior redondeada, posee el complejo apical, un núcleo ubicado en la región posterior. El **trofozoito** mide 2.0 x 2.5 µm de diámetro, es redondo u ovalado y se caracteriza por un núcleo largo (1.0 x 1.3 µm aprox.), con nucleolos de gran tamaño y ausencia de complejo apical. A partir de la replicación que se lleva a cabo en el núcleo del trofozoito, se genera una estructura multinucleada conocida como **meronte**, con un diámetro aproximado de 4 x 5 µm, se conocen dos morfotipos diferentes: el **meronte I** caracterizado por producir de 6 a 8 merozoitos y el **meronte II** produce 4 merozoitos. Los **merozoitos de tipo I y II** son morfológicamente idénticos, tienen forma alargada y un tamaño aproximado de 5 x 1 µm., con el extremo anterior redondeado y el posterior ligeramente en punta, contienen una sola vesícula nuclear, retículo endoplásmico, poseen en su complejo apical conoides, micronemas y roptrías y una gran variedad de gránulos no identificados. El **microgamonte**, es un estadio de vida corta, por lo que es difícil de encontrar, su diámetro de 4 a 5 µm, contiene estructuras altamente condensadas en el núcleo, con ribosomas, retículo endoplásmico y vacuolas. En el núcleo del microgamonte se desarrollan los **microgametos** que miden 0.95 x 4 µm, con un contorno en forma de cuña, polo apical hinchado cubierto por una doble capa de membrana, un núcleo filamentosamente compacto y alargado en el cuerpo del gameto, con una mitocondria adyacente al núcleo. Los **macrogamontes** son generalmente esféricos y en formas juveniles son indistinguibles del trofozoito, en su madurez se identifica un núcleo alargado, retículo endoplásmico, con un tamaño aproximado de 3.2 x 5.0 µm, caracterizados por su gran variedad de gránulos y polisacáridos (Fayer & Ungar., 1986; Marshall et al., 1997).

Tabla 1. Especies de *Cryptosporidium*

Especies	Hospedero	Tamaño de los ooquistes μM	Localización de la infección
<i>C. andersoni</i>	Borregos	6.6-8.1 X 5.0-6.5	Abomaso
<i>C. baileyi</i>	Aves	6.0-7.5 X 4.8-5.7	Bolsa de Fabricius, cloaca
<i>C. felis</i>	Gatos	3.2-5.1 X 3.04-4.0	Intestino delgado
<i>C. hominis</i>	Humanos	4.4-5.4 X 4.4-5.9	Intestino delgado
<i>C. meleagridis</i>	Aves	4.5-6.9 X 4.2-5.3	Intestino delgado
<i>C. muris</i>	Ratas	6.5-8.7 X 4.6-6.3	Estómago
<i>C. nasorum</i>	Peces	3.5-4.7 X 4.2-5.0	Estómago, intestino
<i>C. parvum</i>	152 especies de mamíferos	4.5-5.4 X 4.2-5.2	Intestino delgado
<i>C. saurophilum</i>	Lagartos	4.4-5.6 X 4.2-5.2	Estómago, Intestino
<i>C. serpentis</i>	Diversas especies de reptiles	5.6-6.6 X 4.8-5.6	Estómago
<i>C. wrairi</i>	Puerco de guinea	4.8-5.6 X 4.0-5.0	Intestino delgado
<i>C. canis</i>	Perros	No hay datos	Intestino delgado

1.4. CICLO DE VIDA.

El ciclo de vida de *Cryptosporidium* es monoxénico y se explica a partir del modelo de *C. parvum* y *C. canis*. Consiste en diferentes estadios e incluye fase sexual y asexual (Fig. 1). El tiempo de generación es de 12 y 14 horas. Después de la ingestión de los ooquistes esporulados, éstos entran en un proceso de desenquistamiento, favorecido por el pH del estómago, temperatura corporal y probablemente la acción de enzimas pancreáticas y sales biliares que degradan la pared quística. El desenquistamiento se completa en el intestino delgado del huésped. De los ooquistes se liberan ocho esporozoitos, éstos se adhieren y penetran a los enterocitos; posteriormente, se transforman en trofozoítos y se ubican por debajo de la membrana de las células intestinales formando una unión electrodensa entre la célula del hospedero y el citoplasma del trofozoíto, en éste se observan cuatro membranas distintas. Se sugiere que tres de estas membranas son originadas por el hospedero aislando al parásito del citoplasma (parásito intracelular extracitoplasmático) y por último la membrana de la vacuola parasitófora, que protegerá al trofozoíto de la respuesta inmune del hospedero y del ambiente extracelular, lo cual permite al parásito desarrollarse. Así mismo, el trofozoíto forma en su interior ocho núcleos y se transforma en esquizonte de primera generación (meronte I). Dentro del esquizonte se forman ocho merozoítos (tipo I), que

al liberarse infectan a otras células epiteliales y se transforman en esquizontes de segunda generación, en éstos se forman cuatro merozoítos (tipo II). Cuando el enterocito se rompe libera a los merozoítos y éstos tienen dos posibilidades: a) infectan a otros enterocitos y continúan el ciclo asexual, y b) se transforman en microgametocito y macrogametocito. El microgametocito genera microgametos, el macrogametocito se transforma en el macrogameto, el cual es fecundado por los microgametos, se forman los ooquistes y salen con las heces.

Se pueden formar dos tipos de ooquistes (de pared delgada y pared gruesa), los de pared delgada permanecen en el hospedero, esporulan y causan la autoinfección interna. Aproximadamente el 20% de los cigotos dan lugar a los ooquistes de pared delgada, mientras que los de pared gruesa son eliminados en las heces y tienen la capacidad de transmitir la infección de un hospedero a otro.

Se creó que el ciclo autoinfectivo interno y el asexual es el responsable de los cuadros diarreicos prolongados, persistentes é invasivos, padecidos principalmente por personas inmunocomprometidas (Marshall et al., 1997 ; Carey et al., 2004 ; Leoni et al ., 2003).

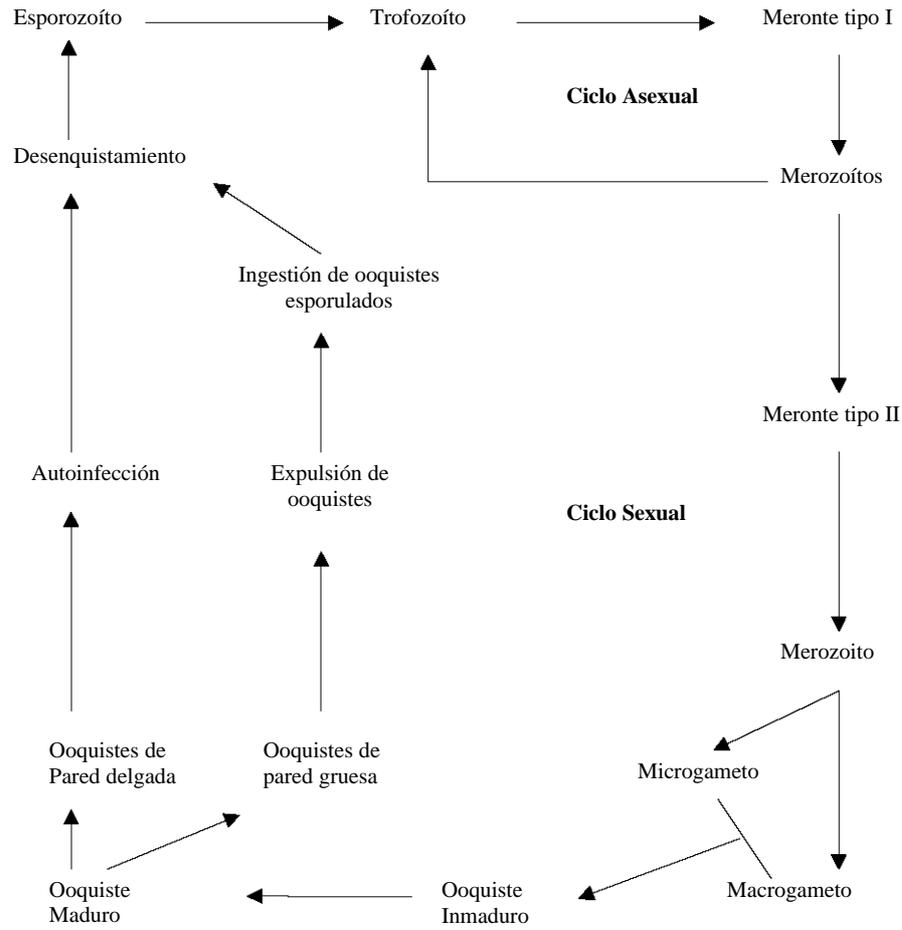


Figura 1. Esquema del ciclo de vida de *Cryptosporidium* basado en *C. parvum* y *C. hominis*.

1.5. MECANISMO DE INFECCIÓN.

La cryptosporidiosis se adquiere por fecalismo, la fase infectante es el ooquiste esporulado y la vía principal es la hídrica, otros mecanismos son: alimentos contaminados con materia fecal, contacto directo de persona-persona, transmisores mecánicos o por zoonosis. (Fayer & Ungar., 1986; Calvo et al., 1995; Marshall et al., 1997; Leoni et al., 2003) El rápido ciclo de vida del protozoario (cada generación de parásitos puede desarrollarse y madurar entre 12 y 14 horas) y el ciclo autoinfectivo interno contribuyen a que con un bajo número de ooquistes se manifieste la enfermedad. Durante la adhesión y establecimiento del esporozoíto dentro del enterocito desarrolla un mecanismo de alimentación que separa directamente al parásito del citoplasma celular del hospedero, a través de un conducto que se encarga de recolectar elementos energéticos y nutricionales que éste necesite (Marshall et al., 1997; Carey et al., 2004). En la etapa invasiva, el parásito pone a funcionar organelos de secreción del complejo apical (roptíras, micronemas y gránulos densos) liberando proteínas que facilitan la adhesión e invasión hacia las células del hospedero. (Petersen et al., 1992; Enriquez & Riggs., 1998; Langer & Riggs., 1999; Kappe et al., 1999; Sagodira et al., 1999; Nesterenko et al., 1999; Cevallos et al., 2000).

1.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

La infección más severa, persistente, invasiva y hasta mortal es en pacientes inmunocomprometidos por enfermedades de base, tales como; síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), hipogammaglobulinemia congénita, inmunodeficiencia combinada severa, en personas que reciben terapia citotóxica, quimioterapia, y tratamientos con fármacos inmunosupresores. El periodo de incubación es de 5 a 28 días aproximadamente, las manifestaciones clínicas más frecuentes son: diarrea acuosa, con moco, sin sangre, dolor abdominal, náuseas, vómito, pérdida de peso, anorexia, fatiga, flatulencia, y fiebre. La duración y severidad de los síntomas clínicos depende de la respuesta inmune del hospedero (Tabla 2) (Fayer & Ungar., 1986; Calvo et al., 1995; Marshall et al., 1997; Hunter & Nichols., 2002; Leoni et al., 2003; Carey et al., 2004).

Tabla 2. Manifestaciones clínicas de pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes con cryptosporidiosis.

Características	inmunocomprometidos	inmunocompetentes
Población susceptible	Personas de cualquier edad , especialmente con SIDA	Personas de cualquier edad
Sitio de infección	Intestinal y/o extraintestinal	Generalmente intestinal
Presentación entérica	Asintomático, pasajero, crónico ó fulminante	Asintomático, aguda y/o persistente
Síntomas comunes	Diarrea, fiebre, dolor abdominal, baja de peso, vómito	Diarrea, fiebre, dolor abdominal, baja de peso, vómito, náuseas
Duración clínica	A partir de 2 días hasta de por vida	Alrededor de 2 semanas
Severidad acorde al conteo de CD4 ⁺	Moderada Crónica y/o extraintestinal Fulminante	Datos no conocidos
Tipo de manifestaciones	Pasajera y/o asintomática (5- 184 semanas) Crónica (3- 127 semanas) Fulminante (2- 28 semanas y la muerte)	Alta mortalidad en niños y adolescentes en países subdesarrollados

1.7. PREVALENCIA.

En todo el mundo, desde el inicio de la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se han documentado las infecciones por microorganismos oportunistas en pacientes con dicha enfermedad (Marshall et al., 1997). Sin embargo, en México los reportes de cryptosporidiosis en la literatura médica son escasos (Del Campo-Rodríguez & Sifuentes-Osornio., 2004).

La frecuencia de cryptosporidiosis con cuadro diarreico en pacientes con VIH alrededor del mundo es muy variada, desde un 0 hasta el 100%, con una media de 32% (Lopez-Velez et al., 1995; Arikian et al., 1999; Escobedo & Núñez., 1999; Hunter & Nichols., 2002). Esta gran variabilidad, se puede explicar por las diferencias en el diseño de los

estudios, localización geográfica, grupo poblacional, sensibilidad de los métodos de laboratorio, grado de la enfermedad, factores ambientales y socioculturales, así como las pobres condiciones sanitarias en los países en vías de desarrollo. Además algunos médicos no están familiarizados con la infección y muchas personas cuando presentan cuadros diarreicos no buscan atención médica. (Marshall et al., 1997; Hunter & Nichols ., 2002; Del Campo-Rodriguez & Sifuentes-Osornio., 2004).

En América del Norte, los reportes oscilan entre el 3.6 al 19.5%; aunque, en Oklahoma, USA se encontró una seroprevalencia del 31% en 803 pacientes pediátricos con VIH (Zu et al., 1994).

En Europa, la parasitosis afecta alrededor del 6.6% de pacientes con VIH, en contraste con África (Zambia y Mali) que se ha identificado hasta en un 60% (Pedersen et al., 1996). Así mismo en tres localidades de la provincia de Anhui, China, en donde se analizaron 610 niños, la frecuencia de cryptosporidiosis fue del 42.3%, 51.7 % y 57.5% respectivamente (Kuhls et al., 1994).

En Latinoamérica, en Brasil la frecuencia oscila entre el 10.4% - 70% (Kuhls et al., 1994), En Venezuela, fluctúa desde el 12.1 hasta un 41.3%. En Chile, un estudio a nivel nacional arrojó un 8.7% en individuos sanos y 15.4% en personas con VIH y en las islas del Caribe se ha reportado desde el 37 hasta el 50% (Mercado & Garcia., 1995).

Por otra parte, en un estudio nosocomial realizado en Perú, por Sarabia y col en 1990, se ilustra la peligrosidad de la enfermedad, ya que la frecuencia fue superior al 10% y dos de cada tres niños infectados fallecieron (Marshall et al., 1997).

En México la parasitosis en individuos con SIDA se ha estimado desde 9.09% hasta 35.7%. Vázquez y col en 1988, reportaron a *Cryptosporidium* spp. en un 9.09%; en el mismo año Ponce de León et al y Garcia et al lo encontraron en un 25 y 6.3% respectivamente (Vázquez et al., 1988; Romo et al., 2002; Del Campo-Rodriguez & Sifuentes-Osornio., 2004). En 1990 la incidencia fue de 9 y 9.8% (Mohar et al., 1992; Del Río et al., 1996).

Romo y col (2002) encontraron un 35.7% en 164 pacientes. Del Campo et al (2004) en un estudio longitudinal, en donde se evaluó el papel de las infecciones oportunistas en México, la cryptosporidiosis tuvo una frecuencia promedio del 12%, se le ubicó en tercer lugar a nivel nacional como una infección oportunista común en pacientes con VIH.

Por otro lado, en Europa y Norte América, la frecuencia de *Cryptosporidium* en pacientes inmunocompetentes, fluctúa entre el 1 y 3%. En Asia se le encuentra en un 5% y en África, hasta el 10% (Marshall et al., 1997).

1.8. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico etiológico se establece con la detección de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp en la materia fecal. La técnica que se utiliza con mayor frecuencia es la tinción de Ziehl-Neelsen, con ésta, los ooquistes se tiñen de color rojo intenso con un fondo azul. Otros métodos de tinción son: Kinyoun modificado, tricrómica, PAS modificado, safranina, Ziehl-Neelsen modificado, Giemsa y auramina-rodamina.(Vázquez et al., 1988; Tay & Sánchez 2002; Hunter & Nichols 2002; Carey et al., 2004). Por otro lado, se utilizan los estudios inmunológicos para la detección de la cryptosporidiosis: ensayos de hemaglutinación, ELISA e inmunofluorescencia indirecta. La necesidad de tener técnicas diagnósticas rápidas y de alta sensibilidad, ha hecho que se comercialice un gran número de anticuerpos monoclonales, usados en diversas técnicas inmunológicas (Marshall et al., 1997; Carey et al., 2004). Sin embargo, las técnicas inmunológicas tienen como limitante que pueden cruzar con otros microorganismos y dar falsos positivos (McLauchlin et al., 1999; Carey et al., 2004). Otros métodos son: sondeo duodenal, biopsia, microscopía electrónica de transmisión y la inoculación en animales de laboratorio. (Vázquez et al., 1988; Tay & Sánchez ., 2002).

La amplificación de segmentos del ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP's), polimorfismos amplificados al azar (RAPD), hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y la secuenciación, se utilizan para diagnóstico de epidemiología molecular para la determinación de las diferentes especies del género (Laxer et al., 1992; Ortega et al., 1991).

1.9. TRATAMIENTO.

No hay terapia farmacológica específica en contra de la cryptosporidiosis (Marshall et al., 1997; Carey et al., 2004). En individuos inmunocompetentes se aplica la terapia de soporte, que consiste en la rehidratación por vía oral o intravenosa, dieta específica, esperando que el sistema inmunológico del paciente elimine al parásito. Es decisión del médico la administración de algún antiparasitario (Marshall et al., 1997; Leoni et al., 2003; Carey et al., 2004).

En pacientes inmunocomprometidos (VIH) es muy importante la terapia de alta actividad retroviral (HAART), porque reduce la carga viral en el individuo y por consecuencia aumenta el conteo leucocitario de CD4⁺, que lo protegerá de los parásitos oportunistas. Cabe señalar que esta terapia no es fácilmente costeable por individuos de países subdesarrollados (Le Moing et al., 1998). Para el tratamiento de la cryptosporidiosis se utiliza la espiromicina, 500 mg cada 8 o cada 12 horas, durante 4 a 8 semanas (Hoepelman., 1996). Current y col, en 54 pacientes con SIDA y cryptosporidiosis, no encontraron buena eficacia (Current & Garcia., 1991). La nitazoxanida es un nitroiazol de amplio espectro, el cual se piensa que interfiere con la piruvato-ferrodoxina mediada por la oxidoreductasa, que favorece la transferencia de electrones (reacción esencial para el metabolismo energético anaeróbico del parásito), es el único fármaco aprobado por la US Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la cryptosporidiosis y giardiosis en niños (Pilles & Hoffman., 2002). La eficacia de este fármaco en 66 pacientes con SIDA y cryptosporidiosis, con una dosis de 500 y 1000mg fue del 63% y 67% respectivamente (Rossignol et al., 1998).

En cerdos recién nacidos, la eficacia de la paramomicina y la nitazoxanida (250-125 mg/kg al día, (no se especifica la duración del tratamiento) fue del 25 y 50% respectivamente (Theodos et al., 1998).

En un estudio *in vitro* (cultivo celular) se midió la eficacia de la nitazoxanida (40 mg/ml) y paramomicina (2000 mg/ml), durante un mes; el crecimiento del parásito se redujo en un 93% y un 80% respectivamente. En contraste, los resultados en el modelo *in vivo* (ratones) son menos alentadores; la paramomicina (2500 mg/kg/40 días) y nitazoxanida (40mg/kg/40días), sólo redujeron la expulsión de ooquistes en un 18% y un 20% respectivamente (Carey et al., 2004).

Otra alternativa para el tratamiento de los pacientes con SIDA y cryptosporidiosis es la inmunoterapia, tal es el caso de la administración vía oral de calostro bovino hiperinmune (HBC) que presenta una efectividad aproximada al 50%, sin embargo se encuentra limitada, por la diversidad de antígenos de las diferentes especies de *Cryptosporidium*, ya que se necesita purificar y procesar un gran número de ooquistes para inmunizar vacas y posteriormente sustraer el HBC, de modo que contenga el mayor número posible de anticuerpos (Carey et al., 2004).

También se utilizan los anticuerpos monoclonales y policlonales para el tratamiento de esta parasitosis, Rigs et al., en el 2002, evaluaron la eficacia de tres anticuerpos monoclonales (mAb, 3E2, CSL) específicos del complejo apical y antígenos de superficie tanto de esporozoitos como de merozoítos, inoculando a ratones de cinco semanas de nacidos con 10^7 ooquistes y por último aplicaron los anticuerpos a cada animal, de manera que pudieron reducir en promedio un 39% y 46% la infección intestinal y biliar respectivamente. El efecto *in vitro* de 3E2 neutralizó el crecimiento de los esporozoitos, sin embargo el efecto *in vivo* (ratones neonatales) de la combinación de 3E2+3H2+1E10 y 3E2+3H2 redujo la infección en un 56% (Schaefer et al., 2000).

Se tienen reportes del posible uso de lectinas extraídas de plantas (mediadores en la interacción célula-célula). Keusch y col., (1995) identificaron a una lectina específica de esporozoitos como un factor de adherencia en la superficie de las células intestinales. Diversas investigaciones señalan que galactosil-N-acetilgalactosamina (Gal/Gal/NAc) reduce en un 70% el establecimiento de los esporozoitos en células intestinales, Chen y LaRusso (2000) concluyeron que epítopes de Gal/Gal/NAc de glucoproteínas en el complejo apical al ser expuestas con lectinas de superficie, se redujo en un 80% la adhesión y establecimiento de *C. parvum* en el tracto intestinal y epitelio biliar. Tales resultados sugieren que algunas glicoproteínas pueden ser utilizadas en la inmunoterapia en pacientes con cryptosporidiosis.

Alternativamente se utilizan agentes bioterapéuticos como son los *Lactobacillus reuteri* y *L. acidophilus* que ayudan a recuperar el balance microbiano intestinal y evitan la colonización de los parásitos (Alak et al., 1999; Carey et al., 2004)

1.10. PREVENCIÓN.

Debido a que la cryptosporidiosis se adquiere principalmente por fecalismo (consumo de materia fecal con ooquistes esporulados), las medidas de control deben enfocarse a fomentar los hábitos personales de higiene, lavarse las manos antes de ingerir cualquier alimento, después de defecar, hervir el agua para el consumo humano, lavar y/o desinfectar frutas y verduras. Los gobiernos locales ó federales deben proveer de medidas sanitarias a toda la población: agua potable, sistema de drenaje y evitar el uso de las aguas residuales en el riego de hortalizas. También en hospitales, guarderías y laboratorios se debe tener un buen manejo de los desechos biológico-infecciosos y según sea el caso aislar a los individuos infectados y así disminuir el riesgo de contagio (Marshall et al., 1997; Carey et al., 2004).

3. OBJETIVOS.

- Determinar la frecuencia de *Cryptosporidium* spp en pacientes con SIDA de diagnóstico reciente, mediante la tinción de Zielh-Neelsen modificada.
- Conocer la frecuencia de otros parásitos intestinales emergentes y reemergentes.

4. HIPÓTESIS.

Si la cryptosporidiosis es considerada una infección oportunista, entonces se encontrará en altos índices de prevalencia en pacientes con SIDA.

5. CLASIFICACION DE LA INVESTIGACIÓN.

Observacional, Prospectiva, Transversal, Descriptiva.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1. POBLACIÓN OBJETIVO.

Pacientes ambulatorios de reciente diagnóstico con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) de cualquier edad y de ambos sexos, que acudieron al servicio de Infectología del Hospital General, Ciudad de México.

6.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Se analizaron muestras de materia fecal de 104 pacientes recientemente diagnosticados con SIDA.

6.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyeron muestras de materia fecal de pacientes ambulatorios de ambos sexos y de cualquier edad recientemente diagnosticados con SIDA.

6.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes que en los días previos al estudio, fueron sometidos a tratamiento con antiparasitarios, retrovirales e inmunitario, aquellos que no autorizaron su participación en la investigación.

6.5. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Todas aquellas muestras que no fueron fijadas con formol al 10% ó la cantidad de heces en la muestra no fue suficiente para el buen desempeño de la metodología.

6.6. UBICACIÓN DEL ESTUDIO

Este trabajo se realizó en Laboratorio de Parasitología Experimental, del Instituto Nacional de Pediatría en colaboración con el Servicio de Infectología de la Consulta Externa del Hospital General Ciudad de México, de enero del 2004 a junio del 2005.

6.7. PROCEDIMIENTO.

6.7.1. Obtención del material biológico:

De cada paciente se obtuvo de una hasta dos muestras de materia fecal, se fijaron con formol al 10% y se mantuvieron en refrigeración a 4°C; posteriormente, se realizó la tinción de Ziehl-Neelsen y los coproparasitoscópicos (CPS) de concentración flotación (Faust).

6.7.2. Tinción de Ziehl-Neelsen:

Cada muestra de materia fecal se procesó por duplicado. Se realizó un frotis en un portaobjetos (capa muy delgada), se fijó con metanol absoluto (Fisher scientific) y se dejó secar a temperatura ambiente durante 20 minutos aproximadamente. Se colocó papel filtro sobre el frotis, se aplicó el colorante carbol-fucsina (Sigma-Aldrich) hasta cubrir el frotis sin excederse y se dejó reposar 20 minutos, durante este tiempo con la ayuda de un mechero se calentó el portaobjetos hasta la emisión de vapores (evitando que la muestra entrara en ebullición) y se agregó colorante para evitar que la muestra se seque. Posteriormente, cada laminilla se lavó con alcohol-ácido al 2% (98% de alcohol etílico y 2% de ácido clorhídrico) hasta eliminar el exceso de colorante, inmediatamente después se colocaron en el chorro de agua corriente, sin dejar secar la laminilla. A cada laminilla se le adicionó azul de metileno cubriendo en su totalidad el frotis (colorante de contraste), se dejó reposar durante un minuto, se enjuagó al chorro de agua corriente y se dejó secar a temperatura ambiente (hasta secarse por completo). Las laminillas se revisaron en un microscopio Karl Zeiss, con el objetivo 100X. Los oquistes se tiñeron de color rojo rubí intenso con un fondo contrastado en azul. (Mercado & García., 1995; Vázquez et al., 1988; Tay & Sánchez., 2002; Carey et al., 2004).

6.7.3. Coproparasitoscópicos:

Para el diagnóstico de otros parásitos intestinales se realizó el examen de concentración flotación (Faust). Se preparó una suspensión homogénea con 1 a 2 g de materia fecal y 10 ml de agua destilada, se filtró y recolectó en un tubo. Se centrifugó a 1000 rpm/1 minuto, el sobrenadante se decantó y el precipitado se lavó de 2 a 3 veces, repitiendo el mismo procedimiento. Finalmente, se le agregó el sulfato de Zinc (densidad 1.180 a), se centrifugó a 1000 rpm/1 minuto y con un asa bacteriológica se obtuvo una muestra

de la película superficial que se encontró en el menisco, misma que se colocó en un portaobjetos, se le agregó una gota de yodo lugol (Analytyka), se le colocó un cubreobjetos y se observó en un microscopio Karl Zeiss, con los objetivos de 10X, 16X y 40X (Mercado & García., 1995; Vázquez et al., 1988; Tay & Sánchez., 2002)

El diagnóstico de cada laminilla y su duplicado se realizó a partir de la observación en la totalidad de los campos al microscopio (entre 80 y 100 aproximadamente), con la corroboración unánime de tres observadores.

7. RESULTADOS.

El número total de pacientes muestreados fue de 104, en la mayoría de éstos, solo se obtuvo una muestra (102) y solamente en dos pacientes se obtuvieron dos muestras. En la Tabla 3 se muestra el género, la edad, el lugar de residencia y los parásitos encontrados con las dos técnicas. Los pacientes provenían de 14 Estados de la República Mexicana, las edades presentan un rango entre 16 y 64 años, con una media de 29.5 y una moda de 36.

Tabla 3. Datos generales de los pacientes y diagnóstico.

N	Edad	Genero	Procedencia	Tinción Ziehl-Neelsen	Faust
1*	27	M	Edo. Méx	Microsporidios <i>spp</i>	Negativo
2	23	M	D.F	Microsporidios <i>spp</i>	Negativo
3	64	M	Veracruz	Microsporidios <i>spp</i>	<i>B. hominis</i>
4	36	M	D.F	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
5	30	M	Veracruz	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
6	19	M	Edo. Méx	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
7	31	M	Oaxaca	Negativo	<i>E. nana</i>
8	37	F	Edo. Méx	Microsporidios <i>spp</i>	Negativo
				<i>Cryptosporidium spp</i>	
9	49	M	Guerrero	<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>E. nana</i>
10	45	M	D.F	Negativo	Negativo
11	22	M	Puebla	<i>C. cayetanensis</i>	Negativo
12*	49	M	Edo. Méx	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
				Microsporidios <i>spp</i>	
13	42	M	Tlaxcala	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
14	36	M	Hidalgo	<i>C. cayetanensis</i>	Negativo
15	60	M	Edo. Méx	Microsporidios <i>spp</i>	<i>B. hominis</i>
16	46	M	Oaxaca	Microsporidios <i>spp</i>	Negativo
17	19	M	Edo. Méx	Microsporidios <i>spp</i>	<i>B. hominis</i>
18	18	M	Edo. Méx	Microsporidios <i>spp</i>	<i>B. hominis</i>
19	49	M	Edo. Méx	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
20	36	F	D.F	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
21	23	M	Hidalgo	<i>C. cayetanensis</i>	Negativo

				<i>Cryptosporidium spp</i>	
				Microsporidios spp	
22	32	M	Edo. Méx	Microsporidios spp	Negativo
23	31	M	Edo. Méx	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
24	29	M	D.F	Negativo	Negativo
25	45	M	D.F	Negativo	Negativo
26	26	M	D.F	Negativo	Negativo
27	47	M	Oaxaca	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
28	16	F	Edo. Méx	Microsporidios spp	Negativo
29	36	M	D.F	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
30	18	F	Puebla	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
31	27	M	D.F	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
				Microsporidios spp	
32	28	M	D.F	Negativo	Negativo
33	39	M	Puebla	<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>S. stercoralis</i> <i>E. nana</i> <i>B. hominis</i>
34	46	M	Veracruz	<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>E. nana</i> <i>B. hominis</i>
35	33	M	Veracruz	<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>S. stercoralis</i> <i>E. coli</i>
36	50	F	Hidalgo	<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>B. hominis</i>
37	50	F	D.F	Negativo	<i>E. histolytica / dispar</i>
38	26	F	Oaxaca	<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>E. nana</i>
39	21	M	D.F	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
40	29	M	D.F	<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>B. hominis</i>
41	31	M	D.F	Negativo	Negativo
42	23	M	Edo. Méx	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
43	21	M	D.F	<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>B. hominis</i>
44	20	M	D.F	<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>G. intestinalis</i> <i>B. hominis</i>
45	27	M	Querétaro	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
46	26	M	Hidalgo	Negativo	<i>B. hominis</i> <i>E. nana</i>
47	21	M	Tlaxcala	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
48	21	M	B.C	Microsporidios spp	Negativo
49	18	M	D.F	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
50	28	M	D.F	Negativo	<i>B. hominis</i>
51	29	M	Guerrero	Negativo	<i>B. hominis</i>
52	21	F	D.F	Negativo	Negativo
53	36	F	Edo. Méx	Microsporidios spp	Negativo
54	20	M	Michoacán	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
55	26	M	Puebla	Microsporidios spp	Negativo
56	32	M	D.F	Negativo	Negativo
57	23	M	D.F	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
58	24	M	Oaxaca	<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>B. hominis</i>
				Microsporidios spp	
59	30	M	Michoacán	Microsporidios spp	<i>B. hominis</i>
60	27	M	D.F	<i>Cryptosporidium spp</i>	<i>B. hominis</i>
61	28	M	Edo. Méx	Microsporidios spp	<i>B. hominis</i>

62	24	M	Jalisco	Microsporidios spp	Negativo
63	35	M	D.F	<i>Cryptosporidium</i> spp <i>C. cayetanensis</i>	Negativo
64	29	M	Edo. Méx	<i>C. cayetanensis</i>	<i>G. intestinalis</i>
65	25	M	Edo. Méx	<i>Cryptosporidium</i> spp <i>C. cayetanensis</i>	Negativo
66	22	M	Guanajuato	<i>Cryptosporidium</i> spp	Negativo
67	32	M	Edo. Méx	<i>Cryptosporidium</i> spp <i>C. cayetanensis</i>	Negativo
68	32	M	D.F	<i>C. cayetanensis</i> Microsporidios spp <i>Cryptosporidium</i> spp	Negativo
69	27	M	Oaxaca	Negativo	<i>G. intestinalis</i>
70	25	M	D.F	Negativo	<i>G. intestinalis</i>
71	34	F	Edo. Méx	Negativo	<i>G. intestinalis</i>
72	30	M	Edo. Méx	<i>C. cayetanensis</i>	<i>G. intestinalis</i>
73	36	M	D.F	<i>C. cayetanensis</i>	<i>C. cayetanensis</i>
74	21	M	Edo. Méx	<i>C. cayetanensis</i>	<i>C. cayetanensis</i>
75	23	F	D.F	Negativo	Negativo
76	36	M	D.F	Negativo	Negativo
77	23	F	Oaxaca	Negativo	Negativo
78	25	M	D.F	<i>C. cayetanensis</i>	<i>B. hominis</i>
79	18	M	Puebla	Microsporidios spp	Negativo
80	17	M	Chiapas	Negativo	Negativo
81	21	M	D.F	Negativo	Negativo
82	24	M	D.F	Microsporidios spp	Negativo
83	20	M	D.F	<i>C. cayetanensis</i>	Negativo
84	18	M	D.F	Negativo	Negativo
85	38	M	Edo. Méx	Microsporidios spp	<i>B. hominis</i>
86	29	M	Jalisco	Microsporidios spp	Negativo
87	42	M	Querétaro	Microsporidios spp	Negativo
88	26	M	D.F	Negativo	Negativo
89	26	M	D.F	Microsporidios spp	Negativo
90	23	F	Edo. Méx	Microsporidios spp	Negativo
91	36	M	D.F	<i>C. cayetanensis</i>	<i>B. hominis</i>
92	37	M	Puebla	<i>C. cayetanensis</i> <i>Cryptosporidium</i> spp	<i>B. hominis</i>
93	26	M	Edo. Méx	Microsporidios spp	<i>B. hominis</i>
94	22	M	Edo. Méx	<i>C. cayetanensis</i>	<i>B. hominis</i>
95	19	M	D.F	Microsporidios spp	<i>B. hominis</i>
96	17	F	Edo. Méx	<i>Cryptosporidium</i> spp	<i>B. hominis</i>
97	31	M	Veracruz	Microsporidios spp	Negativo
98	36	F	Puebla	<i>Cryptosporidium</i> spp Microsporidios spp	<i>B. hominis</i>
99	26	F	Veracruz	Negativo	Negativo
100	17	F	Guerrero	Microsporidios spp <i>Cryptosporidium</i> spp	Negativo
101	19	M	Edo. Méx	Microsporidios spp	Negativo

Cryptosporidium spp

102	27	F	D.F	<i>Cryptosporidium spp</i> <i>C. cayetanensis</i>	Negativo
103	28	F	D.F	<i>Cryptosporidium spp</i>	Negativo
104	26	F	Oaxaca	Negativo	Negativo

*=Dos muestras por paciente, *B. hominis*=*Blastocystis hominis*, *C. cayetanensis*=*Cyclospora cayetanensis*, *E. histolytica/dispar*=*Entamoeba histolytica/dispar*, *E. nana*=*Endolimax nana*, *G. intestinalis*=*Giardia intestinalis*, *S. stercoralis*=*Strongyloides stercoralis*.

Del género masculino fueron 84 pacientes (80.8%) y del femenino 20 (19.2%) Fig. 2.

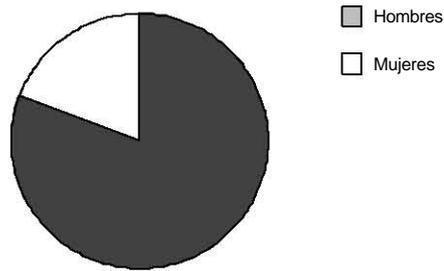


Figura 2. Porcentaje de pacientes en función del género.

El mayor número de pacientes analizados en este trabajo procedían del Distrito Federal y Estado de México. Fig.3.

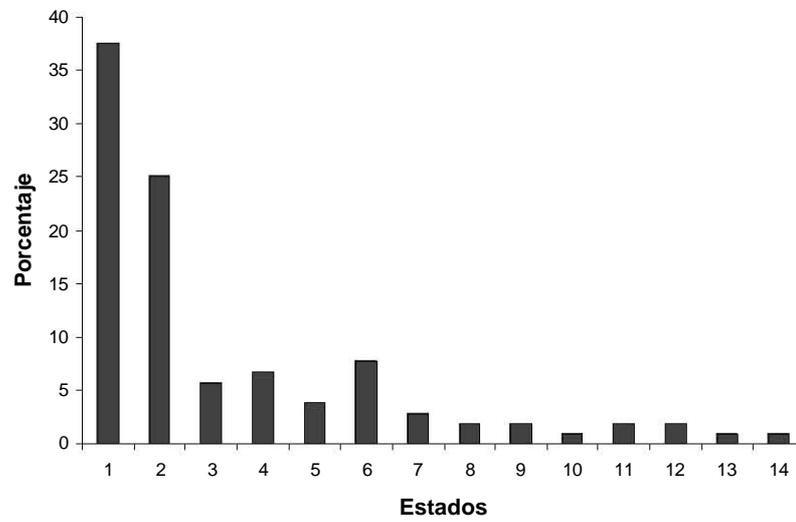


Figura 3. Lugar de residencia de los pacientes: 1) D.F 37.5% (39/104), 2) Edo. Méx 25% (26/104), 3) Veracruz 5.7% (6/104), 4) Puebla 6.7% (7/104), 5) Hidalgo 3.8% (4/104), 6) Oaxaca 7.7% (8/104), 7) Guerrero 2.8% (3/104), 8) Tlaxcala 1.9% (2/104), 9) Querétaro 1.9% (2/104), 10) B.C .96% (1/104), 11) Michoacán 1.9% (2/104), 12) Jalisco 1.9% (2/104), 13) Guanajuato .96% (1/104), 14) Chiapas .96% (1/104).

Con la tinción de Ziehl-Neelsen se identificó a tres parásitos oportunistas *Cryptosporidium spp*, *Microsporidios spp* y *Cyclospora cayetanensis*. Fig. 5-7. El más frecuente fue *Cryptosporidium spp*, con un 42.3% (44/104). A los *Microsporidios spp* se le encontró en el 32.7% (34/104) y a *Cyclospora cayetanensis* en el 16.3% (17/104) Fig. 4.

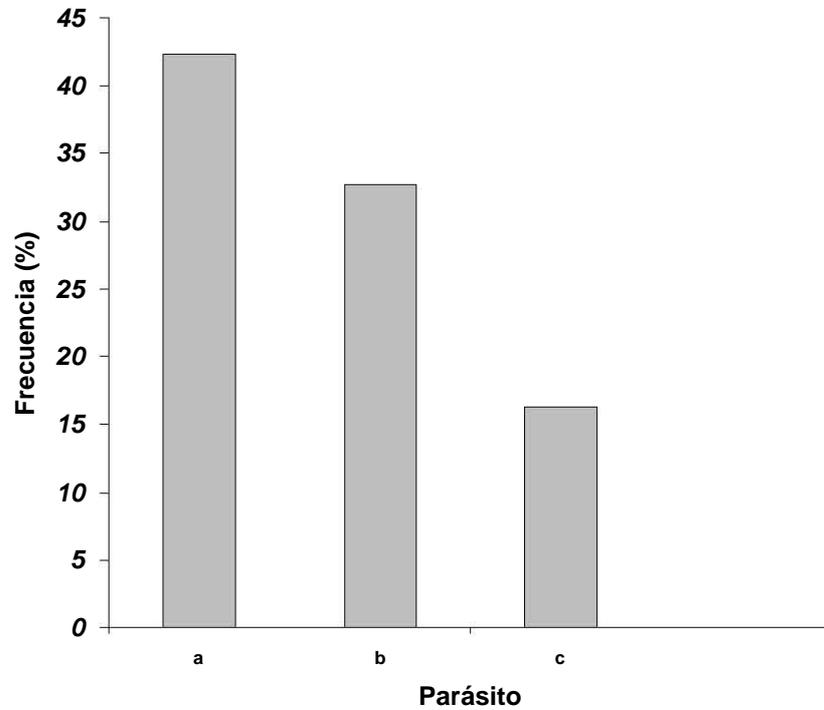


Figura 4. Frecuencia de parásitos oportunistas. a) *Cryptosporidium spp*
b) *Microsporidios spp* c) *Cyclospora cayetanensis*

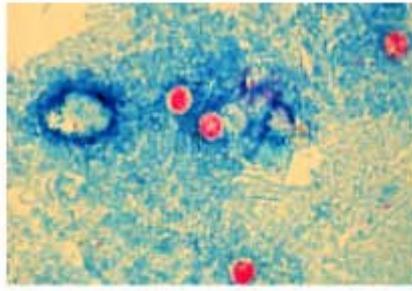


Figura 5. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. (Tinción de Ziehl-Neelsen modificada, 100X).

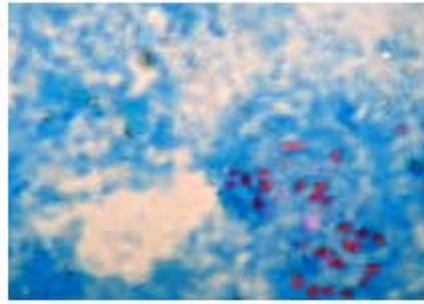


Figura 6. Esporas de *Microsporidios* spp (Tinción de Ziehl-Neelsen modificada, 100X).

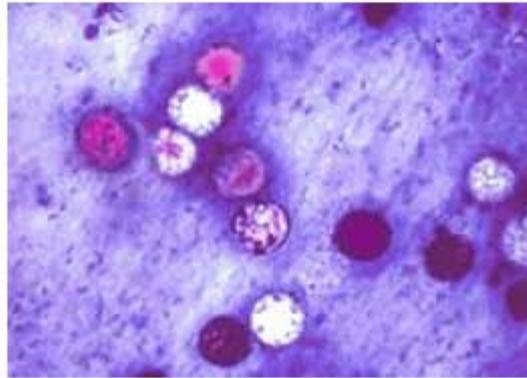


Figura 7. Ooquistes de *Cyclospora cayatanensis*. Tincion de Zielh-Neelsen modificada, 100X).

Tabla 4. Proporción de parásitos oportunistas en relación con el lugar de residencia de los pacientes.

Residencia <i>cayetanensis</i>	<i>Cryptosporidium spp</i>	Microsporidios spp	C.
D.F	15/39	5/39	7/39
Edo.Méx	10/26	14/26	6/26
Oaxaca	3/8	2/8	0/8
Puebla	4/7	3/7	2/7
Veracruz	3/6	2/6	0/6
Hidalgo	2/4	1/4	2/4
Guerrero	2/3	1/3	0/3
Tlaxcala	2/2	0/2	0/2
Querétaro	1/2	1/2	0/2
Michoacán	1/2	1/2	0/2
Jalisco	0/2	2/2	0/2
B.C	0/1	1/1	0/1
Guanajuato	0/1	1/1	0/1
Chiapas	0/1	0/1	0/1

C. cayetanensis= *Cyclospora cayetanensis*

Se encontró asociación entre los parásitos oportunistas: *Cryptosporidium* spp y Microsporidios spp en un 6.9% (7/104), *Cryptosporidium* spp y *C. cayetanensis* 4.8% (5/104). A *Cryptosporidium* spp, Microsporidios spp y *C. cayetanensis* se les encontró en el 1.9% (2/104) Fig. 8.

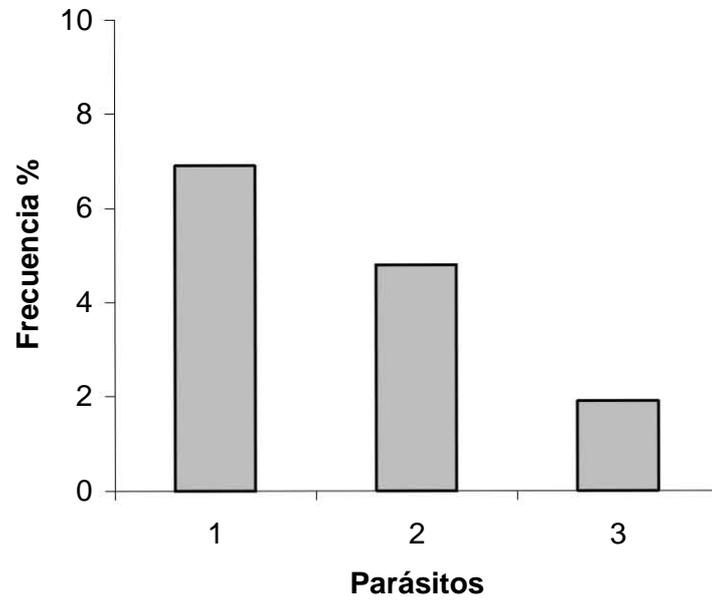


Figura 8. Asociación de parásitos oportunistas. 1) *Cryptosporidium* spp y Microsporidios spp 2) *Cryptosporidium* spp y *C. cayetanensis* 3) *Cryptosporidium* spp, Microsporidios spp y *C. cayetanensis*

En la Tabla 5. Se muestra la frecuencia de parásitos oportunistas en pacientes masculinos y femeninos.

Tabla 5. Prevalencia de parásitos oportunistas en cuanto al género de los pacientes.

Parásito	Masculino	Femenino
<i>Cryptosporidium spp</i> 30%	(35/84) 41.6%	(6/20)
Microsporidios spp 45%	(28/84) 33.3%	(9/20)
<i>C. cayetanensis</i> 5%	(16/84) 19%	(1/20)

C. cayetanensis= *Cyclospora cayetanensis*

Para conocer la frecuencia de parásitos oportunistas en relación con la edad de los pacientes, la población se dividió en cinco intervalos. Tabla. 6.

Tabla 6. Proporción de parásitos oportunistas en relación con la edad de los 104 pacientes.

Intervalo por edades	<i>Cryptosporidium spp</i>	Microsporidios spp	<i>C. cayetanensis</i>
11- 20	7/16	7/16	1/16
21-30	20/50	14/50	11/50
31-40	10/24	7/24	6/24
41-50	7/12	3/12	0/12
51-60	0/1	1/1	0/1
61-70	0/1	1/1	0/1

C. cayetanensis= *Cyclospora cayetanensis*

El porcentaje que ocupa cada intervalo de edades en la población total se muestra en la Fig. 9.

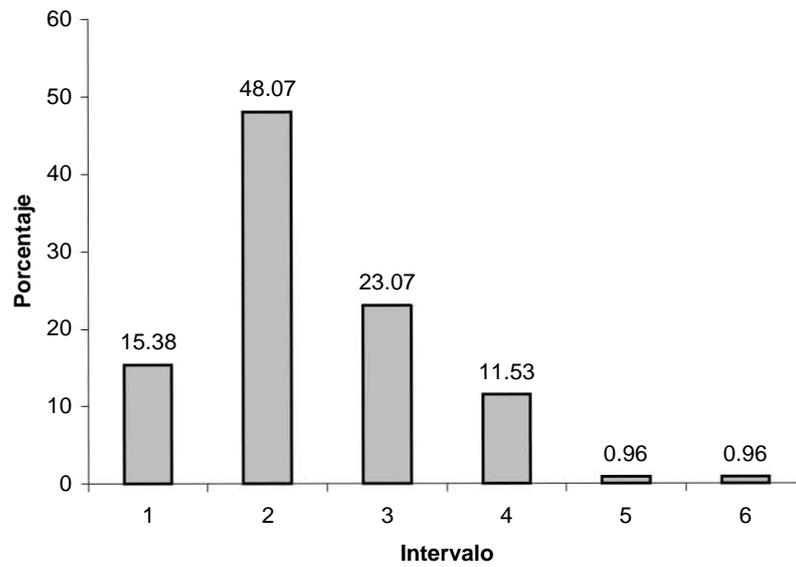


Figura 9. Intervalo de edades (años): 1) 11-20, 2) 21-30, 3) 31-40, 4) 41-50, 5) 51-60 y 6) 61-70.

Los parásitos que se encontraron mediante la técnica de Faust fueron: *Blastocystis hominis* con un 25% (26/104), *Giardia intestinalis* 4.8% (5/104), *Strongyloides stercoralis* 1.9% (2/104) y *Entamoeba histolytica/dispar* .96% (1/104). Fig. 10.

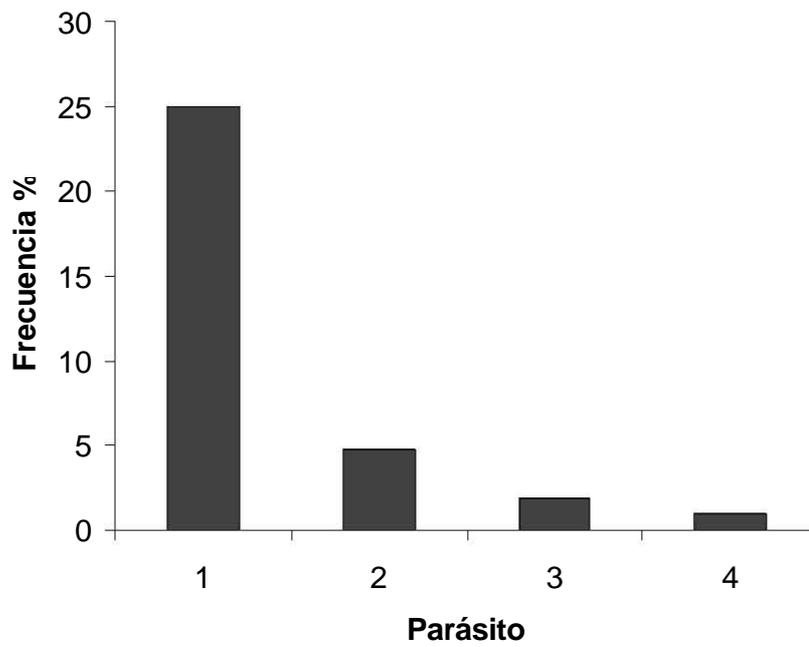


Figura 10. Faust: 1) *Blastocystis hominis* 2) *Giardia intestinalis* 3) *Strongyloides stercoralis* 4) *Entamoeba histolytica/dispar*

El diagnóstico de parásitos mediante dos técnicas (Ziehl- Neelsen y Faust) mostró la asociación de parásitos oportunistas con otros protozoarios patógenos (*B. hominis*, *G. intestinalis* y *Entamoeba histolytica/dispar*) y con un nematodo (*Strongyloides stercoralis*, Figura.11). Tabla. 7.

Tabla 7. Porcentaje de parásitos oportunistas con otros patógenos.

Parásitos	N	%
Microsporidios + <i>B. hominis</i>	(9/104)	8.6%
<i>Cryptosporidium spp</i> + <i>B. hominis</i>	(6/104)	5.8%
<i>C. cayetanensis</i> + <i>B. hominis</i>	(4/104)	3.8%
<i>Cryptosporidium spp</i> + Microsporidios + <i>B. hominis</i>	(2/104)	1.9%
<i>Cryptosporidium spp</i> + <i>S. stercoralis</i>	(1/104)	.96%
<i>Cryptosporidium spp</i> + <i>G. intestinalis</i> + <i>B. hominis</i>	(1/104)	.96%
<i>Cryptosporidium spp</i> + <i>S. stercoralis</i> + <i>B. hominis</i> .	(1/104)	.96%

B. hominis= *Blastocystis hominis*, *C.cayetanensis*= *Cyclospora cayetanensis* *S. stercoralis*=
Strongyloides stercoralis, *G. intestinalis*= *Giardia intestinalis*



Figura 11. Larva de *Strongyloides stercoralis*, obtenida con la técnica de concentración flotación, 16X)

De la población total, el 84.6% (88/104) estuvo parasitado y el 15.4% (16/104) no se encontraron parásitos. Fig. 12.

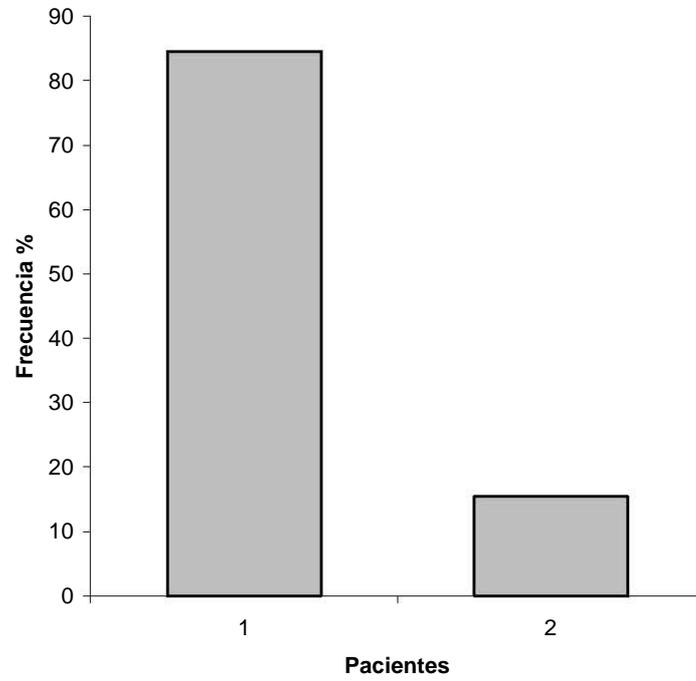


Figura 12. Pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida: 1) con parásitos. 2) sin parásitos.

8. DISCUSIÓN.

Este es el primer trabajo que analiza la frecuencia de la cryptosporidiosis en pacientes mexicanos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida de diagnóstico reciente. Los resultados son interesantes por varias razones, a) los pacientes procedían de 14 Estados de la República Mexicana, b) se analizaron a 104 pacientes ambulatorios con SIDA y c) se encontró una alta frecuencia de pacientes con parásitos (8 de cada 10).

La mayoría de los pacientes fueron del Distrito Federal (39) y del Estado de México (26), (62.5%) esta frecuencia es entendible, debido a la cercanía de sus domicilios con el Hospital General de México; no obstante, también se contó con pacientes de Estados tan alejados, como Chiapas (8) y Baja California (1).

Es importante resaltar que pacientes de 10 Estados estuvieron infectados con *Cryptosporidium* spp (Tabla 4); sin embargo, el no encontrarlos en pacientes de los otros cuatro Estados, quizá, fue por la cantidad de pacientes analizados de cada uno de estos Estados. Así mismo solo en el Estado de México, Jalisco, B.C y Guanajuato la microsporidiosis fue la más elevada. Por lo tanto es importante que se encausen investigaciones de carácter nacional para valorar con mayor claridad el papel de dichos parásitos en cada estado del país.

Fue significativa la incidencia de individuos masculinos con SIDA en la población ambulatoria fue de 80.8%, cifra considerablemente más elevada que en el género femenino 19.2%. Los rangos de edad más frecuentes fueron de 21 a 30 años (48%) y de 31 a 40 años (23%). Es decir, el 71 % de los pacientes fueron adultos jóvenes, que se encuentran en la edad económicamente activa y biológicamente más productiva.

Se debe señalar la alta frecuencia de *Cryptosporidium* spp. (42.3%), este resultado representa el más alto registrado en pacientes con VIH en nuestro País. Romo y col. (2002), la reportaron en un 35.7%. García y col (1988) lo encuentran en el 6.3%, Ponce de León y col (1998) en un 25%, Del Río y col (1991) en 9.8% y Mohar y col (1989) en el 9%. En una recopilación de datos se estima que en nuestro País la cryptosporidiosis es del 12%, (Del Campo-Rodríguez & Sifuentes-Osornio., 2004). Por otro lado, en reportes de pacientes con SIDA, no se encontró a *Cryptosporidium* (Villasís et al., 1995; Góngora et al., 1998 y García-sancho 2001). Cabe enfatizar que

los trabajos antes citados analizaron la frecuencia de pacientes con cryptosporidiosis y SIDA en población hospitalizada.

Resulta contrastante nuestro resultado (42.3%) con lo propuesto por Del Campo-Rodríguez & Sifuentes-Osornio (2004); por ello es importante señalar que nosotros analizamos pacientes ambulatorios con diagnóstico reciente de VIH (sin tratamiento farmacológico), esto implica, alcanzar una visión más verosímil de la alta prevalencia de la cryptosporidiosis en población ambulatoria con SIDA. No así, en el caso de las poblaciones hospitalizadas, que presentan una gran limitación a consecuencia de la terapia farmacológica, que incluye antiparasitarios, esto reduce la posibilidad de encontrar parásitos en los pacientes e influye negativamente en los resultados.

En contraposición a lo propuesto por Villasís y col., que proponen que se elimine a la cryptosporidiosis de la lista de los 10 patógenos más frecuentes en pacientes con SIDA (Del Campo-Rodríguez & Sifuentes-Osornio., 2004). El presente trabajo propone replantear el papel de la cryptosporidiosis en México, una vez que a esta parasitosis oportunista se le encontró casi en el 50% de los pacientes con SIDA. Debido a la alta prevalencia de esta parasitosis se exhorta a los médicos para que la busquen de forma intencional en estos pacientes, para disminuir el riesgo de complicaciones, así como: diarrea acuosa profusa, deshidratación, y probablemente la muerte.

Actualmente se han descrito más de 11 especies de *Cryptosporidium*, que son morfológicamente indistinguibles, sabemos que esta parasitosis es una zoonosis y que el hombre se infecta con más de una de estas especies y debido a que en nuestro País no hay estudios que investiguen el predominio de alguna de las especies. Es necesario diseñar protocolos, mediante PCR y RFLP's que permitan conocer las especies predominantes en las poblaciones de pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes.

En la presente investigación se logro valorar e identificar a *Cryptosporidium* spp como el parásito de mayor prevalencia en los pacientes con SIDA que se analizaron; sin embargo el alcancé fue mayor, una vez que se encontró la presencia de otros parásitos oportunistas capaces de provocar diarrea aguda y causar la muerte, tal es el caso de *Microsporidios* spp y *Cyclospora cayetanensis*. En los primeros se encontró la frecuencia mas alta reportada en pacientes con VIH en México (32.7%). Esta parasitosis se adquiere por fecalismo, debido a la contaminación del agua potable y los alimentos. En México, hay escasos reportes de *Microsporidiosis* en pacientes con VIH, solo un trabajo analizo biopsias de intestino delgado en 50 pacientes y obtuvo una prevalencia

del 31% (Gamboa et al., 1999) y otros reportes en pacientes con trasplantes (Gamboa-Domínguez et al., 2003). La Microsporidiosis es una parasitosis muy importante por: a) varias especies colonizan el intestino: *Enterocytosoon bienesi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *E. hellem* y *E. cuniculi*, b) son parásitos intracelulares obligados y c) se pueden diseminar; vía macrófagos, del intestino delgado a otros órganos y producir una microsporidiosis diseminada (Dunn & Smith., 2001). A si mismo se propone que se realicen investigaciones enfocadas a identificar las diferentes especies de Microsporidios spp.

Cyclospora cayatanensis es un parásito emergente, que se describió en el último cuarto del siglo XX. (Marshall et al., 1997) Hasta donde sabemos, en México, hay pocos casos registrados: 12 pacientes del D.F. (Sifuentes-Osornio et al., 1995), un caso del D.F., y otro de Michoacán (Ponce-Macotela et al., 1996). Otros dos casos procedentes del D.F, que tuvieron como antecedente el haber viajado a Acapulco, Gro., una semana antes de iniciar la sintomatología (Ponce-Macotela et al, 1998).

En la presente tesis, se encontró en el 16.3% de los pacientes con VIH. El lugar de procedencia fue: D.F (7), Edo de Méx (6), Puebla (2) e Hidalgo (2); es importante señalar, que no se había detectado *Cyclospora* en estos dos últimos Estados de la República.

Es importante resaltar la asociación de parásitos intracelulares obligados que se encontraron en los pacientes con SIDA. 6.9% de *Cryptosporidium* spp y Microsporidios spp, 4.8% de *Cryptosporidium* spp y *C. cayatanensis*, y 1.9% de *Cryptosporidium* spp, Microsporidios spp y *C. cayatanensis*. Resulta impresionante imaginar a los enterocitos invadidos por estos tres patógenos (éstos se ubican en diferentes sitios de la vellosidad intestinal). A *Cryptosporidium* se le localiza en la región más cercana a la base de la vellosidad, *Cyclospora* en la parte media y a los Microsporidios en la parte superior y los tres producen diarrea acuosa crónica en pacientes con inmunocompromiso (Richard & Goodgame., 1996).

Por otro lado, en el género femenino se encontró con mayor frecuencia a los Microsporidios spp 45% (9/20), a *Cryptosporidium. spp* con 30% (6/20) y *C. cayatanensis* con el 5% (1/20). En contraste con el género masculino que presentó a *Cryptosporidium. spp* 41.6% (35/84) como el patógeno de mayor prevalencia, Microsporidios spp con 33.3% (28/84) y *C. cayatanensis* con un 19% (16/84), este último, casi cuatro veces más frecuente que en el género femenino. Por lo tanto, en

investigaciones subsecuentes, es importante que se tome en cuenta el análisis de género para poder conocer si los parásitos oportunistas muestran cierta selectividad.

Los resultados obtenidos por medio de la técnica de Faust, presentan a *Blastocystis hominis* con mayor frecuencia 25%, Además a *B. hominis* se le encontró en asociación con los parásitos oportunistas, Microsporidios spp y *B. hominis* 8.6%, *Cryptosporidium*. spp y *B. hominis* 5.8% y *C. cayetanensis* y *B. hominis* 3.8%. Los resultados son importantes, porque la asociación de parásitos oportunistas que colonizan el intestino delgado más los parásitos que se ubican en el intestino grueso agudizan aún más el cuadro entérico de los pacientes con SIDA.

Además, hay que resaltar que en dos pacientes (Veracruz y Puebla) se encontraron larvas de *Strongyloides stercoralis*, el hallazgo es importante, porque este nematodo tiene un ciclo de autoinfección interna y en pacientes con inmunocompromiso, las larvas se diseminan a cualquier órgano: corazón, pulmón, riñón o cerebro y pueden provocar la muerte (Saucá et al., 2005).

Otros parásitos que se encontraron fueron: *Giardia intestinalis* 4.8%, y *Entamoeba histolytica/dispar* 0.96%, parásitos que producen malabsorción intestinal y disentería, respectivamente.

Los resultados permiten enfatizar la necesidad de establecer protocolos de diagnóstico de parásitos intestinales en los pacientes con SIDA. Por lo que se sugiere: realizar la búsqueda tradicional de parásitos mediante CPS de concentración y tinciones, como la de Zielh-Neelsen para identificar a los parásitos emergentes. Además de la identificación morfológica, es recomendable identificar las diferentes especies de los parásitos emergentes, mediante técnicas de biología molecular, así como la PCR-RFLP's y secuenciación.

Resulta contundente afirmar que en base al análisis del presente estudio, las parasitosis intestinales en pacientes ambulatorios con SIDA son altamente prevalentes y constituyen un enorme riesgo por sus implicaciones en la salud de los pacientes.

9. CONCLUSIONES.

De la presente investigación se pueden hacer las siguientes aseveraciones:

Se encontró que 8 de cada 10 pacientes con SIDA presentan parásitos que producen diarrea aguda y que son capaces de causar la muerte.

El análisis de pacientes de diagnóstico reciente con SIDA (libres de cualquier tratamiento farmacológico), fue estratégicamente importante, porque permitió conocer con mayor certeza la frecuencia de patógenos intestinales.

Cryptosporidium. spp fue el parásito oportunista con la prevalencia más alta reportada en individuos con SIDA, por lo que debe buscarse de manera dirigida en los pacientes de dicha población y de ninguna manera debe considerarse una infección de menor importancia.

Otros oportunistas intracelulares obligados detectados en estos pacientes fueron: Microsporidios spp y *Cyclospora cayetanensis*.

La búsqueda intencionada de otros parásitos, con la técnica de concentración, fue extraordinariamente importante, porque permitió detectar a dos pacientes con estrongiloidosis; además, se encontró alta frecuencia de *Blastocystis hominis*.

Debido a que en nuestro País, no hay reportes de la frecuencia de las diferentes especies de *Cryptosporidium* y microsporidios, se considera que es necesario implementar protocolos de genotipificación, mediante PCR y RFLP's que permitan conocer las especies predominantes en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes.

La presente investigación permitió actualizar, conocer y evaluar el papel de la cryptosporidiosis, así como de otros parásitos oportunistas entericos en pacientes con SIDA de diagnóstico reciente. Además apoya al análisis epidemiológico de éstas parasitosis y SIDA en México.

10. REFERENCIAS.

1. **Alak JI, wolf BW, Mduurwa EG, Pimentel-Smith GE, Kolavala S , Abdelrahman J, Suppiramaniam V.** 1999. *Lactobacillus reuteri* or *L. acidophilus* reduced intestinal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocyst in immunodeficient C57B1/6 mice . Cell Mol Biol 45(6):855-63
2. **Arikan S, Erguven S, Akyon Y, Gunalp A.** 1999. Cryptosporidiosis in immunocompromised patients in a Turkish university hospital. Acta Microbiol Immunol Hung.46(1):33-40
3. **Calvo BM, Rincón de H. W, Diaz A. I, Colmenares M.** 1995. *Cryptosporidium* sp e *Isoospora belli* en pacientes con diarrea, infectados por el virus de inmunodeficiencia humana. Maracaibo, 1993. Kasma 23(2): 89-123.
4. **Carev CM, Lee H, Trevors JT.** 2004 Feb. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Water Res.38(4):818-62.
5. **Cavalier-Smith T.** 1998 Aug. A revised six-kingdom system of life. Biol Rev Camb Philos Soc.73(3):203-66.
6. **Cevallos AM, Bhat N, Verdon R, Hamer DH, Stein B, Tzipori S, Pereira ME, Kusch GT, Ward HD.** 2000 Sep. Mediation of *Cryptosporidium parvum* infection in vitro by mucin-like glycoproteins defined by a neutralizing monoclonal antibody. Infect Immun. 68(9):5167-75.
7. **Chen XM, LaRusso NF.** 2000 Feb. Mechanisms of attachment and internalization of *Cryptosporidium parvum* to biliary and intestinal epithelial cells. Gastroenterology.118(2):368-79.
8. **Current WL, Garcia LS.** 1991 Dec. Cryptosporidiosis. Clin Lab Med.11(4):873-97.
9. **Del Campo-Rodriguez LE, Sifuentes-Osornio J.** 2004 Mar-Apr. Opportunistic infections in the acquired immunodeficiency syndrome: the history in Mexico 20 years after the beginning of the epidemic. Rev Invest Clin. 56(2):169-80
10. **Del Rio-Chiriboga C, Tellez-Gomez I, Orzechowski-Rallo A, Alanis-Ortega A.** 1996. The spectrum of HIV infection in patients seen at a private hospital in Mexico City: 115 patients seen from 1984 to 1990. Arch Med Res.27(2):201-4.

11. **Dunn AM, Smith JE.** Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. *Microbes and Infection* 2001; 3: 381-8.
12. **Enriquez EJ, Riggs MW.** 1998 Sep. Role of immunoglobulin A monoclonal antibodies against P23 in controlling murine *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun.* (66):4469-73.
13. **Escobedo AA, Nunez FA.** 1999. Prevalence of intestinal parasites in Cuban acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients. *Acta Trop.*72(1):125-30.
14. **Fall A, Thompson RC, Hobbs RP, Morgan-Ryan U.** 2003 Apr. Morphology is not a reliable tool for delineating species within *Cryptosporidium*. *J Parasitol.* (2):399-402.
15. **Fayer R, Ungar BL.** 1986 Dec. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol Rev.*50(4):458-83.
16. **Gamboa-Domínguez A, De Anda J, Donis J, Ruiz-Maza F, Visvesvara GS, Diliz H.** Disseminated *Encephalitozoon cuniculi* infection in a Mexican kidney transplant recipient. *Transplantation* 2003; 75 (11): 1898-1900.
17. **Garcia-Garcia ML, Bravo-Garcia E, Palacios-Martinez M, Mora-Galindo JL, Valdespino-Gomez JL.** 1988 Jul-Aug. Initial clinical manifestations in patients with AIDS. *Salud Publica Mex.*30(4):528-43.
18. **Gilles HM, Hoffman PS.** 2002 Mar. Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. *Trends Parasitol.* (3):95-7.
19. **Hoepelman AI.** 1996 May. Current therapeutic approaches to cryptosporidiosis in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother.*37(5):871-80.
20. **Hunter PR, Nichols G.** 2002 Jan. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 15(1):145-54.
21. **Kappe S, Bruderer T, Gantt S, Fujioka H, Nussenzweig V, Menard R.** 1999 Nov 29. Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J Cell Biol.* 147(5):937-44.
22. **Keusch GT, Hamer D, Joe A, Kelley M, Griffiths J, Ward H.** 1995 May 6. Cryptosporidia--who is at risk?. *Schweiz Med Wochenschr.*125(18):899-908.
23. **Kuhls TL, Mosier DA, Crawford DL, Griffis J.** 1994. Seroprevalence of cryptosporidial antibodies during infancy, childhood, and adolescence. *Clin Infect Dis.*(5):731-5.

24. **Langer RC, Riggs MW.** 1999 Oct. Cryptosporidium parvum apical complex glycoprotein CSL contains a sporozoite ligand for intestinal epithelial cells. Infect Immun. 67(10):5282-91.
25. **Laxer MA, D'Nicuola ME, Patel RJ.** 1992 Oct. Detection of Cryptosporidium parvum DNA in fixed, paraffin-embedded tissue by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg.47(4):450-5.
26. **Le Moing V, Bissuel F, Costagliola D, Eid Z, Chapuis F, Molina JM, Salmon-Ceron D, Brasseur P, Lepout C.** 1998 Jul 30. Decreased prevalence of intestinal cryptosporidiosis in HIV-infected patients concomitant to the widespread use of protease inhibitors. AIDS.12(11):1395-7.
27. **Learmonth JJ, Ionas G, Ebbett KA, Kwan ES.** 2004 Jul. Genetic characterization and transmission cycles of Cryptosporidium species isolated from humans in New Zealand. Appl Environ Microbiol.70(7):3973-8.
28. **Leoni F, Gallimore CI, Green J, McLauchlin J.** 2003 Mar. Molecular epidemiological analysis of Cryptosporidium isolates from humans and animals by using a heteroduplex mobility assay and nucleic acid sequencing based on a small double-stranded RNA element. J Clin Microbiol.41(3):981-92.
29. **Levine N D, Corlis J O, Coxfe E.**1980 Feb. A newly revised classification of the protozoa. J Protozool. 27(1):37-58.
30. **Lopez-Velez R, Tarazona R, Garcia Camacho A, Gomez-Mampaso E, Guerrero A, Moreira V, Villanueva R.** 1995. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.14(8):677-81.
31. **Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR.** 1997 Jan. Waterborne protozoan pathogens. Clin Microbiol Rev.;10(1):67-85.
32. **McLauchlin J, Pedraza-Diaz S, Amar-Hoetzeneder C, Nichols GL.** 1999 Oct. Genetic characterization of Cryptosporidium strains from 218 patients with diarrhea diagnosed as having sporadic cryptosporidiosis. J Clin Microbiol. 37(10):3153-8.
33. **Mercado R, Garcia M.** 1995 Apr. Annual frequency of Cryptosporidium parvum infections in children and adult outpatients, and adults infected by HIV. Rev Med Chil.123(4):479-84.
34. **Mohar A, Romo J, Salido F, Jessurun J, Ponce de Leon S, Reves E, Volkow P, Larraza O, Peredo MA, Cano C, et al.** 1992 May. The spectrum of clinical

and pathological manifestations of AIDS in a consecutive series of autopsied patients in Mexico. AIDS.6(5):467-73

35. **Navarro-Martinez L, Bornav-Llinares FJ, Rueda C, del Aguila C, da Silva AJ, Oleaga A, Ramaio V, Fenov S, Pieniazek NJ.** 2003. Molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. from animals in Spain. J Eukaryot Microbiol. 50 Suppl:553-4.
36. **Nesterenko MV, Woods K, Upton SJ.** 1999 Jul 7. Receptor/ligand interactions between *Cryptosporidium parvum* and the surface of the host cell. Biochim Biophys Acta. 1454(2):165-73.
37. **Ong CS, Eisler DL, Alikhani A, Fung VW, Tomblin J, Bowie WR, Isaac-Renton JL.** 2002 Mar. Novel cryptosporidium genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. Emerg Infect Dis. 8(3):263-268
38. **Ortega YR, Sheehy RR, Cama VA, Oishi KK, Sterling CR.** 1991 Nov-Dec. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates of bovine and human origin. J Protozool.38(6):40S-41S.
39. **Pedersen C, Danner S, Lazzarin A, Glauser MP, Weber R, Katlama C, Barton SE, Lundgren JD.** 1996 Apr. Epidemiology of cryptosporidiosis among European AIDS patients. Genitourin Med.72(2):128-31.
40. **Pedraza-Diaz, S; C. Amar and J. McLauchlin.** 2000. The identification and characterization of an unusual genotype of *Cryptosporidium* from human feces as *Cryptosporidium meleagridis*. FEMS Microbiol. Lett. 189:189-194.
41. **Petersen C, Gut J, Doyle PS, Crabb JH, Nelson RG, Leech JH.** 1992 Dec. Characterization of a > 900,000-M(r) *Cryptosporidium parvum* sporozoite glycoprotein recognized by protective hyperimmune bovine colostral immunoglobulin. Infect Immun. 60(12):5132-8.
42. **Ponce de Leon S, Macias AE, Cruz A, Calva J, Carlos Tinoco J, Ruiz C, Ojeda F, Bobadilla M, Lilia Rolon A, Villalobos I, et al.** 1988 Jul-Aug. The first 5 years of the AIDS outbreak in Mexico. Salud Publica Mex.30(4):544-54.
43. **Ponce- Macotella M, Cob- Sosa C, Martinez-Gordillo M N.** *Cyclospora* in 2 Mexican children. Rev Invest Clin 1996 Nov- Dic; 48(6):461-3.
44. **Ponce- Macotella, Martinez-Gordillo M N.** Búsqueda de *Cyclospora cayetanensis* en los familiares de dos niños con cyclosporidiosis. Bol Med Hosp. Infant Mex. 1998 Sept; 55(9): 502-04

45. **Richard W, Goodgame M D.** Understanding intestinal Spore-Forming Protozoa: Cryptosporidia, Microsporidia, Isospora and Cyclospora. *Ann Intern Med.* 1996; 124: 429-441.
46. **Riggs MW, Schaefer DA, Kapil SJ, Barlev-Maloney L, Perryman LE.** 2002 Feb. Efficacy of monoclonal antibodies against defined antigens for passive immunotherapy of chronic gastrointestinal cryptosporidiosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(2):275-82.
47. **Romo J, Salido F, Jessurum J, Dieguez M, Vic R, Higuera F.** 2002. Causes and factors of diarrhea in the acquired immunodeficiency syndrome in a hospital of Mexico City. *Curr. Drug targets immune Endocr. Metabol Disord.* 2 (3): 291-301
48. **Rossignol JF, Hidalgo H, Feregrino M, Higuera F, Gomez WH, Romero JL, Padierna J, Gevne A, Avers MS.** 1998 Nov-Dec. A double-'blind' placebo-controlled study of nitazoxanide in the treatment of cryptosporidial diarrhoea in AIDS patients in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 92(6):663-6.
49. **Sagodira S, Buzoni-Gatel D, Iochmann S, Naciri M, Bout D.** 1999 May 14. Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA. *Vaccine.* 17(19):2346-55.
50. **Sauca Subias G, Barrufet Barque P, Besa Beringues A, Rodriguez Ramos E.** *Strongyloides stercoralis* hyperinfeccion in a patient with acquired immunodeficiency síndrome. *An Med Interna.* 2005 Mar;22(3):139-41.
51. **Schaefer DA, Auerbach-Dixon BA, Riggs MW.** 2000 May. Characterization and formulation of multiple epitope-specific neutralizing monoclonal antibodies for passive immunization against cryptosporidiosis. *Infect Immun.* 68(5):2608-16.
52. **Sifuentes-Osornio J, Porras-Cortes G, Bendall RP, Morales-Villareal F, Reyes- Terán G, Ruíz-Palacios GM.** *Cyclospora cayetanensis* infection in patients with and without AIDS: Biliary disease as another clinical manifestation. 1995 Nov; *Rev Clin Infect Dis.* 21(5): 1092-7
53. **Tay J, Sánchez JT.** 2002 Marzo-Abril. Características de protozoarios y el helmintos capaces de causar diarrea aguda en humanos. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 45(2) 64-70

54. **Theodos CM, Griffiths JK, D'Onfro J, Fairfield A, Tzipori S.** 1998 Aug. Efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in cell culture and in animal models. *Antimicrob Agents Chemother.*42(8):1959-65.
55. **Vázquez O, Velasco O, Álvarez R.** 1988 Mayo. *Cryptosporidiosis* un problema frecuente en SIDA?. *Infectología.* 8(5) 245-250
56. **Vázquez Tsuji O, Jimenez Dominguez R, Campos Rivera T, Valencia Rojas S, Romero Cabello R, Gamez Aranda V, Martínez-Barbabosa I.** *Cyclospora cayetanensis* infection . Laboratory diagnosis. *Rev Latinoam Microbiol.* 2000 Jan-Mar; 42(1): 45-52
57. **White AC Jr, Chappell CL, Havat CS, Kimball KT, Flanigan TP, Goodgame RW.**1994 Aug. Paromomycin for cryptosporidiosis in AIDS: a prospective, double-blind trial. *J Infect Dis.*170(2):419-24.
58. **Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, Cabrera L, Gilman RH, Lal AA.** 2001 Feb 1. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis.*183(3):492-7.
59. **Zu SX, Li JF, Barrett LJ, Faver R, Shu SY, McAuliffe JE, Roche JK, Guerrant RL** 1994. Seroepidemiologic study of *Cryptosporidium* infection in children from rural communities of Anhui, China and Fortaleza, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 51(1):1-10