

## ACTUALIZACIONES

# CRYPTOSPORIDIOSIS

INES HELENA VASQUEZ G.\*, MARCOS RESTREPO I.\*\*, DAVID BOTERO\*\*\*

### INTRODUCCION

A pesar del gran número de microorganismos enteropatógenos que pueden identificarse actualmente, todavía hay casos en los cuales no se logra adjudicar la enfermedad del paciente a un determinado microorganismo. En éste grupo posiblemente existan casos debidos a *Cryptosporidium*. Hasta el momento esta parasitosis ha sido poco diagnosticada debido a que es causada por un parásito al que sólo recientemente se le ha dado importancia. Buscando el parásito en heces se aclara un gran número de casos en los cuales la causa de la diarrea permanecía indeterminada.

Según cita Tzipori (1), el primero en describir el parásito fue Tyzzer en 1907 en la mucosa gástrica de un ratón de laboratorio.

El primer caso humano solamente fue diagnosticado en 1976 en una biopsia rectal de una niña de tres años y sin problemas inmunológicos (2).

A partir de esta fecha y hasta 1982 sólo se habían informado 7 casos humanos (1, 3, 4); todos diagnosticados por biopsia intestinal o rectal, algunos de ellos murieron. Desde entonces se han publicado numerosos casos, tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunosuprimidos.

La coloración de Giemsa la utilizó Tzipori en 1980 (5) para diagnosticar un caso humano de cryptosporidiosis intestinal por medio de extendidos de material fecal. Posteriormente Henricksen y Pohlenz (3) introdujeron la técnica de Ziehl-Neelsen para diferenciar

los ooquistes del parásito de las levaduras presentes en las materias fecales; pues los primeros son ácido-alcohol resistentes, a diferencia de los hongos que no lo son. Con otras modificaciones que se han hecho a las técnicas de coloración, se busca obtener un método que haga posible el diagnóstico más eficiente de éste parásito que puede ser la causa del 40% de las diarreas que no se diagnostican (6).

Debido a que en nuestro país, la diarrea es una de las principales causas de consulta y de mortalidad, especialmente infantil, se hace necesario conocer su etiología, para así poder instaurar tratamiento efectivo y tomar medidas de control. En Colombia no se habían realizado estudios referentes a cryptosporidiosis humana hasta 1985 cuando un grupo de estudiantes de medicina en Medellín, examinó entre agosto y septiembre, 400 muestras de heces diarreicas, encontrando 10 positivas para *Cryptosporidium* (7, 8, 9).

La cryptosporidiosis es una zoonosis descrita en humanos, que puede afectar la gran población que mundialmente vive en relación cercana con animales, especialmente bovinos (10) y que afecta seriamente a los pacientes inmunocomprometidos.

Este parásito se ha reconocido desde comienzos del siglo como causante de enteritis en varias especies de animales, en los que puede llegar a ser epidémica (1, 3). Actualmente existen informes cada vez más frecuentes en los que implican a éste parásito como causa de morbilidad en humanos y ocasionalmente de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos.

\* Médica especialista en Microbiología y Parasitología Médicas, Corporación para Investigaciones Biológicas.

\*\* Profesor de Parasitología, Microbiología e Inmunología de la Universidad Pontificia Bolivariana Y Corporación para estudios de la Salud (CES), Medellín.

\*\*\*Profesor de Parasitología de la Universidad Pontificia Bolivariana y de la Universidad de Antioquia, Medellín. Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín.

Separatas: Inés Helena Vásquez G., Corporación para Investigaciones Biológicas AA 7378, Medellín, Colombia.

## CLASIFICACION

*Cryptosporidium*, es un género de la familia *Cryptosporidiidae*, suborden *Eimeriina*, orden *Eucoccidiida*, subclase *Coccidia*, clase Sporozoa, phylum Apicomplexa, relacionado taxonómicamente con *Isospora*, *Toxoplasma* y *Sarcocystis* (1, 11) (Cuadro No.1).

El orden *Eucoccidiida* incluye las coccidias propiamente dichas, que se caracterizan por tener en su ciclo de vida una fase sexual y otra asexual, un cigote no móvil y generalmente 2 a 4 esporozoitos dentro del ooquiste que se encuentra en el intestino. Cuando el esporoquiste está presente en materias fecales, tiene 2-4 ó más esporozoitos. Conociendo el tamaño del ooquiste, su estructura interna y el animal al cual parasita, se puede clasificar la especie de *Coccidia* (12).

En las coccidiosis humanas el estado del parásito en el ciclo de vida, es un parámetro para el diagnóstico cuando se toma una biopsia intestinal. Al microscopio de luz, se observan numerosos organismos de 3 a 4 micras, adheridos al borde vellosos de la célula. Esta misma muestra en el microscopio electrónico revela suficientes estados del ciclo de vida del parásito para la identificación del género (13).

En contraste con *Cryptosporidium*, los parásitos del género *Isospora*, que también causan diarrea, son parásitos intracitoplásmicos, menos relacionados con la

Cuadro No. 1:

TAXONOMIA DE CRYPTOSPORIDIIDAE:			
Protozoa			
Phylum	Phylum	Phylum	Phylum
Sarcomastigophora	Apicomplexa		Ciliophora
Orden Eucoccidiida			
Suborden Eimeriia		Suborden Haemosporina	
Plasmodium sp.			
Familia	Familia	Familia	
Sarcocystidae	Eimeriidae	Cryptosporidiidae	
Pneumocystis carinii	Sarcocystis sp.	Eimeria sp.	Cryptosporidium
	Toxoplasma gondii	Isospora belli	

inmunosupresión. Para *Isospora* el tratamiento es más efectivo que para *Cryptosporidium* (14, 15, 16). Con las técnicas de coloración de ácido-resistencia también se colorean de rojo brillante, con un ooquiste de mayor tamaño, ovalado y que contiene 2 esporozoitos (17), lo cual hace la diferencia con *Cryptosporidium*.

Hasta el momento se considera que *Cryptosporidium* no tiene especificidad por un huésped determinado y se ha creído que sólo existe una especie; Tzipori (18) creyó confirmarlo cuando el parásito aislado de terneros con diarrea, infectó otras 7 especies de animales diferentes, produciendo enteritis en algunas de ellas. A pesar de lo anterior Upton y Current (19) proponen la existencia de dos especies: *C. muris* y *C. parvum*, que se diferencian por su tamaño, siendo más grande *C. muris*. Este último tiene una sutura longitudinal en un polo de la pared del ooquiste. Ambas especies se encuentran en el ganado, pero aparentemente *C. parvum*, es el responsable de la mayoría de casos de enteritis en los mamíferos.

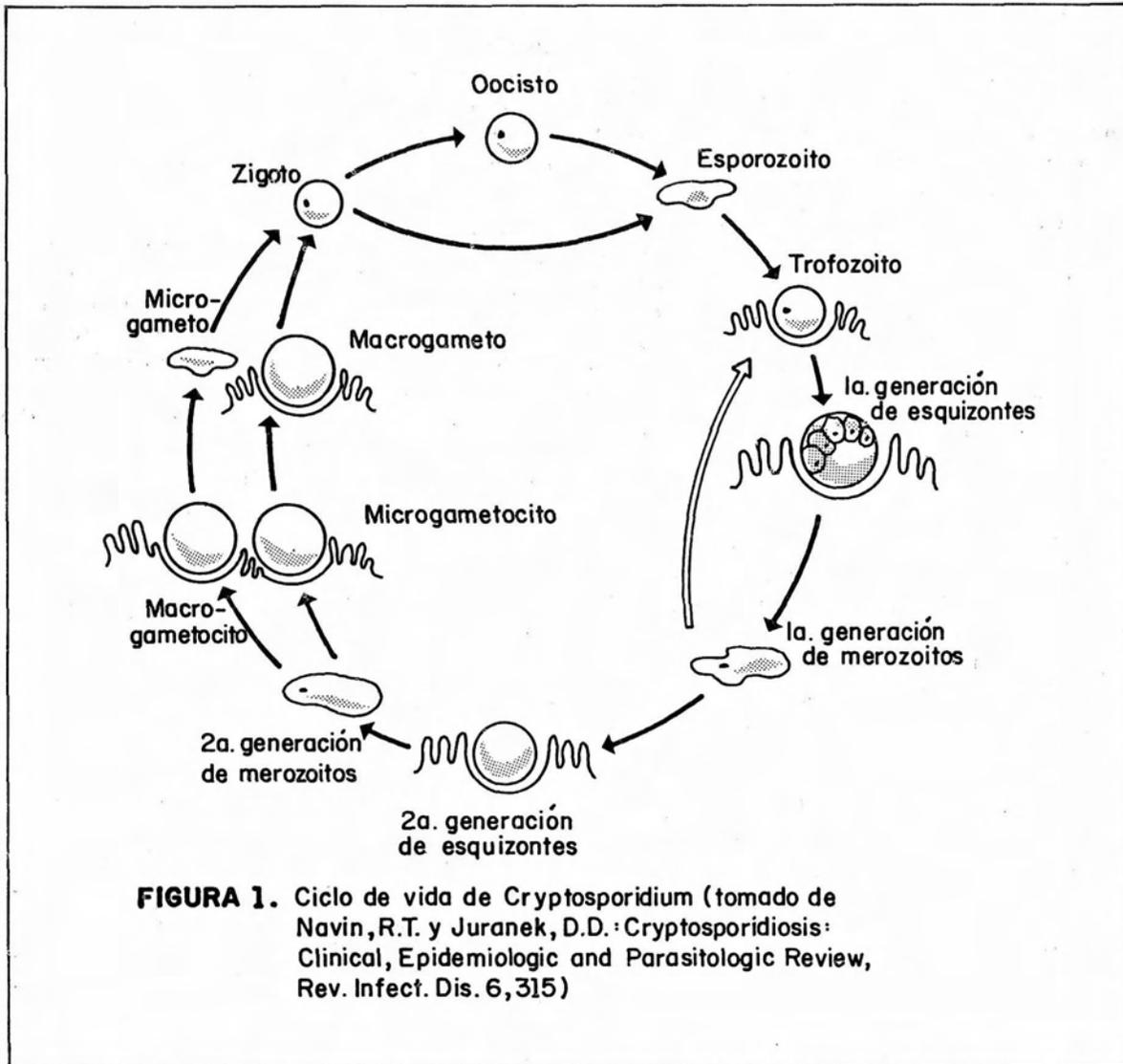
## CICLO DE VIDA

El parásito tiene un ciclo de vida monoxeno (Figura No. 1), que se divide en 6 etapas: desenquistación (liberación de esporozoitos infectantes), merogonia (multiplicación asexual), gametogonia (formación de gametos), fertilización, formación de la pared del ooquiste y esporogonia (formación de esporozoitos). Al microscopio electrónico el tamaño del parásito varía de 2 a 6 micras dependiendo del estado del ciclo de vida en que se encuentre (20).

Este ciclo de vida se conoció por estudios realizados en animales de laboratorio (1).

Se sabe que la infección se hace por vía oral, por contaminación fecal, al ingerir el ooquiste maduro infectante que es uno de los ooquistes de coccidias, más pequeño conocido (3); contiene 4 esporozoitos con sus nucleos, en forma de banano y puede encontrarse libre o unido a la célula epitelial (12).

Los esporozoitos se liberan cuando la pared del ooquiste es digerida en el intestino del paciente. Se localiza en el borde en cepillo de las microvellosidades del intestino, como un parásito intracelular extracitoplásmico. Dentro de la célula aparece el trofozoito,



que es el estado más temprano de desarrollo del parásito, que como las demás formas parasitarias sólo se encuentra en la superficie epitelial de las células intestinales o epiteliales ciliadas del tracto respiratorio, pero nunca invade el citoplasma (3, 21). El contacto inicial entre el organismo y el glicocáliz de la célula huésped produce un acortamiento o ausencia de las microvellosidades, inmediatamente debajo del parásito, apareciendo inicialmente sólo asociado con el extremo de la microvellosidad. La unión del parásito a la célula conlleva la fusión de la estructura más externa del parásito (que forma una membrana externa y dos

internas) con la membrana de la célula epitelial que al aplanarse ha formado pliegues que envuelven al parásito y posteriormente se funde en un sitio sobre el *Cryptosporidium* (12, 22), formándose una membrana gruesa alrededor del organismo.

El parásito es intracelular, localizado en una esfera de internalización de la membrana microvellosa la cual separa al parásito del citoplasma de la célula huésped. Se produce una acumulación de gránulos densos en el citoplasma de la célula que contiene el parásito en la región de unión.

El citoplasma del trofozoito queda rodeado por cuatro membranas diferentes; cada una con características de membrana única, la externa presenta una cubierta filamentosa indistinguible de las microvellosidades de la célula epitelial (23). Al madurar el parásito, las membranas se desintegran, permitiendo el contacto directo entre la membrana externa del parásito y el citoplasma celular; el disco de unión que existía se amplía y se forma una zona electrodensa visible con microscopía electrónica; ésta imagen corresponde a un organelo de unión altamente especializado que funciona en la alimentación. Donde éste se forma, las vellosidades intestinales están completamente degeneradas, éste hecho y la presencia de la capa fibrilar en la membrana externa, ayuda a diferenciarlo de otras coccidias (12, 23, 24). (Figura No. 2).

El trofozoito sufre tres divisiones nucleares para formar un esquizonte con ocho merozoitos hijos (merontes I), denominados esquizontes de primera generación. Estos se liberan y luego reinfectan otras células epiteliales, reciclando como merontes I; se redondean y sufren dos divisiones nucleares, formando la segunda generación de esquizontes, que contienen cuatro merozoitos de segunda generación (merontes II). Estas formas parasitarias no pueden hacer reciclaje, evolucionan a células sexuales diferenciadas: macro y microgametocitos. El macrogametocito se convierte en macrogameto y el microgametocito sufre división nuclear y forma varios microgametos, entre 12 y 16, que se pueden diferenciar de otros estados por microscopía

electrónica, pues presentan gránulos claros intracitoplásmicos de polisacáridos y gránulos densos (21, 24).

El microgameto se une con el macrogameto y forman el cigoto, de éste se desarrolla el ooquiste, que esporula en la vacuola parasitófaga, complementando así el ciclo de vida. Los ooquistes son eliminados con la materia fecal, y son infectantes para otras personas o animales.

Se describen dos tipos de ooquistes: los primeros de pared gruesa, que corresponden aproximadamente al 80% del total de quistes formados, estos pasan por el intestino sin alterarse, son eliminados con la materia fecal y son los responsables de la transmisión de la enfermedad; los segundos son de pared delgada con una membrana simple, se rompen rápidamente después de la salida de la célula que los contiene; y corresponden a las formas autoinfectantes, los cuales no se recuperan en las materias fecales. Estos últimos liberan esporozoitos, originando el ciclo endógeno, en el cual los ooquistes formados invaden los enterocitos causando la reinfección y junto con la presencia de merontes I que reciclan, son responsables de la enfermedad crónica que dura meses o años. Esto sugiere que el parásito, a diferencia de otras coccidias, puede experimentar múltiples ciclos de esquizogonia, al menos en inmunodeficientes (25-28).

#### CARACTERISTICAS PARASITOLÓGICAS

Cuando la muestra de materia fecal filtrada se coloca con dicromato de potasio al 2.5%, los ooquistes esporulan por aireación en una semana a temperatura ambiente, en éste tiempo se puede apreciar que los ooquistes contienen 4 esporozoitos y un residuo esférico (29).

La pared de cada ooquiste tiene una sutura única en un polo, la cual comprende 1/3 o 1/2 de la circunferencia, durante la desenquistación la sutura se vuelve hendidura por donde salen los esporozoitos. Estos últimos miden  $3.8 \times 0.6$  micras y tienen la superficie externa rugosa (30).

La viabilidad de los ooquistes se puede determinar por coloración con naranja de acridina (31).

En el laboratorio se ha logrado llevar a cabo el ciclo de vida de *Cryptosporidium* en membrana corioal-

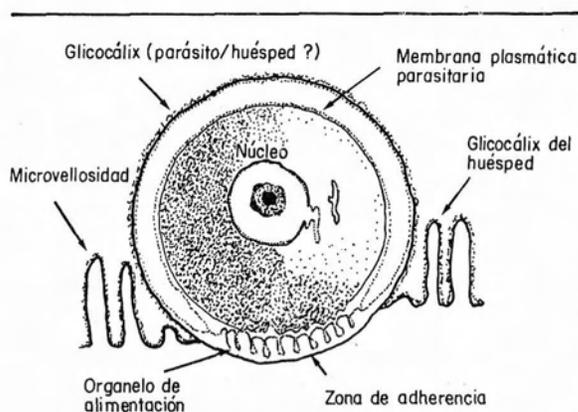


FIGURA 2. Localización del parásito. (Tomado de Garza, D.: Diarrhea Caused by a Coccidian Parasitic, Lab Med. 14, 284)

toidea de embrión de pollo (32), cultivos de células de pulmón fetal humano, cultivo primario de riñón de pollo y riñón de cerdo.

La importancia de éstos procedimientos, radica en que pueden servir como un método rápido para la evaluación de drogas potencialmente útil para el tratamiento de la enfermedad.

Los ooquistes previamente lavados y concentrados por el método de Sheather, se colocan en solución con antibióticos. Para obtener esporozoitos libres se incuban los ooquistes en PBS con tripsina al 0.25% y taurocolato de sodio al 0.75% por 30-60 minutos a 37°C. Los esporozoitos desengastados se suspenden en el medio de crecimiento y se llevan a un tubo de Leighton que contenga una monocapa de células en crecimiento. Después de 4 horas de incubación a 37°C en atmósfera de Co<sub>2</sub> al 5% ocurre la unión y penetración de los esporozoitos a las células.

En los cultivos de pulmón fetal humano, los esporozoitos penetran o se unen a las células, a las 8 horas ya se han transformado en trofozoitos dentro de las vacuolas parasitófagas, a las 12 horas ya existe una merogonia con la aparición de merontes tipo I con 6-8 merozoitos y a las 24 horas de inoculación, merontes tipo II con 4 merozoitos. Las formas sexuadas, macrogametos y microgametocitos se ven a las 48 horas y los primeros ooquistes a las 72 horas. El ooquiste esporulado fue la única forma observada durante los días 7 y 31 después de la inoculación de los esporozoitos. La mayoría de los ooquistes esporulados permanecen dentro de la vacuola parasitófaga. Las pruebas de infectividad en ratones lactantes, al inocularlos con estos ooquistes obtenidos de cultivos celulares, mostraron que fueron infectantes.

El desarrollo de *Cryptosporidium* en pulmón fetal humano durante los 3 primeros días de inoculación, fue semejante a lo observado en ratones lactantes inoculados oralmente con ooquistes aislados de humanos. La diferencia se encontró entre los días 4 y 8, período durante el cual el número de parásitos fue mayor en el ratón, tal vez por la presencia de un ciclo autoinfectante. Los ooquistes de pared delgada no se obtuvieron en células de pulmón fetal humano, pero sí se observaron en células endodérmicas de membrana corioalantoidea de embrión de pollo y en enterocitos de ratones infectados experimentales. La mayoría de oo-

quistes de pared gruesa permanecieron en la vacuola parasitófaga, sólo pocos se liberaron al medio de cultivo.

La reiniciación de desarrollo de merogonia por los esporozoitos liberados de los ooquistes autoinfectantes y la presencia de merontes tipo I que reciclan, son hallazgos del ciclo de vida del *Cryptosporidium*, que pueden explicar el porqué un número pequeño de ooquistes es capaz de producir infección grave en hombres y animales susceptibles, sin exposición oral repetida al ooquiste de pared gruesa. También explica que los pacientes inmunodeficientes desarrollen infecciones intestinales persistentes, en ausencia de ingestión oral repetida y porque infecciones severas puedan extenderse al tracto respiratorio y biliar (33).

#### MANIFESTACIONES CLINICAS

La infección se presenta de dos formas diferentes según el estado inmunológico del paciente (26, 27, 28, 34, 35). En huéspedes inmunocompetentes, el período de incubación varía de 3 a 12 días (36) pero el cuadro clínico no es confiable para hacer el diagnóstico, porque es muy variado y puede fluctuar entre una simple indigestión hasta un cuadro de enteritis con diarrea aguda o crónica, con 5 a 10 episodios diarreicos al día, generalmente acuosa pero con moco, sin sangre, y la mayoría de las veces sin leucocitos o con muy pocas formas segmentadas, si no existe asociación con otra infección (35, 37). La diarrea puede ir seguida de constipación (29, 38-40). Los pacientes se quejan de dolores abdominales, ocasionalmente fiebre, cefalea, anorexia, náuseas, vómito y pérdida de peso (41); el quiste puede encontrarse en el vómito (42). Es raro que los pacientes se quejen de astenia o adinamia (43). Generalmente la enfermedad se autolimita en 10 a 14 días, pudiendo alcanzar 18 días o persistir durante más de un mes en una cuarta parte de los pacientes (20, 44), sin requerir terapia o controlándose con el reemplazo adecuado de líquidos y electrolitos (27, 28, 35, 45).

La desaparición de los parásitos ocurre en 4 a 6 semanas (46). El parásito puede verse por algunos días en la materia fecal normal del paciente en la época convalescente (47).

Los ooquistes a menudo se excretan intermitentemente y algunas veces en escasa cantidad; por esto es

posible encontrar más muestras positivas cuando se toma más de una muestra por paciente (45).

La infección puede ser totalmente asintomática en algunos casos, principalmente entre contactos de pacientes sintomáticos (27, 44, 48).

Un buen número de casos reportados se refiere a niños inmunocompetentes con diarrea, especialmente menores de 5 años y en algunas áreas geográficas muchos son lactantes menores (37, 49-52).

La presencia de tos en algunos de los niños con ésta parasitosis, plantea la posibilidad de infección respiratoria concomitante, el ooquiste sería transmitido por el polvo en aerosoles, posteriormente es limpiado por las ciliadas en el árbol traqueobronquial y luego deglutido para llegar al tracto gastro-intestinal (37, 59). Recientemente Harari (53) informó el primer caso de laringotraqueitis en un niño que fue diagnosticado por medio de aspirado traqueal.

En cuanto a otros exámenes que sirven de ayuda, por lo general el número de células blancas totales permanece normal en los pacientes inmunocompetentes (4, 27).

En pacientes inmunocomprometidos por diversas causas, incluyendo los del SIDA (54), puede autolimitarse algunas veces (55,); cuando esto no sucede, la diarrea profusa es crónica, y se produce una enfermedad debilitante con malestar, anorexia y fiebre (57) y también puede causar un síndrome de malabsorción (1,26,58) que compromete seriamente el estado general del huésped, con pérdida de líquidos y electrolitos por el severo cuadro que casi siempre excede de un litro por día, alcanzando hasta 17 litros diarios (10,24,59). Existe pérdida de peso marcada (60) y puede llegar a ser mayor que el 50% del peso inicial del paciente (61). La fisiopatología de la enorme pérdida de líquidos no está clara, pero es posible que se produzca una toxina (59) y que sea semejante a la del cólera (4,27). En algunos ocurren complicaciones pulmonares por diseminación del parásito causando una neumonía tipo intersticial (3,59,62,63).

El hecho de encontrar el ooquiste del parásito dentro de macrófagos alveolares podría sugerir una posible

diseminación hematogena del parásito (59,62) pero ésto aún no está confirmado. En la ciudad de Nueva York se ha informado que la mortalidad de pacientes con SIDA y con cryptosporidiosis intestinal, fue del 50%; y si existía invasión a los pulmones llegaba al 80% (64).

En general *Cryptosporidium* produce diarrea profusa o crónica en pacientes con inmunodeficiencia: hipogamaglobulinemia, terapia inmunosupresora o con defectos en la inmunidad celular, que en algunos casos puede atribuirse o asociarse con desnutrición (37,52,65). En algunos pacientes se ha observado que la diarrea mejora al suspender la terapia inmunosupresora (67).

Los primeros casos publicados, se asociaron con deficiencias de inmunoglobulinas, pero hoy han cobrado mayor importancia los pacientes con SIDA (21, 24, 60, 63, 68, 69, 70, 71). Hay informado un caso de Sida en un niño, con resolución espontánea de una cryptosporidiosis (55), como también un portador asintomático del parásito, con SIDA (72). Se encuentra el caso de una niña con leucemia linfocítica aguda quien recibió tetraciclina y furazolidona durante tres semanas, pero continuó con las muestras positivas; dos semanas después se recuperó y las muestra se negavitizaron (66).

Fletcher y col. (73) informaron de un caso de cryptosporidiosis intestinal en una paciente de 24 años con leve alteración de la función inmune, consistente en disminución de las concentraciones séricas de IgA e IgM. Weisburger y col. (74) encontraron un paciente con trasplante renal con cryptosporidiosis, que tenía deficiencia de IgA y además recibía altas dosis de drogas inmunosupresoras.

Se han reportado casos de colecistitis debida al parásito (21,75) en un paciente con SIDA que tenía cryptosporidiosis gastrointestinal extensa. Se manifestó con colestasis, el paciente además tenía fiebre, dolor abdominal y marcada pérdida de peso. Se encontró el parásito en el área pre-pilórica. Esto puede sugerir la posibilidad de diseminación de la infección. El pronóstico en los pacientes inmunocomprometidos es grave por el hecho de no contar con una droga que sea útil (76).

## DIAGNOSTICO

Puede realizarse con la ayuda de técnicas especiales de coloración, concentración, biopsias y serología, que harán que se encuentre más frecuentemente que lo sospechado en la población general (77).

## COLORACION

Los ooquistes se pueden observar al coprológico en preparaciones con solución salina y lugol, como formas ovoides de pared definida, refringentes y con estructuras granulares internas (78) que no son fáciles de identificar con exactitud cuando son muy escasos en la muestra; parece que la cantidad de parásitos eliminados en materias fecales está relacionada con la severidad de los síntomas (79). Como técnica más precisa se utiliza la coloración para gérmenes ácido-resistentes (1,79, 80), en la que se observan los ooquistes de pared gruesa redondos u ovalados de 3 a 5 micras y teñidos de rojo brillante, sobre un fondo azul, en algunos de los cuales pueden verse los corpúsculos internos teñidos más oscuros que corresponden a los esporozoitos. Es posible distinguir dos tipos de ooquistes, uno liso rosado y otro granular, rojo. (Anexo 1).

Se han ensayado numerosas variaciones de las técnicas para gérmenes ácido-alcohol resistentes, pero todavía no existe unanimidad para recomendar una técnica como la mejor. Una de las modificaciones más usada es la coloración de Ziehl-Neelsen que utiliza el verde de malaquita como contraste de fondo (Anexo 2). Otra es la técnica de Kinyoun (81), semejante a la de Ziehl-Neelsen, pero se reduce el tiempo de coloración a un minuto y se tiñe en frío.

Utilizando microscopio de fluorescencia, se pueden colorear los extendidos con auramina, es un método sensible, rápido y requiere poca manipulación de la muestra (79).

También se ha empleado auramina-carbol fuchsin, pero puede dar falsos positivos, por lo que requiere confirmarse con otra técnica (82). Casemore (42) propone esta última técnica como tamizaje de las muestras, para hacer luego la confirmación por la técnica de Ziehl-Neelsen modificado.

Nichols y Thom (83) fijando las placas con metanol y vapores de formalina, emplearon una coloración con carbol (fenol) auramina, decolorando con alcohol

ácido y como colorante de contraste permanganato de potasio al 0.1%. Los ooquistes se ven sobre un fondo oscuro como discos amarillos con el centro brillante e inclusiones, dentro de un halo pálido.

En las técnicas comunes de ácido-resistencia, algunas veces los ooquistes de los parásitos no toman la carbol-fuchsin (84) o retienen el colorante el 10 - 25% de ellos, (probablemente porque sea la estructura interna, pero no la pared, la que tenga características de ácido-resistencia (66); por éste motivo Baxby y Blundell (84, 85) han usado otras coloraciones, en una de ellas, la primera, se emplea safranina al 1% caliente por un minuto, con la cual los ooquistes se colorean naranja brillante con un halo claro y como colorante de contraste usa azul de metileno 1% o cristal violeta al 0.1% por 30 segundos, para ellos el verde de malaquita no dio buen resultado. Tiene la ventaja de que colorea los ooquistes que no retienen la carbol-fuchsin en las técnicas de Ziehl-Neelsen y no hay posibilidad de confusión con levaduras. Es una técnica más sensible que las de Ziehl-Neelsen, sin embargo los procedimientos de ácido-resistencia son más sensibles que los de ácido-alcohol resistencia y además se puede colorear material incluido en parafina. Los extendidos fijados con HCl al 3% en metanol por 3 a 5 minutos dieron mejores resultados. La otra técnica descrita por los mismos autores, usa azul de metileno al 1% caliente por un minuto y fuchsin básica al 0.05%, 30, segundos fijándolas con metanol ácido o después de calor. Ninguna de las dos técnicas descritas requiere de coloración y ambas colorean todos los ooquistes en material fresco y el 60-80% de éstos, en muestras guardadas durante 5 meses (84).

En un brote de cryptosporidiosis en una colonia de primates en Seattle, el diagnóstico fue realizado por una técnica rápida con dimetil-sulfóxido (modificación de la coloración para ácido-resistencia). Los ooquistes se ven entre rosado brillante y fucsia, en un fondo verde claro. Las partículas que pueden confundirse con ooquistes no se colorean con la misma claridad y brillantez. Los extendidos se pueden deshidratar y montar con laminilla para tenerlas como placas de referencia. Es una técnica menos sensible que la de auramina cuando hay pocos ooquistes (menos de 10) en la placa (86).

Otra técnica que se ha usado es el Giemsa diluido 1:10 en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2

(87), se fijan los extendidos previamente con alcohol metílico y después de colorear se aprecian los ooquistes como estructuras ovoides débilmente teñidos de azul o violeta, que contienen corpúsculos internos rojos más intensamente teñidos (78) que posiblemente corresponden a los esporozoitos y al cuerpo residual del cigote, desafortunadamente con esta técnica se pueden confundir los ooquistes con las levaduras (88).

Current (89) reporta una técnica de tinción negativa con carbol-fuchsina: se mezclan en un porta-objetos iguales volúmenes de materia fecal fresca o fijada con formalina, con carbol-fuchsina (de la coloración de Kinyoun). Después de hacer el extendido, se deja secar al aire, y luego se agrega aceite de inmersión, se cubre con laminilla y se examina con objetivo de 40x. Al hacer la lectura todo se ve oscuro, excepto los ooquistes que se ven brillantes y refráctiles porque contienen agua; la lámina debe ser examinada antes de 10-15 minutos porque se colapsan los parásitos.

Cuando la coloración para gérmenes ácido-alcohol resistentes muestra gérmenes semejantes al *Cryptosporidium* puede verificarse por dos métodos:

1. Cambio de coloración del ooquiste hacia un color rosado cuando se aplica una gota de solución de sucrosa.
2. Utilizando el procedimiento de fluorescencia con auramina rodamina de Truant, que muestra específicamente el ooquiste (3).

Si aún existe la duda, la identidad del organismo, puede ser confirmada por la inoculación de la muestra problema. El material se centrifuga y por medio de una sonda nasogástrica se deposita en el estómago de animales de laboratorio recién nacidos, en ellos se pueden reconocer los diferentes estadios del parásito en las microvellosidades del intestino por histopatología con microscopía electrónica (1, 5).

Pueden usarse para diagnóstico en el laboratorio, muestras de esputo, secreción bronquial, bilis y aspirado duodenal.

Ma y Soave (80) compararon 6 técnicas de coloración, y concluyen que la de Kinyoun modificada es útil para la diferenciación de las levaduras y los ooquistes.

También recomiendan un examen diferencial inicial con yodo, luego la coloración por la técnica de Kinyoun y como método de concentración el de Sheather. García y col. (40) compararon 15 técnicas para detectar ooquistes, encontraron que la coloración de Ziehl-Neelsen modificado con carbol-fuchsina flameada, daba los mejores resultados.

#### Concentración

Las técnicas para concentración de ooquistes en materia fecal como la de Ritchie modificada que usa formol-éter y (90) la de Sheather que usa sucrosa (91, 92), han sido evaluadas encontrándose que son muy similares en efectividad, pero tienen el inconveniente de necesitar mucha manipulación de la muestra para el proceso, lo cual las hace poco recomendables en los casos de SIDA (1, 89, 93, 94).

Heyman (95) describe el uso de columnas de esferas de vidrio para purificar los parásitos después de haberlos recolectado por gradiente de densidad con azúcar, los que se recuperan son antigénicamente activos y suficientemente puros para usarlos en estudios inmunológicos.

Sterling (96, 97) utilizó columnas de celulosa para purificar el parásito y sonicación para aislar la pared; con el producto inmunizó ratones Balb/c.

Pueden purificarse por tratamiento de las heces con alcohol antes de inocularlo en los animales (1).

#### Biopsias

Antes de 1981 la cryptosporidiosis se diagnosticaba por biopsia intestinal (80) observando atrofia de las vellosidades del intestino con hipertrofia de las criptas y aumento del infiltrado celular con linfocitos en el epitelio y la lámina propia, células plasmáticas y pocos eosinófilos; además de la presencia del parásito. A la microscopía electrónica el parásito aparece en diferentes estadios (24, 28, 71), se ve un cuerpo redondeado adherido a los bordes en cepillo de las células epiteliales, o libres en la luz intestinal aislados o formando pequeños racimos. Ocasionalmente se ven abscesos en las criptas, especialmente en yeyuno e íleon.

El microorganismo puede encontrarse en faringe y esófago en el epitelio escamoso y las glándulas salivales.

res menores (98), estómago, intestino delgado, apéndice, colon, vías biliares y páncreas; encontrándose que el área más severamente parasitada es el yeyuno (21, 27, 61).

En infecciones diseminadas los parásitos pueden ser confundidos con artefactos, como vesículas o burbujas apicales de las células epiteliales, especialmente en el colon (71).

En la biopsia rectal se aprecia una proctitis no específica con infiltrado en la lámina propia por células de inflamación aguda y crónica y exudado fibrinoso en la superficie, con células epiteliales cuboidales en reemplazo de las columnares, las células caliciformes muestran disminución de la mucina (2).

En la técnica de hematoxilina-eosina, se ven de color violeta, con la coloración de Giemsa de encuentra más fácilmente porque se define en forma más clara con la coloración de Kinyoun se aprecia rojo y con la técnica de plata metenamina (Grocott) las levaduras se ven negras y el *Cryptosporidium* no se colorea. En materiales de biopsia o autopsia de pulmón e intestino es importante hacer preparaciones de improntas porque los cortes histológicos pueden dar resultados falsos negativos, por la salida de los ooquistes del tejido al hacer los cortes tisulares (3). En las improntas puede confundirse con *Pneumocystis carinii* en coloraciones con Giemsa pero se pueden diferenciar con el método de Kinyoun para *Cryptosporidium* o Gram Weigert (azul toluidina) para *P. carinii* (59).

Los cambios pueden ser reversibles en biopsias tomadas postratamiento, se ve la mucosa normal y ausencia del parásito (67). En una infección prolongada o severa se produce un daño en la mucosa que puede persistir después de suspender el tratamiento presentándose diarrea continua y malabsorción en ausencia del *Cryptosporidium*.

La biopsia se usa cada vez menos por ser un procedimiento invasivo y costoso.

Las muestras se pueden colorear con suero hiperinmune de conejo anti *Cryptosporidium* seguido del conjugado de isotiocinato de fluoresceína con anticuerpos antisuero de conejo, se ven los ooquistes fluorescentes (53).

### Serología

La inmunofluorescencia usada directamente en extendidos de materia fecal da dos tipos de fluorescencia: patrón periférico o difuso (3).

Sterling (96, 97) detectó la infección por el parásito usando un anticuerpo monoclonal que reconoce la pared del ooquiste en inmunofluorescencia directa.

Campbell y Current (99) demostraron también la presencia de anticuerpos circulantes contra *Cryptosporidium* por Inmunofluorescencia indirecta (IFI), en suero de pacientes inmunocompetentes que se recuperaron de la infección y en suero de pacientes con SIDA y cryptosporidiosis persistente, aunque a títulos ligeramente más bajos. Al recuperarse los pacientes, los títulos permanecieron altos por un año. En pacientes con hipogamaglobulinemia e inmunidad celular normal, no se detectaron anticuerpos aunque tenían cryptosporidiosis persistente, lo que sugiere que tanto la inmunidad humoral como la celular son necesarias para controlar la enfermedad. Las reacciones cruzadas con otras Coccidias (*Toxoplasma*, *Sarcocystis* e *Isospora*) son escasas o inexistentes.

Además se han desarrollado técnicas de ELISA que buscan anticuerpos IgG e IgM en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos, con una sensibilidad y especificidad del 95%. Los pacientes con SIDA presentan inicialmente aumento y luego una caída de IgM, posteriormente viene el aumento de IgG. Todos los pacientes con sida y cryptosporidiosis tuvieron títulos para IgG (100).

Con antígeno crudo del parásito preparado con ooquistes puros eliminados por pacientes, se probó la actividad de los linfocitos de sangre periférica, encontrando que los pacientes sin SIDA infectados con *Cryptosporidium* o no y con anticuerpos para el parásito o sin ellos presentaron respuesta normal de inmunidad celular al ser estimulados con Concanavalina A o antígenos específicos, pero los pacientes con SIDA no respondieron normalmente. Parece que la inmunidad mediada por Linfocitos T no juega papel importante en la defensa temprana del huésped contra el parásito (46).

Las personas en contacto con animales infectados hacen seroconversión con títulos bajos, aunque la infección no sea detectable por otros métodos.

La infección puede no dejar inmunidad totalmente protectora, pues repite, pero las infecciones siguientes son más cortas y menos severas que la primera.

En los estudios serológicos que se han realizado, se consideran que son significativos para el diagnóstico los títulos de anticuerpos de 1:40 o mayores.

Con la coloración de inmunoperoxidasa en la biopsia yeyunal de un paciente inmunodeficiente se vió que las células contenían poco IgA e IgG, pero había muchas células en la lámina propia que tenían IgM (98).

Según Casemore (101) primero se elevan IgA e IgM, IgG permanecía baja; por el contrario en algunos de los controles la IgA e IgM estaban bajas; sus hallazgos contrastan con los presentados por Current (102) quien encontró que casi sin excepción la respuesta fue de IgG.

Varios autores mencionan la asociación con *Giardia lamblia* (35, 36, 44, 103, 104). Jokuppii (105) afirma que la cryptosporidiosis es 7 veces más frecuente en pacientes con giardiasis, pero otros (106, 107) afirman que esta asociación no se presenta en todos los países estudiados.

Holley (106) encontró 29 pacientes con *Cryptosporidium* y sólo uno tenía *Giardia lamblia*.

Además de *Giardia lamblia*, algunas veces también se informa la asociación con *Campylobacter* en pacientes inmunocompetentes (101).

En los pacientes inmunodeficientes se ha encontrado asociado con *Toxoplasma gondii* (108), *Pneumocystis carinii* (69), Micobacterias atípicas (59), *Legionella pneumophila* (64), *Citomegalovirus* (14, 65), *Candida albicans* (43, 70) y antígenos de Hepatitis A y B (24).

## TRATAMIENTO

En pacientes inmunocompetentes el episodio de diarrea se autolimita o sólo requieren rehidratación (38, 42, 61).

Para los pacientes con depresión inmune se han ensayado muchas drogas tanto en animales como en humanos y la mayoría no son efectivas (109). Moon

(110) estudió en animales varias drogas antiprotozoos; la única que previno la infección experimental en terneros fue el Lasalocid pero a dosis tan alta que fue tóxica para los animales (Cuadro No.2).

Cuadro No. 2:

### AGENTES ANTIMICROBIANOS INFORMADOS COMO INEFECTIVOS CONTRA LA INFECCION POR CRYPTOSPORIDIUM

(Tomado de Tzipori, 1989. (1))

Drogas ensayadas experimentalmente en:

Terneros - 1982		Ratones - 1982	
Moon y col.		Tzipori y col.	
Amprolio		Etopabate	Nicarbazina
Sulfadimidina		Furaldone	Trinamida
Trimetoprim		Amprolio	Fenamidina
Sulfadoazoma		Zoaquin	Halofuginona
Dimetridazol		Monensin	Salinomicina
Metronidazol		Emtril	Aprinocida
Ipronidazol		Amprolio	Enterolite-N
Quinacrina		Sulfametazina	
Monensin		Sulfaquinoxalina	
Lasalocid			

Drogas usadas para tratar cryptosporidiosis humana

Stemmermann y col.	Weinstein y col.	Sloper y col.
1980	1981	1982
Metronidazol	Sulfisoxazol	Mepacrina
Sulfametoxazol	Pirimetamina	Colistina
Trimetoprim	Metronidazol	Oxitetraciclina
Pirimetamina	Cloroquina	Metronidazol
Sulfadiazina	Primaquina	Piperazina
Levamisol	Loperamida	Tiobendazol
Anfotericina B	Pentamidina	Ampicilina
Colestiramina	Sulfatalidina	Eritromicina
		Penicilina
		Septin
		Gentamicina
		Cloxacilina
		Carbenicilina

El compuesto que se ha mostrado más efectivo en muchos casos, aunque no en todos, es la Espiramicina por lo tanto es la más recomendada (6, 35, 57, 61, 63, 73, 111-115).

La Espiramicina es un antibiótico macrólido, aislado en 1954 de *Streptomyces ambofaciens*. Tiene un espectro similar al de la eritromicina y se ha usado para infecciones bacterianas y toxoplasmosis. Se concentra en la saliva y esta propiedad, puede contribuir en su efectividad cerca de los tejidos secretorios del tracto gastrointestinal. Los efectos adversos de la espiramicina son raros aunque pueden ocurrir: náuseas, vómito, diarrea, dolor epigástrico y colitis aguda. En personas que manejan la droga en la comida de animales, se ha presentado dermatitis alérgica. No se han informado muertes asociadas con la droga.

Con espiramicina puede haber mejoría clínica significativa de la cryptosporidiosis aunque el parásito no desaparezca de la materia fecal. El tratamiento puede llevar a una disminución gradual en el número de ooquistes y en la posible erradicación del parásito. Sin embargo, todavía no ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos (57, 68).

La terapia, además de la espiramicina, debe incluir reposición de líquidos y electrolitos (50), nutrición parenteral (70) y reversión de los factores inmunosupresores que son los que pueden llevarlos a la muerte.

Algunos pacientes presentan buena respuesta al tratamiento con espiramicina a la dosis de 3 a 4 gms diarios en 3 a 4 tomas, durante 3 días en adultos; en niños 500 mg cada 12 horas por tiempo prolongado, con controles periódicos de excreción del parásito (110). Puede garantizarse si el paciente mejora sintomáticamente aunque los ooquistes persistan en materia fecal. La combinación oral de quinina-clindamicina parece ser menos efectiva que la espiramicina en los pocos casos informados.

Otra droga ensayada es el amprolio, que es una base orgánica cuaternaria, coccidiostático. La dosis empleada en un paciente con SIDA fue de 33 mg/kg/día, aumentándola hasta 200 mg/kg/día. La diarrea y el íleo paralítico cedieron en 4 semanas. El parásito no fue totalmente erradicado aunque disminuyó noto-

riamente en fecales. El paciente presentó cardiomiopatía, disquinesia, disartria y reflejos pseudobulbares, por lo que la droga fue suspendida (116).

La furazolidona y la alfa-difluorometilornitina (DFMO) se han encontrado con una posible actividad contra el parásito pues existe remisión de la diarrea en algunos pacientes, sin embargo esto ha sido difícil de evaluar por la posibilidad de que ocurra remisión espontánea (56).

### EPIDEMIOLOGIA

#### Estudios en animales:

Los animales pueden ser fuente potencial de infección para el hombre (143). En el cuadro No. 3 aparecen las especies de animales infectados con *Cryptosporidium*

Se han hecho estudios serológicos por medio de inmunofluorescencia indirecta en 10 especies de animales y se encontraron anticuerpos contra el parásito en más de 80% de los sueros (144).

Es una infección altamente prevalente en el ganado, afecta casi el 100% de los terneros durante a las cuatro primeras semanas de nacidos, pudiendo coexistir con virus y bacterias enteropatógenas (145).

Cuadro No. 3:

ESPECIES DE ANIMALES ENCONTRADAS INFECTADAS CON CRYPTOSPORIDIUM	
Ternero (117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125)	Cerdo (126, 127)
Corderos (128, 129, 130)	Cabras (131, 132)
Potros (133, 134)	Gatos (20, 135, 136)
Perros (20)	Ratón (1)
Cobayo (1)	Conejo (137)
Mono rhesus (138)	Venado (139)
Culebras (140, 141)	Pollos (142)
Perro salvaje australiano (142)	Loro (27)
Pavo real (27)	Pavo común (142)
Gansos (142)	

En la mayoría de brotes de diarrea severa en los que se ha encontrado *Cryptosporidium*, los brotes han tenido múltiple etiología asociándose con Rotavirus, Coronavirus, *E. coli* enterotoxigénico. Si el parásito se encuentra solo, el brote es menos severo y tiene menor mortalidad. La diarrea por *Cryptosporidium* en animales, es con frecuencia una complicación de la diarrea viral (146).

Estudios realizados en animales por Current y col. (147), muestran que son los ooquistes eliminados en las heces los que causan nuevas infecciones. El investigador mencionado produjo infección experimental en terneros, ratones, gatos recién nacidos, cachorros y cabras (1).

El paso secuencial del organismo en ratones es un método útil para mantener la infectividad de los aislamientos (148). La infectividad del parásito puede mantenerse por pases discontinuos entre terneros, manteniendo el inóculo en dicromato de potasio por más de 8 semanas entre los pases; el parásito eliminado por los terneros es también infectante para otros terneros inmediatamente después de ser eliminado sin necesidad de mantener el quiste en alguna sustancia (149).

Los parásitos aislados de terneros con diarrea y luego inoculados en ovejas libres de patógenos específicos, infectan el intestino delgado de todos los animales y en la mitad de ellos también hay colonización en ciego y colon (150).

Heine y col. (145) infectaron terneros genobióticos y normales como controles, con ooquistes decontaminados con ácido peracético. Los animales presentaron debilidad, depresión, anorexia y diarrea; en la autopsia se encontró el parásito en las células epiteliales del intestino delgado y del grueso, más numerosos en el delgado presentando atrofia de las vellosidades, degeneración del epitelio e hiperplasia del epitelio de las criptas. Los terneros que se recuperaron de la infección fueron resistentes al segundo reto con el organismo.

Tzipori y col. (151), produjeron enterocolitis severa cuando infectaron cerdos con inóculos purificados, en los cuales se destruyeron otros patógenos diferentes al *Cryptosporidium*, esto puede ser una evidencia de que el parásito actúa como enteropatógeno primario en ausencia de otra flora entérica. Cuando los inoculó al 7 día de nacidos, presentaron diarrea moderada y

los inoculados a los 15 días de edad presentaron infección subclínica. El período de incubación fue de 1 a 4 días. En los cerdos de 3 días o menos, todo el intestino estaba severamente infectado, la mucosa edematizada con infiltrado celular, en los infectados a los 7 días o mayores, el intestino delgado superior presentó infección leve, pero el íleon y el intestino grueso estaban severamente parasitados con daño en la mucosa, el epitelio estaba reemplazado por enterocitos inmaduros (86).

Después de infectar experimentalmente cerdos, Tzipori (152) afirma que hay correlación entre la extensión de la infección intestinal, el grado de daño de la mucosa y la severidad de la infección clínica inducida por *Cryptosporidium* aislado de terneros con diarrea.

Cuando se infectan experimentalmente ovejas recién nacidas con el parásito aislado de terneros con diarrea, las ovejas presentan diarrea muy severa con lesiones importantes en el intestino delgado y grueso, siendo el íleon terminal la porción más afectada, allí se observa atrofia de vellosidades con fusión de puentes epiteliales entre las vellosidades. Si se infectan entre el 5 día y el 20 de nacidas, los signos clínicos de enfermedad son menores y la diarrea es intermitente, pero tienen retardo del crecimiento. Infectándolos a los 30 días no presentan signos clínicos de enfermedad, ni retardo del crecimiento (153).

#### *Estudios en humanos:*

##### *Transmisión del animal a los humanos:*

Puede decirse que es una zoonosis de prevalencia desconocida en el humano, sin especificidad de huésped (5).

La transmisión de animales a personas es más probable estando en contacto con animales enfermos que excretan ooquistes (21, 154).

En Dinamarca estudios de Holten-Andersen y col. (155), muestran que es causa importante de diarrea, con porcentaje de 1.25% al estudiar 800 pacientes, siendo más frecuente en personas que manejan animales.

En un estudio realizado en Bangladesh en terneros, fueron positivos el 14% de los que tenían diarrea y

sólo el 1% de los asintomáticos. En este estudio también se mostró que las personas que manejan animales tenían mayor riesgo de padecer diarrea (156).

Anderson y col. (157) informan el caso de un estudiante de veterinaria que contrajo la enfermedad después de estar en contacto con terneros con diarrea.

Se presentó infección por *Cryptosporidium* en 12 personas inmunocompetentes que habían tenido contacto directo con terneros infectados, en tres brotes de infección entre terneros, no relacionados entre sí (147).

#### *Transmisión experimental del humano al animal*

La transmisión del hombre al animal en el laboratorio, ha sido exitosa, se producen los mismos cambios en el intestino (143). Los ooquistes aislados de personas inmunodeficientes inoculados en cachorros, gatos recién nacidos y cabras les producen diarrea (147).

Tzipori (148) inoculó ovejas libres de patógenos específicos con *Cryptosporidium* obtenido de un paciente adulto con diarrea, los animales presentaron enteritis, los cambios en la mucosa del intestino delgado eran menos severos que los inducidos experimentalmente en ovejas inoculadas con aislamientos obtenidos de otras ovejas y terneros. A pesar de estos resultados deben realizarse más estudios con otros aislamientos humanos para determinar si la oveja sirve como modelo animal para ensayos con drogas.

#### *Transmisión persona a persona:*

Aunque se considera una zoonosis, hay evidencia de que la diseminación persona a persona es importante (48, 111, 112). Esta puede realizarse por contacto directo (89) o indirecto por medio de superficies, comida o agua contaminadas con materia fecal (1, 76, 155, 158) y puede presentarse en el medio hospitalario (159, 160).

Durante relaciones sexuales de tipo oro-anal puede haber transmisión especialmente en homosexuales (3, 26).

Blagburn (76) informa la infección con *Cryptosporidium* en un investigador, que comenzó con los sínto-

mas cinco días después de un accidente en el laboratorio y luego presentó recuperación al noveno día, esto demuestra que el manejo de las muestras es peligroso y debe hacerse con cuidado.

Hay casos de diarrea de viajeros producida por *Cryptosporidium* (43, 48, 104, 105, 155, 161) y brotes en guarderías (162-165) lo que está a favor de la contaminación ora-fecal y hace evidente la transmisión persona a persona, y por lo tanto es posible que se llegue a presentar diarrea epidémica (49, 146).

Por datos recolectados en Inglaterra (113) se ha visto que el *Cryptosporidium* es al menos tan importante como *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* o *Escherichia coli*, lo que lleva a pensar nuevamente que es indispensable buscarlo rutinariamente en casos de gastroenteritis infantil. En un estudio realizado entre abril/84 a marzo de 1985 se encontró que era el segundo enteropatógeno no viral, más común en niños con gastroenteritis.

Aunque es un patógeno muy importante en SIDA, hay conocimiento amplio de su importancia en pacientes con otras formas de inmunodeficiencia (56, 72, 166). Richter (44) afirma que es una causa relativamente común de diarrea no viral.

#### *Viabilidad del ooquiste*

El ooquiste pierde su actividad en las siguientes condiciones: al ser congelado independientemente del medio en que se encuentre preservado, y a 65°C por 30' (26). Para esterilizar el material contaminado, debe usarse el autoclave (93). Hay pérdida progresiva de la infectividad en todos los medios a 4°C, no es infectante después de dejarlo dos meses en agua destilada y la infectividad se pierde totalmente en 2 semanas entre 15 y 20°C y en 5 días a 37°C (167).

Se ha demostrado que el ooquiste es resistente a muchas de las sustancias desinfectantes comúnmente usadas en los laboratorios, se ha probado la actividad de iodóforos al 4%, ácido cresílico 3%, gluteraldehído puro, hipoclorito de sodio al 2 y al 5%, cloruro de benzalconio al 5%, amonio a menos del 5%, formaldehído al 10%, hidróxido de sodio 0.02M. Sólo el amonio al 5% o formol salina al 10% fueron efectivos para destruir la viabilidad del ooquiste (168).

Hay estudios en que soluciones de materia fecal de bovinos con parásitos tratadas con dos desinfectantes a base de aldehído, a temperatura ambiente y a concentraciones recomendadas para destruir un amplio rango de patógenos; no matan el *Cryptosporidium* pues infecta ratones libres de patógenos (169).

El almacenamiento de ooquistes en solución de dicromato de potasio al 2.5% a temperatura ambiente mantiene su capacidad infectante por seis semanas, a 4°C por 16 semanas. La materia fecal con ooquistes mantenida en dicromato de potasio a 4°C a permitido que estos se recuperen viables después de un período de 12 meses (33). Puede mantenerse también en PBS a 4°C durando viable 4 a 6 meses. El ensayo de mantenimiento por congelación con varios crioprotectores no ha tenido éxito (170).

En medio anaerobio se mantiene viable por 8 ó 9 meses, la desenquistación ocurre poco después de ser expuesto al aire.

#### *Estudios de frecuencia en diferentes poblaciones humanas:*

Se han realizado múltiples estudios relacionados con la frecuencia de la cryptosporidiosis y se ha visto que aunque la cryptosporidiosis es un problema importante en los países en desarrollo (171) también lo es en países desarrollados (86).

En Inglaterra Wright (172) no encontró diferencias entre la frecuencia del parásito en la zona urbana y la zona rural.

Casemore y Jackson (173) estudiaron 500 muestras de pacientes con diarrea y encontraron una positividad del 1.4%: 2.8% de los pacientes eran menores de 16 años y 0.34% adultos.

Hunt (39) informa un brote en una comunidad urbana en el cual el 5% de 867 personas que consultaron al hospital por síntomas gastrointestinales, tenían cryptosporidiosis, 329 de esos pacientes eran niños y de ellos 24 (7%) fueron positivos, no habían tenido contacto con animales y no se pudo establecer una asociación con una fuente de agua común.

Hart y col. (113) en 1983 encontraron que de 5.242 niños con gastroenteritis de Liverpool, Inglaterra, 1.4% tuvieron cryptosporidiosis, algunos de ellos te-

nían diferentes formas de inmunodeficiencia. Encontraron casos positivos entre familiares cercanos; todos tuvieron diarrea que duró dos semanas aproximadamente.

Arnaud-Battandier y col. (174) en una zona rural de Francia, realizaron un estudio de 200 muestras de materia fecal de 190 niños. Encontraron 4 muestras positivas (2.1%); la materia fecal tenía moco pero no sangre. Las muestra también fueron evaluadas para Rotavirus, bacterias (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* y *Yersinia*) y *Candida albicans*: sólo dos muestras fueron positivas para *Candida*, y todas negativas para Rotavirus y bacterias. Todos los contactos familiares fueron negativos para *Cryptosporidium*.

En Filandia, Jokippii y col.(43) encontraron que de 1422 muestras de materia fecal enviadas al laboratorio para procedimientos especiales 154, o sea el 9.1% contenían ooquistes, correspondiendo aproximadamente al 1% del total de los pacientes, todos eran adultos y en la mayoría se pudo asociar el comienzo de la enfermedad, con un viaje a Leningrado.

Jokippii y col (36) hicieron un estudio prospectivo en 34 estudiantes que viajaban a Lennigrado, al regreso 7 tenían cryptosporidiosis, 4 giardiasis y dos personas

Cuadro No. 4:

#### FRECUENCIA DE CRYPTOSPORIDIUM EN LA ETIOLOGIA DE LA DIARREA

Inglaterra	1.4 o/o
Francia	2.1 o/o
Tailandia	3.2 o/o
Bangladesh	4.3 o/o
Africa Central	10.4 o/o
Liberia	7.9 o/o
Estados Unidos	1.4 o/o
Canadá	1.2 o/o
Costa Rica	4.0 o/o
Brasil	8.0 o/o
Venezuela	4.0 o/o
Colombia 1985	2.5 o/o
1986	4.0 o/o

ambas parasitosis, aunque evitaron tomar agua corriente. El grupo control constituido por personas que no viajaron fueron asintomáticos.

En Australia, Tzipori (143) ha informado que de 884 pacientes con gastroenteritis entre 1981 y 1982, el 4.1% excretaban *Cryptosporidium* en su materia fecal y no encontró ningún individuo asintomático con muestra positiva. La infección en niños fue mayor (4.8%) que en los adultos (1.6%). La prevalencia fue más alta en verano y otoño.

En el Hospital de Ann Arbor Michigan, U.S.A., se recogieron 1752 muestras fecales, blandas o líquidas y fueron procesadas por la técnica de ácido resistencia con dimetil sulfóxido. 63 muestras de 53 pacientes fueron positivas. Algunos de los pacientes positivos habían sido hospitalizados por enfermedad coronaria, asma, cetoacidosis diabética, linfoma, colitis ulcerativa, endocarditis, etc. Uno de los pacientes fue un niño de 3 días de nacido que fue positivo, su madre tuvo diarrea algunos días antes del parto. Otros pacientes que sólo presentaban dolor abdominal, en el lavado duodenal se encontró el parásito (159).

En el estudio de Wolfson y col. (35) observaron que el mayor número de casos tenía una edad por debajo de los 4 años y entre los 30 y los 39 años; pocos fueron los casos en menores de un año.

En Texas hay un informe de un brote por agua contaminada durante julio de 1984, con un porcentaje de infección del 34%, estudiaron muestras de materia fecal y se realizaron pruebas serológicas en la población general del área (175).

En Canadá fueron examinadas 7300 muestras de materia fecal de personas con gastroenteritis y se encontraron 46 positivas es decir, el 0.63%. La mayoría vivían en el área urbana, eran menores de 6 años, 6 de ellos tenían historia de contacto con animales y la mayoría se encontraron durante el verano (176). En otro estudio realizado en Canadá (177) se examinaron 2252 muestras, 19 tenían el parásito, correspondían al 1.2% de los pacientes, 18 de ellos estaban con gastroenteritis. En éste grupo la mayoría fueron niños y el *Cryptosporidium* fue el segundo patógeno después de *G. lamblia*.

En Blangadesh (37) 28 pacientes de 578 fueron positivos por una técnica de ácido-resistencia y 38

pacientes por la técnica de Giemsa, la identificación se hizo al observar huecos vacíos o "fantasmas" con el centro débilmente teñido de azul y con corpúsculos rojos o violeta. El 4.3% de los pacientes con diarrea fueron positivos, más frecuente en niños y en pacientes que tenían sobreagregada.

En las diferentes coloraciones pueden apreciarse huecos vacíos o "fantasmas" que corresponden a las paredes de los oocistos vacíos que se eliminan durante la fase de resolución de la enfermedad (86, 160).

En el sur de la India recientemente se encontró que la parasitosis fue más frecuente en los niños controles sanos menores de 6 meses, que en otros niños con diarrea aguda, especialmente en niños que habían recibido antibióticos o tenían episodios prolongados de diarrea (178).

En Bangkok por el contrario, encontraron el parásito en 13 casos de 410 muestras (3.2%), procedentes de niños con diarrea y sólo 1 positiva 410 niños que fueron controles. De los 13 niños positivos, 6 además de *Cryptosporidium* tenían otros patógenos (179). En Liberia (180) la positividad fue de 7.9%.

Los informes de Africa Central (52) indican que el 10.4% de los niños y el 3% de los adultos tenían *Cryptosporidium*. Todos estos pacientes eran sintomáticos y muchos casos se asociaron con severa desnutrición.

En Rwanda en 1984 buscaron *Cryptosporidium* en niños con sarampión y los autores (181) sugieren que existe correlación entre *Cryptosporidium* y la diarrea que acompaña al sarampión. Los pacientes excretaron el parásito en la fase aguda de la respuesta celular inmune.

En 1982, Mata y col. (26, 87, 182) en Costa Rica encontraron el parásito en 4.4% de los casos de diarrea aguda en niños del área urbana, los casos se presentaron durante el primer año de vida, mientras que en el área rural la frecuencia fue de 4.2% presentándose durante el segundo año. Esto lo relacionan con la costumbre de lactancia materna.

En niños peruanos con diarrea, se encontró que el 7.7% de ellos tenía *Cryptosporidium* en la materia fecal (55).

En Venezuela (183) de 120 niños inmunocompetentes el 4.3% fueron positivos.

En Brasil (51) se tomaron muestras fecales de niños con diarrea que se mantuvieron congeladas durante un período de 2 a 4 años, después fueron examinadas para *Cryptosporidium* encontrando 9 de 139 muestras, positivas (8%). En otro estudio realizado en una zona de nivel socio-económico bajo, Loureiro (184) encontró 3 casos positivos en 94 muestras diarreicas correspondientes a 61 niños, todos los controles fueron negativos.

Según Serwada (185) en un informe sobre pacientes con enfermedad de adelgazamiento que se presenta en Uganda y sus alrededores, con un cuadro clínicamente semejante al SIDA, muy asociado con HTLV-III y raramente asociado con Sarcoma de Kaposi; que tiene grupos de riesgo diferentes a los de SIDA, ninguno de sus pacientes con esta entidad, presentaba cryptosporidiosis. Posteriormente Marquat (186) informó de 2 casos de ésta parasitosis entre 12 pacientes de Kampala con dicha enfermedad.

Richter y col. (44) encontraron 62 pacientes inmunocompetentes con cryptosporidiosis, el 47% eran niños de 0 a 4 años y el 32% adultos de 30 a 39 años.

En varios estudios se han tomado controles (pacientes sin diarrea) sin encontrar casos positivos (4, 143, 182).

Nichols y Thom (83) examinaron 800 muestras fecales sin seleccionarlas. Encontraron 14 positivas de 7 pacientes con diarrea y 3 personas asintomáticas. Según Casemore (101) los sujetos que inicialmente fueron reportados como asintomáticos, en entrevistas personales posteriores referían síntomas leves.

La frecuencia encontrada en la población general, en materias fecales diarreicas en Medellín (Colombia),

en donde no seleccionaron ni edades ni pacientes fue de 2.5% (7, 8, 9).

En un estudio realizado por los autores en Medellín en 1986 (187), los resultados revelaron que el 4.0% de los niños con diarrea y el 3.6% de 110 pacientes inmunocomprometidos tenían cryptosporidiosis. Todos los contactos familiares de los pacientes positivos y los controles (niños adultos sin síntomas gastrointestinales ni inmunocompromiso), fueron negativos. De 65 animales estudiados con o sin diarrea, se encontraron positivos un caballo y una gallina sin diarrea y 2 cerdos de 3 semanas de edad con diarrea.

Aunque la cryptosporidiosis asintomática aparece raramente (36), puede detectarse por estudios hechos en personal hospitalario que han tenido a su cargo pacientes con cryptosporidiosis (34,188).

No se han encontrado diferencias por sexo, pero si variación estacional presentándose en primavera tardía y en verano, meses cálidos y húmedos pudiendo aumentar la prevalencia hasta al 25% (26, 44, 48, 87, 143, 157, 182).

Así como hay quienes creen que es una enfermedad común y la búsqueda del parásito debe ser rutinaria (179, 189), hay quienes opinan que no es necesario hacerlo por el costo que implica y por la falta de eficacia de los tratamientos que se han usado, creen que sólo debe buscarse en pacientes que tengan diarrea y esten en contacto con animales, en brotes de diarrea en guarderías o en pacientes con SIDA (190).

Antes de instituir la búsqueda de *Cryptosporidium* como una técnica de rutina en un laboratorio, deben hacerse estudios locales ya que se han visto grandes variaciones en la frecuencia de la infección en pacientes inmunocompetentes en diferentes regiones y según las variaciones climáticas, pero en los pacientes inmunocomprometidos la búsqueda debe ser rutinaria (107).

## ANEXO 1

### *COLORACION DE ZIEHL-NEELSEN EN FRIO (78):*

Se cubre la placa con carbol-fucshina (3 gm de fucshina básica en 100 ml de alcohol etílico al 95%, 10 ml de solución acuosa de fenol al 5%, 90 ml) por 3 a 5 minutos. Se lava con agua corriente. Se decolora con alcohol-ácido al 3%. (3 ml de HCl con alcohol etílico al 95%, se lleva a volumen de 100 ml).

Se lava con agua corriente. Contracoloración con azul de metileno (0.3 gms en 100 mlts de agua destilada) por 20 a 30 segundos. Se lava con agua corriente y se seca a temperatura ambiente.

## ANEXO 2

### *COLORACION DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADA (43):*

Carbol fucshina concentrada (Merck 1398, 206; 1 gm de fucshina, 10 ml de etanol, 90 mlts de fenol al 5%) durante 20 minutos, 2 minutos de lavado con agua corriente, ácido sulfúrico al 7% para decolorar, 2 minutos de lavado con agua corriente, contracoloración con verde de malaquita al 5% (Merck 1398; 5.0 gms de verde de malaquita, 100 mlts de etanol al 10%), 1 minuto de lavado con agua corriente. Secado a temperatura ambiente.

## BIBLIOGRAFIA

1. Tzipori S.: Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microb Rev.* 1983; 47: 84.
2. Nime FA, Burek JD, Page DL, et al.: Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroent.* 1976; 70: 592.
3. Ma P.: Laboratory diagnosis of Coccidiosis in *Microbiology*, 1984. Leive, L., Schlessinger, D.: American Society for Microbiology. Washington D.C. 1984; pg. 224-231.
4. Blacklow NR, Wolfson JS.: A six-year-olds girl with diarrhea after exposure to animals. *N Eng J Med.* 1985; 313: 805.
5. Tzipori S, Angus KW, Gray EW, et al.: Vomiting and diarrhea associated with Cryptosporidial infection. *N Eng J Med.* 1980; 303: 818.
6. DuPont H.: Cryptosporidiosis and the healthy host. *N Eng J Med.* 1985; 312: 1319.
7. Angel VE, Franco L, Jaramillo JC, et al.: *Cryptosporidiosis* una nueva parasitosis causante de diarrea. *Acta Med Col.* 1986; 11: 41.
8. Angel VE, Franco L, Jaramillo JC, et al.: Cryptosporidiosis en Medellín. Prevalencia de *Cryptosporidium* en muestras fecales diarreicas en 6 laboratorios de Medellín. Estudio de 10 casos. *Biomédica* 1985; 5: 53.
9. Angel VE, Franco L, Jaramillo JC, et al.: Prevalencia de Cryptosporidiosis en muestras fecales diarreicas de Medellín. Estudio de 10 casos. *Boletín No. 3 de la Sociedad Colombiana de Medicina Tropical y Parasitología.* 1985.
10. Achultz MG.: Emerging zoonoses. *N Eng J Med.* 1983; 308: 1285.
11. Levine ND, Corliss JD, Cox FEG, et al.: A newly revised classification of the Protozoa. *J Parasit.* 1980; 27: 37.
12. Garza D.: Diarrhea caused by a coccidian parasite, *Cryptosporidium*. *Laborat Med.* 1983; 14: 283.
13. Bird RG, Smith MD.: Cryptosporidiosis in man: parasite life cycle and fine structural pathology. *J Path.* 1980; 132: 217.
14. Weinstein L, Edelstein SM, Madara JL, et al.: Intestinal cryptosporidiosis complicated by disseminated Cytomegalovirus infection. *Gastroent.* 1981; 81: 584.
15. Hallak A, Yust I, Ratan Y, et al.: Malabsorption syndrome, coccidiosis, combined immunodeficiency and fulminant lymphoproliferative disease. *Arch Int Med.* 1982; 142: 196.
16. Liebman WM, Thaler MM, De Lorimier A, et al.: Intractable diarrhea of infancy due to intestinal coccidiosis. *Gastroent.* 1980; 78: 579.
17. De Hovitz JA, Pape JW, Boncy M, et al.: Clinical manifestations and therapy of *Isospora belli* infection in patients with Acquired immunodeficiency syndrome. *N Eng J Med.* 1986; 315: 87.

## CRYPTOSPORIDIOSIS

18. Tzipori S, Angus KW, Campbell I, Gray EW, et al.: *Cryptosporidium*: Evidence for a single species-genus. *Infect Imm.* 1980; 30 : 884.
19. Upton SJ, Current W.: The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *J Parasit.* 1985; 71 : 625.
20. Current WL.: Human enteric Coccidia. I. *Cryptosporidium*. *Clin Microb Newsletter.* 1985; 7 : 167.
21. Guarda LA, Stan S, Cleary KA, Ordóñez N.: Human cryptosporidiosis in AIDS. *Arch Path Lab Med.* 1983; 107 : 562.
22. Brigham, Marcial MA, Madara JL.: *Cryptosporidium* cellular localization and structural analysis of absorptive cell parasite membrane interactions. *Gastroent.* 1985; 88 : 1489.
23. Hampton JC, Rosario B.: The attachment of Protozoan parasites to intestinal epithelial cells of the mouse. *J Parasit.* 1966; 52 : 939.
24. Petras R, Carey W, Alanis A.: Cryptosporidial enteritis in a homosexual male with AIDS. *Cleve Clin Q.* 1983; 50 : 41
25. Current WL, Reese NC.: A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J Protozool.* 1986; 31 : 98.
26. Urbina A, Mata L, Rojas JC.: Cryptosporidiosis: Una zoonosis de reciente interés. *Adel. Microbiol. Enf. Infecc.* 1984; 3 : 159.
27. Navin T, Juranek D.: Cryptosporidiosis: Clinical, epidemiologic and parasitologic reviews. *Rev Inf Dis.* 1984; 6 : 313.
28. Pitlik S, Fainstain V, Garza D, Guarda L, Bolivar R, Rios A, Hopfer R, Mansell P.: Human Cryptosporidiosis: Spectrum of disease. Report of six cases and review of literature. *Arch Int Med.* 1983; 143 : 2269.
29. Reese NC, Current WL, Ernst JV, et al.: Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats. *Am J Trop Med Hyg.* 1982; 31 : 226.
30. Reeduker DW, Speer CA, Blixt, JA.: Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy. *J Protozool.* 1985; 32 : 708.
31. Soave R.: *Cryptosporidium* interaction with human epithelial cells and macrophages. Abstracts of the 1984; ICAAC No. 322 pag 147.
32. Current W, Long P.: Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. *J Inf dis.* 1983; 148 : 1108.
33. Current W, Haynes TB.: Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science.* 1984; 224 : 603.
34. González C, Reyes E, Conde CJ, Calderón, E.: Cryptosporidiosis. *Infectología Año V* 1985; : 140.
35. Wolfson J, Richter JM, Waldron MA, Weber DJ, Mc Carthy DM, Hopkins C.: Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *N Eng J Med.* 1985; 1278.
36. Jokipii AM, Hemila M, Jokipii L.: Prospective study of acquisition of *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* and gastrointestinal illness. *Lancet II* 1985; : 487.
37. Shahid NS, Rahman ASMH, Anderson BC, Mata LJ, Sanyal SC.: Cryptosporidiosis in Bangladesh. *British Med J.* 1985; 290 : 114.
38. Isaacs D, Hunt GH, Phillips AD, Price EH, Raafat F, Walker SA.: Cryptosporidiosis in immunocompetent children. *J Clin Pat.* 1985; 38 : 76.
39. Hunt DA, Shannon R, Palmer SR, Jephcott AE.: Cryptosporidiosis in an urban community. *British Med J.* 1984; 289 : 814.
40. García L, Bruckner DA, Brewer TC, Shimizu RY.: Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J Clin Microb.* 1983; 18 : 185.
41. Botero D, Restrepo M.: Cryptosporidiosis en Parasitosis Humanas. CIB, Medellín. 1985.
42. Casemore DP, Armstrong M, Sands RL.: Laboratory diagnosis of Cryptosporidiosis. *J. Clin Path.* 1985; 38 : 1337.
43. Jokipii L, Pohjola S, Jokipii AM.: *Cryptosporidium*: a frequent finding in patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet II* 1983; : 358.
44. Richter JM, Wolfson JS, Waldron MA, et al.: Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *Gastroent* 88 Part 2 of 2. 1985.
45. Babb RR, Differding JT, Trollope ML.: Cryptosporidial enteritis in a healthy professional athlete. *Am J Gastroent.* 1982; 177 : 833.
46. Soave R, Ma, P.: Cryptosporidiosis in the immunocompetent host. Abstracts of the 1984 ICAAC No. 616, pag 194.
47. Holley HP, Dover C.: *Cryptosporidium* A common cause of parasitic diarrhea in otherwise healthy individuals. *J Infect Dis.* 1986; 153 : 365.
48. Soave R, Ma P.: Traveler's diarrhea in two families. *Arch Int Med.* 1985; 145 : 70.
49. Baxby D, Hart CA.: Cryptosporidiosis. *Brith Med J.* 1984; 289 : 1148.
50. Mata L, Bolaños H, Pizarro, D, Vives M.: Cryptosporidiosis in children from some highland Costa Rica rural and urban areas. *Am J Med Hyg.* 1984; 33 : 24.

51. Weikel CS, Johnston LI, De Souza MA, Guerrant RL.: *Cryptosporidium* in Northeastern Brasil: Association with sporadic diarrhea. J Inf Dis. 1985; 151 : 963.
52. Boagaerts J, Lepage P, Rouvroy D, Vandepitte J.: *Cryptosporidium* sp. a frequent cause of diarrhea in Central Africa. J Clin Microb. 1984; 20 : 874.
53. Harari MD, West B, Dwyer B.: *Cryptosporidium* a cause of laringotracheitis in an infant. Lancet. 1986; I : 1207.
54. Macher AB, Reichter ChM.: *Cryptosporidium* and other enteric pathogens. The pathologic findings associated with opportunistic infections, Chapter 8 in: AIDS: A basic guide for clinicians. Saunders Co. Philadelphia, 1985.
55. Berkowitz CD, Seidel JS.: Spontaneous resolution of cryptosporidiosis in a child with A.I.D.S. Am J Dis Chil. 1985; 139 : 967.
56. Armstrong D, Gold JWM, dryjanski J, Whimbey S, Polsky B, Howkins C, Brown AE, Bernard E, Kielin T.: Treatment of infections patients with AIDS. Am Int Med. 1985; 103 : 738.
57. Portnoy D, Whiteside M, Buckley E, McLeod C.: Treatment of intestinal Cryptosporidiosis with Spiramycin. Ann Int Med. 1984 101 : 202.
58. Sloper KS, Dourmashkin RR, Bird RB, et al.: Chronic malabsorption due to cryptosporidiosis in a child with immunoglobulin deficiency. Case report. Gut. 1982; 23 : 80.
59. Ma P, Villanueva T, Kaufman D, Gillooley J.: Respiratory Cryptosporidiosis in the AIDS. Use of modified cold Kinoun and Hemacolor stains for rapid diagnoses. JAMA. 1984; 252 : 1298.
60. Cooper DA, Wodak A, Marriot DJE, et al.: Cryptosporidiosis in the AIDS. Path. 1984; 16 : 455.
61. Anonymus.: Cryptosporidiosis. Lancet. 1984; I : 492-493.
62. Forgacs P, Tarshis A, Ma P, Federman M, Mele L, Silverman M, Shea SA.: Intestinal and bronchial Cryptosporidiosis in an immunodeficient homosexual man. Ann Int Med. 1983; 99 : 793.
63. Miller RA, Wasserheit Jn, Kiriara J, Cyle MR.: Detection of *Cryptosporidium* oocysts in septum during screening for Mycobacteria. J Clin Microb. 1984; 20 : 1192.
64. Ma P, Kaufman D, Tsaihong J, et al.: Intestinal and respiratory Cryptosporidiosis in AIDS. (Individuals from N.Y. areas). Abstracts of 1984 ICAAC, pag 100, No 61. A.S.M.
65. Andreani T, Charpentier YL, Brovet JC, Lachaces JR, Modigliani R, Galion A, Liance M, Messing B, Vernisse B.: Acquired immunodeficiency with intestinal Cryptosporidiosis: possible transmission by haitian whole blood. Lancet. 1983; I : 1187.
66. Miller RA, Holmberg RE, Clausen CR.: Life threatening diarrhea caused by *Cryptosporidium* in a child undergoing therapy for acute lymphocytic leukemia. J Ped. 1983; 103 : 256.
67. Meisel JL, Pereraeligno C, Rubin C.E.: Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. Gastroent. 1976; 70 : 1156.
68. Whiteside M, Barkin J, May RG, Weiss SD, Fischl MA, McLeod, C.: Enteric coccidiosis among patients with AIDS. Am J Trop Med Hyg. 1984; 33 : 1065.
69. Modigliani R, Bories C, Charpentier LE.: Diarrhea and malabsorption in AIDS. Gut. 1985; 26 : 179.
70. Koch KL, Shavenkey V, Weinstein G, et al.: Cryptosporidiosis in a patient with Haemophilia, common variable Hypogammaglobulinemia and the AIDS. Ann Int Med. 1983; 99 : 337.
71. Soave R, Danner R, Hong C, et al.: Cryptosporidiosis in homosexual men. Ann Int Med. 1984; 100 : 504.
72. Zar F, Geiseber PJ, Brown VA.: Asymptomatic carriage of *Cryptosporidium* in the stool of a patient with AIDS. J Inf Dis. 1985; 151 : 195.
73. Fletcher A, Sims TA, Talbot JC.: Cryptosporidial enteritis without general or selective immune deficiency. Brit Med J. 1982; 285 : 22.
74. Weisburger WR, Hutcheon DF, Yardley SH, et al.: Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal-transplant recipient with IgA deficiency. Am J Clin Path. 1974; 72 : 473.
75. Pitlik SD, Fainstein V, Rios A, et al.: Cryptosporidial cholecystitis. N Eng J Med. 1985; 308 : 967.
76. Blagburn B, Current W.: Accidental infection of a researcher with human cryptosporidiosis. JIDIAQ. 1983; 148 : 772.
77. White WL, Picolo J.: Human Cryptosporidiosis. New Eng J Med. 1983; 309 : 1325.
78. Lennette E.: Manual of Clinical Microbiology. A.S.M. Fourth Edition. 1985.
79. Payne P, Lancaster L, Heizman M, Mc Cutchon JA.: Identification of *Cryptosporidium* in patients with AIDS. N Eng J Med. 1983; 309 : 613.
80. Ma O, Soave R.: Three-stool examination for *Cryptosporidium* in ten homosexual men with protracted watery diarrhea. J Inf Dis. 1983; 147 : 824.
81. Center of Disease Control. Hank's modification of Kinoun's modified acid fast stain (Nocardia stain), in Laboratory methods in medical mycology. Third edit. pg 100-101.

## CRYPTOSPORIDIOSIS

82. Casemore, DP, Armstrong D, Jackson B.: Screening for *Cryptosporidium* in stools, Lancet. 1984; I : 734.
83. Nicholls G, Thom B.T.: Screening for *Cryptosporidium* in stools. Lancet. 1984; I : 735.
84. Baxby, D, Blundell N.: Sensitive, rapid, simple methods for detectiong *Cryptosporidium* in faeces. Lancet. 1983; II : 1149.
85. Baxvy D, Blundell N, Hart CA.: The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. J Hyg Camb. 1984; 92 : 317.
86. Bronson MA.: Rapid dimethyl sulfoxide modified acid-fast stain of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. J Clin Microb. 1984; 19 : 952.
87. Mata L, Bolaños H, Pizarro D, et al.: Cryptosporidiosis en niños de Costa Rica: Estudio transversal y longitudinal. Rev Biolog Trop. 1984; 32 : 129.
88. Angus K, Campbell I, Gray W, et al.: Staining of fecal yeast and *Cryptosporidium* oocysts. Vet Rec. 1981; 1108 : 173.
89. Current W.: Human Cryptosporidiosis. N Eng J Med. 1983; 309 : 1326.
90. Ritchie LS.: An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Bull. U.S. Army Med Dept. 1984; 8 : 326.
91. Levine ND.: Protozoan parasites of domestic animals and of man. 2 Edit. Burgers Pub Co. 1973; pag 385.
92. Anderson BC.: Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. JAVMA 1981; 178 : 982.
93. Weber J, Philip S.: Human Cryptosporidiosis. N Engl J Med. 1983; 309 : 1326.
94. Mac Nabb SJN, Hensel D, et al.: Comparision of sedimentation and flotation techniques for identification of *Cryptosporidium* in a large outbreak of human dierrhea. J Clin Microb. 1985; 22 : 587.
95. Heyman MB, Shigekuni LK, Ammann J.: Separation of *Cryptosporidium* oocysts from fecal debris by density gradient centrifugation and glass bead columns. J Clin Microb. 1986; 23 : 789.
96. Sterlig CA, Arrowood MJ.: Detection of *Cryptosporidium* infection using a monoclonal antibody recognizing an oocysts determinant in direct immunofluorescent assay. Abstracts of the Joint meeting of the Royal and American Societies of Tropical Medicine and Hygiene No.339. Baltimore Dec. 1984; 2.
97. Sterling CR, Arrowood MJ.: Detection of *Cryptosporidium* sp. infections using a direct immunofluorescent assay. Ped Inf Dis. 1986; 6 : S139.
98. Clinico-pathological Conference: immunodeficiency and Cryptosporidiosis: demostration at the Royal College of Physicians of London. Immunodeficiency and cryptosporjdiosis. Brith Med J. 1980; 281 : 1123.
99. Campbell P, Current W.: Demostration of serum antibodies to *Cryptosporidium* sp. in normal and immunodeficient human with confirmed infections. J Clin Microbil. 1983; 18 : 165.
100. Ungar BLP, Soave R, Fayer R, et al.: Enzyme Immunoassay detection of IgM and IgG antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. J Inf Dis. 1986; 153 : 570.
101. Casemore DP, Sands RL, Curry A.: *Cryptosporidium* species a "new" human pathogen. J Clin Path. 1985. 38 : 1321.
102. Current WL, *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis of domestic animals and man. Proceedings of International Symposium on Noenatal diarrhoea. Saskatoon, Canada: Veterinary Infectious Diseases organisation. 1983; 293.
103. Wolfson JS, Hopkins CC, Weber DJ, et al.: An association between *Cryptosporidium* and *Giardia* in stool. N Eng J Med. 1984; 302 : 788.
104. Jokipii A, Jokipii L.: Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. N Eng J Med. 1985; 313 : 1020.
105. Jokipii L, Pohjola S, Jokipii AMM.: Cryptosporidiosis associated with traveling and Giardiasis. Gastroent 1985; 89 : 838.
106. Holley P, Dover C.: Cryptosporiosis in immunocompete patients. N Eng J Med. 1985; 313: 1019.
107. Wolfson J, Richter J, Waldron MA, et al: Cryptosporidiosis in immunocompetent patientes. N Engl J Med 1985; 313 : 1020.
108. Stemmerman GN, Hayashi T, Glocber GA, Oish N, Frenkel R.: Cryptosporidiosis: report of a fatal case complicated by disseminated toxoplasmosis. Am J Med. 1980; 69 : 37.
109. Kammerer WS.: Intestinal parasities, in Conn's Current Therapy, 1985; Edit Conn, H.F. et al pag 413.
110. Moon HW, Woode GN, Ahrens FA.: Attempted chemoprophylaxis of Cryptosporidiosis in calves. Vet Rec. 1982; 110 : 181.
111. Whiteside M, McLeod F, Scott.: Update treatment of *Cryptosporidium* in patients with AIDS JAMA 1984; 251 : 1661.

112. Collier AC, Miller RA, Meyers JD.: Cryptosporidiosis after marrow transplantation: person to person transmission and treatment with spiramycin. *Ann Int Med.* 1984; 101 : 205.
113. Hart A, Baxby D.: Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *N Engl J Med.* 1985; 313 : 1018.
114. Centers of Disease Control. Cryptosporidiosis: Assesment of chemotherapy of males with AIDS/ *MMWR.* 1982; 31 : 589.
115. Centers of Disease Control. Update: Treatment of Cryptosporidiosis in patients with acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)/ *MMWR.* 1984; 33 : 117.
116. Veldhuyzen Van Zanten SJO, Lange JMA, Saverwein HP, et al.: Amprolium for Coccidiosis in AIDS. *Lancet.* 1984; II : 345.
117. Panciera RJ, Thomassen RW, Garner FM.: Cryptosporidial infection in a calf. *Vet Path.* 1971; 8 : 479.
118. Meuten DJ, Van Kruiningen HJ, Lein BH.: Cryptosporidiosis in a calf. *JAVMA.* 1974; 165 : 914.
119. Schmitz JA, Smith DA.: *Cryptosporidium* infection in a calf. *JAVMA.* 1975; 167 : 731.
120. Pohlenz J, Moon HW, Cheville NI, et al.: Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves. *JAVMA.* 1978; 172 : 452.
121. Pearson GR, Logan F.: Demonstration of *Cryptosporidium* in the small intestine of a calf by light transmission electron and scanning electron microscopy. *Vet Rec.* 1978; 103 : 212.
122. Pohlenz J, Bemrick WJ, Moon HW, et al.: Bovine cryptosporidiosis: A transmission and scanning electron microscopic study of some stages in the life cycle and of the host parasite relationship. *Vet Pathol.* 1978; 15 : 417.
123. Snodgrass DR, Angus KW, Gray EW, et al.: Cryptosporidia associated with rotavirus and *Escherichia coli* in an outbreak of calf scour. *Vet Rec.* 1080; 106 : 458.
124. Tzipori S, Campbell I, Sherwood, et al.: An outbreak of calf diarrhoea attributed to cryptosporidial infection. *Vet Rec.* 1080; 107 : 579.
125. Jerret IV, Snodgrass DR.: Cryptosporidia associated with outbreaks of neonatal calf diarrhea. *Aust Vet.* 1981; 57 : 434.
126. Kennedy GA, Kreitnert GL, Strafus AC.: Cryptosporidiosis in three pigs. *JAVMA.* 1977; 170 : 348.
127. Links IJ.: Cryptosporidial infection of piglets. *Aust Vet J.* 1982; 58 : 60.
128. Berg IE, Peterson AC, Freeman TP.: Ovine Cryptosporidiosis. *JAVMA.* 1978; 173 : 1585.
129. Tzipori S, Angus KW, Campbell J, et al.: Diarrhea due to *Cryptosporidium* infection in artificially reared lambs. *J Clin Microbiol.* 1981; 14 : 100.
130. Angus KW, Appleyand WT, Menszier JD, et al.: An outbreak of diarrhoea associated with cryptosporidiosis in naturally reared lambs. *Vet Rec.* 1982; 110 : 129.
131. Mason RW, Hartley WJ, THL.: Intestinal cryptosporidiosis in a kid goat. *Aust Vet J.* 1981; 57 : 386.
132. Tzipori S, Larsen J, Smith M, et al.: Diarrhoea in goat kids attributed to *Cryptosporidium* infections. *Vet Rec.* 1982; 111 : 35.
133. Snyder SP, England IJ, Mc Chesney E.: Cryptosporidiosis in immunodeficient arabian foals. *Vet Path.* 1978; 15 : 12.
134. Gajadhar AA, Cason JP, Aller JR.: Cryptosporidiosis in two foals. *Can Vet J.* 1985; 26 : 132.
135. Poonacha KB, Pippin C.: Intestinal cryptosporidiosis in a cat. *Vet Path.* 1982; 19 : 708.
136. Bennet M, Baxby D, Blundell N. et al.: Cryptosporidiosis in the domestic cat. *Vet Rec.* 1985; 116 : 73.
137. Imman LR, Takeuchi A. : Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. *Vet Path.* 1979; 16 : 89.
138. Kovatch RM, White JD.: Cryptosporidiosis in two juvenile Rhesus monkeys. *Vet Path.* 1972; 9 : 426.
139. Tzipori S, Angus KW, Campbell I, et al.: Diarrhea in young red deer associated with infection with *Cryptosporidium*. *J Inf Dis.* 1981; 144 : 170.
140. Brownstein DG, Strandberg JD, Mortali RJ, et al.: *Cryptosporidium* in snakes with hypertrophic gastritis. *Vet Path.* 1977; 14 : 606.
141. Mc Kenzie RA, Greer PE, Hartley WJ, et al.: *Cryptosporidium* in a red-bellied black snake (*Psuedochis perphyriacus*). *Aust Vet J.* 1978; 54 : 365.
142. Hoerr FJ, Ranck FM, Hastings JF.: Respiratory cryptosporidiosis in turkeys. *JAVMA.* 1978; 173 : 159.
143. Tzipori S, Smith M, Birch C, Barnes G, Bishopp R.: Cryptosporidiosis in hospital patients with gastroenteritis., *Am J Trop Med Hyg.* 1983; 32 : 931.
144. Tzipori S, Campbell I.: Prevalence of *Cryptosporidium* Antibodies in 10 animal species. *J Clin Microb.* 1981; 4 : 455.
145. Heine J, Pohlenz J, Moon HW, et al.: Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium sp* *J Infect Dis.* 1984; 150 : 768.
146. Angus KW.: Cryptosporidiosis in man domestic animals and birds: a review. *J. Roy Soc of Med.* 1983; 76 : 62.

## CRYPTOSPORIDIOSIS

147. Current W, Reese N, Ernst JV, Bailey W, Heyman MB, Weinstein WM.: Human Cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. Studies of an outbreak and experimental transmission. *N Engl J Med.* 1983; 308 : 1252.
148. Tzipori S, Angus KW, Campbell I, et al.: Experimental infection of lambs with *Cryptosporidium* isolate from human patient with diarrhea. *Gut.* 1982; 23 : 71.
149. Moon HW, Bermick WJ.: Fecal transmission of calf *Cryptosporidium* between calves and pigs. *Vet Path.* 1981; 18 : 248.
150. Angus KW, Tzipori S, Gray EW.: Intestinal lesions in specific pathogen-free lambs associated with a *Cryptosporidium* from calves with diarrhea. *Vet Path.* 1982; 19 : 67.
151. Tzipori S, Smith M, Makin T, et al.: Enterocolitis in piglets caused by *Cryptosporidium sp* purified from calf faeces. *Vet Parasit.* 1982; 11 : 121.
152. Tzipore S, Mc Cartney E, Lawson GHK, et al.: Experimental infection of piglets with *Cryptosporidium*. *Res Vet Science.* 1981; 31 : 358.
153. Tzipore S, Anger KW, Gray EW, Campbell I, et al.: Diarrhea in lambs experimentally infected with *Cryptosporidium* isolated from calves. *Am J Vet Res.* 1981; 42 : 1400.
154. Center of Disease Control: Human Cryptosporidiosis-Alabama. *MMWR.* 1982; 31 : 252.
155. Holten-Andersen WH, Gerstoft J, Henriksen SA.: Human Cryptosporidiosis. *N Eng J Med.* 1983; 309 : 1325.
156. Rahman ASMH, Sanyal SC, Al Mahmud kA, et al.: Cryptosporidiosis in calves and their handlers in Bangladesh. *Lancet.* 1984; II : 221.
157. Anderson BC, Donndelinger T, Wilkins M, Smith, J.: Cryptosporidiosis in a veterinary student *JAVMA.* 1982; 180 : 408.
158. Sterling CR, Seegar K, Sinclair NA.: *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea *J Inf Dis* 1986; 153 :380.
159. Baxby D, Hart CA, Taylor C.: Human cryptosporidiosis: a possible case of hospital cross infection. *Brit Med J.* 1983; 287 : 1760.
160. Dryjanski J, Gold JWM, Ritchie MT, et al.: Cryptosporidiosis: Case report in a health team worker. *Am J Med.* 1986; 80 : 751.
161. Ma P, kaufman DL, Helmick C, D'Souza AJ, Navin T.: Cryptosporidiosis in tourists returning from the Caribbean. *N Engl J Med.* 1985; 312 : 647.
162. Bossen A, Britt EM.: Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *N Eng J of Med.* 1985; 313 : 10.
163. Taylor JP, Perdue JN, Dingley D, Gustafson TL, Patterson M, Reed LA.: Cryptosporidiosis outbreak in a day care-center. *Arc J Dis Chil.* 1985; 139 : 1023.
164. Center of Disease Control: Cryptosporidiosis among children attending day-care centers. Georgia, Pennsylvania, Michigan, California, New Mexico: *MMWR.* 3 : 599-601.
165. Albert G, Bell LM, Kirkpatrick CE, et al.: Cryptosporidiosis in a day care-center. *N Eng J Med.* 1985; 311 : 860.
166. Willie AJ.: Cryptosporidiosis. *Brit Med J.* 1985; 289 : 1383.
167. Sherwood D, Angus KW, Snodgrass G, et al.: Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. *Infect Imm.* 1982; 38 : 471-475.
168. Campbell I, Tzipori S, Hutchison G, et al.: Effect of disinfectants on survival *Cryptosporidium* oocysts. *Vet Rec.* 1982; 111 : 414.
169. Angus KW, Sherwood D, Hutchison G, et al.: Evaluation of the effect of two aldehyde based disinfectants on the infectivity of faecal cryptosporidia for mice. *Res. Vet Sci.* 1982; 33 : 379.
170. Rolston KVI, Fainstein V.: Cryptosporidiosis. *Eur J Clin Microbiol.* 1986; 135.
171. Albert MJ.: Significance of *Cryptosporidium* and other enteric pathogens in developing countries. *Lancet.* 1986; I : 921.
172. Wright PA, Harrinson JM, Byrom I.: Cryptosporidiosis. *Brith Med J.* 1984; 289 : 1148.
173. Casemore DP, Jackson B.: Sporadic Cryptosporidiosis in children. *Lancet.* 1983; II : 679.
174. Arnaud-Battandier F, Naciri M, Maurage C.: Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *N Eng J Med.* 1985; 313 : 1019.
175. D'Antonio RG, Winn RE, Taylor JP, et al.: A waterborne outbreak of Cryptosporidiosis in normal hosts. *Ann Int Med.* 1985; 103 : 886.
176. Montessori GA, Bischoff L.: Cryptosporidiosis: a cause of summer diarrhea in children. *Can Med Assoc J.* 11985; 132 : 1285.
177. Ratnam S, Paddock J, Mc Donald E, et al.: Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples submitted for routine microbiological examination. *J Clin Microb.* 1985; 22 : 402.

178. Mathan MM, George R, Vankatesan S, et al.: *Cryptosporidium* and diarrhoea in Southern Indian children. Lancet. 1985; II : 1172.
179. Taylor DN, Echeverria P.: When does *Cryptosporidium* Cause diarrhea? Lancet. 1986; I : 320.
180. Hojlyng N, Molbak K, Jepsen S.: Cryptosporidiosis in Liberian children. Lancet. 1984; I : 734.
181. De mol P, Mukasheme S, Bogaerts J, et al.: Cryptosporidiosis related to measles diarrhoea in Rwanda. Lancet. 1984; II : 43.
182. Urbina A, Mata L, Pizarro D.: Criptosporidiosis en niños de Costa Rica. Cuadro clínico, variación estacionaal y tratamiento. Acta Med Costarricense. 1984; 27 : 191.
183. Perez-Schael I, Boher Y, Mata L, Perez M, Tapia FJ.: Cryptosporidiosis in Venezuelan children with acute diarrhea. Am J Trop Med Hyg. 1985; 34 : 721.
184. Loureiro ECB, Linhares A, Mata L.: Acute diarrhoea associated with *Cryptosporidium* sp. in Belem, Brazil. (preliminary report). Rev. Inst Med Trop Sao Paulo. 1986; 28 : 138.
185. Serwadda D, Sewankambo NK, Carswell JW, et al.: Slim disease: A new disease in Uganda and it's association with HTLV III infection. Lancet. 1985; II : 849.
186. Marquat KH, Muller HAG, Sailer J, et al.: Slim disease (AIDS): Lancet. 1985; II : 1186.
187. Vásquez IH, Restrepo M, Botero D.: Cryptosporidiosis: Estudio en pacientes inmunocompetentes, inmunosuprimidos y en animales en Medellín, Colombia. En preparación para publicación.
188. Koch K, Phillips D, Aber R, Current W.: Cryptosporidiosis in Hospital personnel. Evidence for person to person transmission. Ann Int Med. 1985; 102 : 593.
189. Holley HP, Dover C.: Cryptosporidiosis identified in a prospective study of stool samples submitted for parasitologic examination. Abstracts of the 1984; ICAAC 615 : 194.
190. Du Pont H.: Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. N Eng J Med. 1985; 313 : 1020.