

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

INCIDENCIA DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS EN PACIENTES AFECTOS  
DE GASTROENTERITIS. RESULTADOS DE UN AÑO Y MEDIO DE  
ESTUDIO.

Tesina realizada por  
Dña Roser Fisa Saladrigas  
para optar al Grado de L  
cenciatura.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701739063

Al presentar este trabajo quiero expresar mi más sincero reconocimiento en primer lugar al Prof. Dr D. Guillermo Prats Pastor, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital de la Sta Creu i Sant Pau, al haber aceptado mi estancia en dicho Servicio, su constante apoyo durante la realización de este trabajo y todos los consejos y enseñanzas que de él he recibido.

A la Dra. Montserrat Portús Vinyeta, Prof. Titular de Parasitología de la Facultad de Farmacia de Barcelona y Adjunto del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital de la Sta Creu i Sant Pau, quien ha dirigido el presente trabajo y me ha dispensado su ayuda incondicional.

A la Dra. Dña Esperanza Llorens del Servicio de Pediatría del ya mencionado Hospital por su paciente labor en la localización de los enfermos, seguimiento clínico de los mismos e información de ella recibida acerca su patología.

A mis compañeros de trabajo, especialmente a Dña. Cristina Riera Lizandra y a Dña. Teresa Serra Farell sin cuya colaboración difícilmente hubiera podido concluir este trabajo; por su ayuda desinteresada, entusiasmo, confianza y amistad que en todo momento me han mostrado.

A todos los miembros del Servicio de Microbiología por la comprensión, afecto y amistad que me han dispensado durante mi permanencia en el Servicio.

A mis amigos que en todo momento me han animado en mi trabajo, y a mi familia que siempre ha estado a mi lado.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Guillermo Prats Pastor', written in a cursive style.

## I N D I C E

	pg.
I. PARTE TEORICA .....	1
I. 1. <u>EL AGENTE ETIOLOGICO DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS</u>	
<u>HUMANA</u> .....	2
I. 1. 1. POSICION TAXONOMICA .....	2
I. 1. 2. CICLO EVOLUTIVO .....	5
I. 2. <u>CRITOSPORIDIOSIS</u> .....	9
I. 2. 1. EPIDEMIOLOGIA .....	9
I. 2. 1. 1. Forma de transmisión .....	9
I. 2. 1. 2. Reservorios .....	11
I. 2. 1. 3. Prevalencia .....	12
I. 2. 2. PATOLOGIA .....	16
I. 2. 3. DIAGNOSTICO BIOLOGICO .....	19
I. 2. 3. 1. <u>Diagnóstico parasitológico</u> ...	19
I. 2. 3. 1. 1. Fijación .....	20
I. 2. 3. 1. 2. Coloración .....	20
I. 2. 3. 1. 3. Concentración .....	21
I. 2. 3. 1. 4. Microscopía electrónica	23
I. 2. 3. 2. <u>Exámen histopatológico</u> .....	23
I. 2. 3. 3. <u>Inoculación animal</u> .....	24
I. 2. 3. 4. <u>Reacciones inmunológicas</u> .....	24
I. 2. 4. TRATAMIENTO .....	26
II. PARTE EXPERIMENTAL .....	29
II. 0. <u>OBJETIVO DEL TRABAJO</u> .....	30
II. 1. <u>MATERIAL Y METODOS</u> .....	31
II. 1. 1. FIJACION DE LA MUESTRA .....	31
II. 1. 2. CONCENTRACION DE LA MUESTRA .....	32

II. 1. 3.	PREPARACION DE LOS FROTIS FECALES ..	33
II. 1. 4.	TINCIONES .....	34
II. 1. 4. 1.	Ziehl-Neelsen modificado ..	35
II. 1. 4. 2.	Giemsa .....	36
II. 1. 4. 3.	Auramina .....	37
II. 1. 5.	CUANTIFICACION DE LOS RESULTADOS ...	38
II. 2.	<u>RESULTADOS DEL EXAMEN FECAL</u> .....	40
II. 2. 1.	ANALISIS COPROPARASITOLOGICO .....	40
II. 2. 2.	ESTUDIO COMPARATIVO DE OTRAS PAUTAS DE TRABAJO .....	41
II. 2. 2. 1.	Utilidad del examen directo.	41
II. 2. 2. 2.	Tinción de Giemsa .....	43
II. 2. 2. 3.	Tinción con auramina .....	46
II. 2. 3.	EXAMEN DE OTROS ENTEROPATOGENOS ....	49
II. 2. 4.	RELACION ENTRE LA INFESTACION POR <u>CRYPTOSPORIDIUM</u> Y LA SINTOMATOLOGIA DEL ENFERMO .....	51
II. 3.	<u>ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO</u> .....	60
II. 3. 1.	INFLUENCIA DE LA EDAD .....	60
II. 3. 2.	INFLUENCIA DEL SEXO .....	60
II. 3. 3.	EVOLUCION ANUAL .....	64
II. 3. 4.	PROCEDENCIA DEL PACIENTE .....	64
II. 4.	<u>MANIFESTACIONES CLINICAS</u> .....	68
III.	DISCUSION .....	72
IV.	CONCLUSIONES .....	81
V.	BIBLIOGRAFIA .....	85

## I. PARTE TEORICA

## I. 1. EL AGENTE ETIOLOGICO DE LA CRIPTOSPORIDIASIS HUMANA

### I. 1. 1. POSICION TAXONOMICA

Phyllum	-	PROTOZOA
Subphyllum	-	APICOMPLEXA
Clase	-	SPOROZOA
Subclase	-	COCCIDIA
Orden	-	EUCOCCIDA
Famflia	-	CRYPTOSPORIDIIDAE
Género	-	<u>Cryptosporidium</u>

El género Cryptosporidium fue creado por TYZZER en 1907 al describir a Cryptosporidium muris como parásito gástrico del ratón de laboratorio. A partir de este momento la descripción de nuevas especies de Cryptosporidium fue frecuente, entre las cuales MATA et al (1984) señalan :

- C. muris TYZZER, 1907, parásito del ratón
- C. parvum TYZZER, 1912, parásito del ratón
- C. meleagridis SLAVIN, 1955, parásito del pavo
- C. wrairi VETTERLING et al, 1971, parásito del cobayo
- C. anserinum PROCTOR y KEMP, 1974, parásito del ganso
- C. bovis BARKER y CARBONELL, 1974, parásito del ternero
- C. agni BARKER y CARBONELL, 1974, parásito de la oveja
- C. rhesi LEVINE, 1980, parásito del mono rhesus
- C. serpentis LEVINE, 1980, parásito de serpientes

TZIPORI et al (1980) realizan estudios de transmisión cruzada de una cepa de Cryptosporidium de procedencia bovina y llegan a la conclusión de que dicho género debe considerarse como monoespecífico, hasta que LEVINE (1984) al efectuar una revisión de los datos publicados hasta el momento, preferentemente de los obtenidos por diversos autores a través de la infestación experimental de diversas especies animales con aislamientos de procedencia distinta, concluye aceptando la existencia de cuatro especies, en función de sus huéspedes habituales :

Cryptosporidium crotali TRIFFIT, 1928, parásito de reptiles  
Cryptosporidium meleagridis SLAVIN, 1955, parásito de aves  
Cryptosporidium muris TYZZER, 1907, parásito de mamíferos  
Cryptosporidium nasorum HOOVER, HOERR, CARLTON, HUSMAN y FERGUSON, 1981, parásito de peces

Recientemente UPTON y CURRENT (1985) señalan el hallazgo en terneros de dos formas de Cryptosporidium con evidentes diferencias morfológicas, una que, según los autores, corresponde a la especie descrita por TYZZER en 1907 como C. muris y la otra correspondiente a C. parvum, TYZZER 1912, perteneciendo a esta última la casi totalidad de los aislamientos efectuados a partir de mamíferos, entre ellos el hombre.

Ambas especies difieren tanto por su tamaño, forma de los oocistos y cuerpo residual como por su hábitat en el hospedador infestado (Figura nº1 , Tabla nº1).

	<u>C. muris</u> TYZZER 1907	<u>C. parvum</u> TYZZER 1912
Tamaño ooquiste	7.4 x 5.6 $\mu\text{m}$	5 x 4.5 $\mu\text{m}$
Sutura ooquiste	polar-longitudinal	subterminal-transversal
Cuerpo residual	formado por un glóbulo oval o esférico de 3,4 x 3,3 $\mu\text{m}$ rodeado por 2-40 gránulos de 0,2-1,3 $\mu\text{m}$ .	formado por un glóbulo oval o esférico de 1.5 x 1,6 $\mu\text{m}$ y numerosos gránulos de 0.2 a 1.2 $\mu\text{m}$ .
Esporozoítos	vermiformes (11.1 x 1) sin cuerpos refráctiles	alargados (4.9 x 1.2 $\mu\text{m}$ ) sin cuerpos refráctiles.
Hábitat	glándulas gástricas.	intestino delgado
Bóvidos infectados	animales de todas las edades, preferentemente adultos jóvenes.	terneros de < 21 días
Patología	diarreas benignas	diarreas agudas

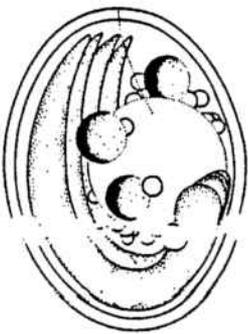
C. murisC. parvum

Tabla nº 1, Figura nº 1. - Principales diferencias entre las dos especies parásitas de mamíferos. (Adaptado de UPTON y CURRENT, 1985)

## I. 1. 2. CICLO EVOLUTIVO

El ciclo biológico de *Cryptosporidium* ha sido objeto de amplio estudio y discusión durante los últimos años. En la excelente revisión realizada por TZIPORI en 1983 sobre la Criptosporidiosis animal y humana, el autor discute las distintas versiones del mismo publicadas hasta la fecha y propone el esquema que se representa en la figura 2.

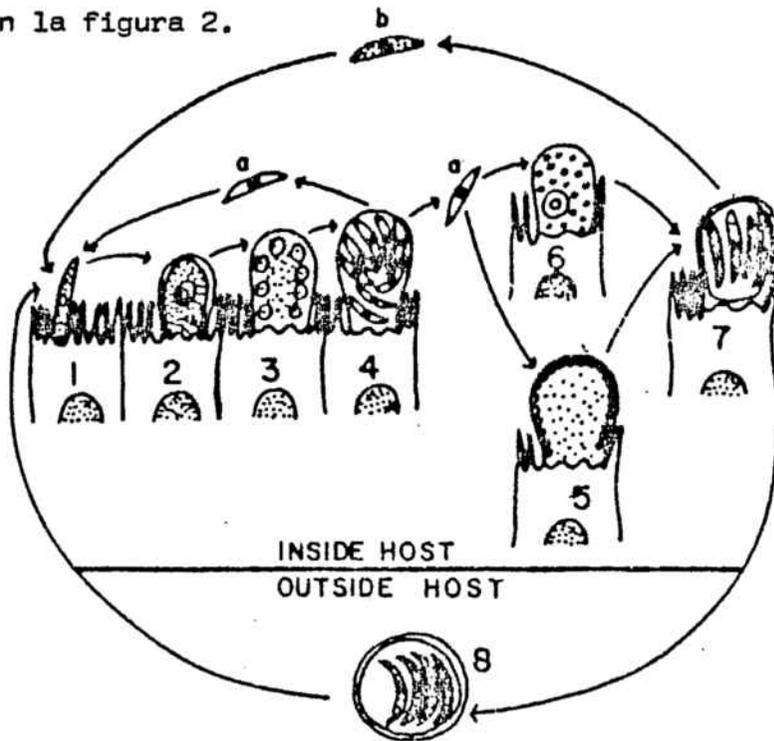


FIG. 2 Diagrammatic representation of the life cycle of *Cryptosporidium*. (1 to 4) Asexual cycle of the endogenous stage: 1, sporozoite or merozoite invading a microvillus of a small intestinal epithelial cell; 2, a fully grown trophozoite, 3, a developing schizont with eight nuclei; 4, a mature schizont with eight merozoites. (5 and 6) Sexual cycle: 5, microgametocyte with many nuclei; 6, macrogametocyte. (7) A mature oocyst containing four sporozoites without sporocyst. (8) Oocyst discharged in the feces. a, Merozoite released from mature schizont; b, sporozoite released from mature oocyst. Adapted from Isaki.

En el mismo queda por aclarar la existencia o no de una segunda generación de esquizontes y el carácter intra o extracelular del parásito.

CURRENT y LONG (1983) logran reproducir el ciclo completo del parásito en las células endodérmicas de la membrana corioalantoidea de embriones de pollo, deduciendo del mismo el esquema de la figura 3.

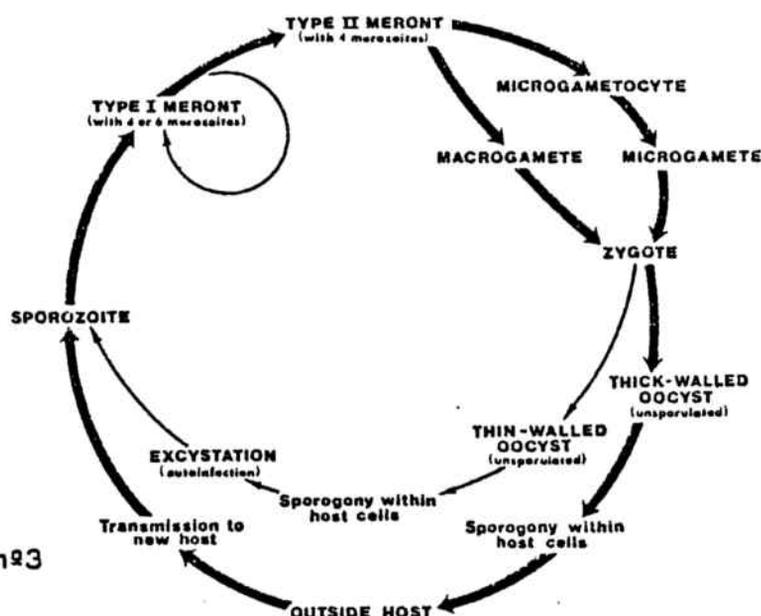


Figura nº3

El ciclo se inicia con la excistación de los esporozoítos con penetración de las células endodérmicas de la MCA (membrana corioalantoidea) y desarrollo de una primera generación de merozoítos, que se detecta ya a las 24 h. post-inoculación. Dichos merozoítos son denominados de tipo I y presentan carácter cíclico. Estos, y las subsiguientes formas evolutivas del parásito, se desarrollan en el interior de una vacuola parasitofora originada por la célula hospedadora y confinada a su superficie microvillar. De aquí que el parásito sea considerado como "intracelular-extracito plasmático" (CURRENT, 1984).

Entre las 24-48 h. post-inoculación se inicia el desarrollo de los merontes tipo II que se transforman rápidamente en gametocitos. A los tres días se observa la presencia ya de todos los estadios evolutivos del ciclo ( trofozoítos, merontes de tipo I y tipo II, microgametocitos, macrogametos y ooquistes ). La esporogonia tiene lugar en el interior de la célula huésped.

El alto potencial autoinfectivo de Cryptosporidium es el resultado no sólo de la presencia de los merozoítos de tipo I con carácter cíclico sino de la existencia de dos clases de ooquistes , unos dotados de gruesas paredes, con alta capacidad de resistencia a los agentes externos y destinados a la contaminación ambiental e infestación de nuevos huéspedes, y otros, de paredes delgadas destinados a la autoinfección endógena del hospedador y reinicio del ciclo. Todo ello explica tanto las elevadas tasas de infestación que se observan en los animales susceptibles, la larga prolongación de la parasitosis, fundamentalmente en inmunodeprimidos (PITLIK et al, 1983; CURRENT et al, 1983) así como las infestaciones graves del conducto biliar y tracto respiratorio que esporádicamente tienen lugar en estos últimos (PITLIK et al, 1983; FORGACS et al, 1983; MILLER et al, 1984; CURRENT y HAYNES, 1984). Si bien la presencia de ooquistes de pared fina ha podido ser demostrada en cultivos en embrión de pollo y ratón lactante (CURRENT y LONG, 1983; CURRENT, 1984), no ha sido así al reproducir el ciclo "in vitro" en cultivo monocapa de células pulmonares de feto humano (Flow 2000), en las cuales, si bien se obtuvo un ciclo evolutivo similar al descrito, no fue posible la observación de ooquistes autoinfectivos (CURRENT y HAYNES, 1984).

La esporogonia, en ambos tipos de ooquistes, tiene lugar en la misma célula hospedadora, siendo infestantes tanto en el momento de su eliminación por parte del huésped parasitado, como durante su permanencia en la luz intestinal. CURRENT y LONG (1983) logran la infestación masiva de ratones lactantes a partir de los ooquistes obtenidos de MCA, lo que demuestra su infectividad aún en el interior de la célula hospedadora, lo cual había sido ya señalado por REESE et al (1982) al lograr la transmisión experimental de Cryptosporidium a través de la administración oral de raspados de mucosa intestinal de animales parasitados.

## I. 2. CRIPТОSPORIDIOSIS

### I. 2. 1. EPIDEMIOLOGIA

A pesar de que Cryptosporidium sea un protozoo cuyo conocimiento date de más de tres cuartos de siglo, su importancia en patología animal y humana ha sido descubierta muy recientemente. Es por ello que el conocimiento de su epidemiología sea todavía muy fraccionario, existiendo muchas lagunas en lo que hace referencia a la forma de transmisión, fuentes de infestación y reservorios, lo mismo que a la biogeografía y prevalencia de la infestación, tanto animal como humana.

#### I. 2. 1. 1. Forma de transmisión

Los primeros casos de criptosporidiosis humana que se diagnosticaron, ocurridos casi siempre en personas en estrecho contacto con animales (Morbidity and Mortality, 1982; ANDERSON et al, 1982; REESE et al, 1982; CURRENT et al 1983) hizo suponer que se trataba de una zoonosis, en la cual la transmisión directa a partir de animales infestados, entre los cuales jugaban un importante papel los terneros, era la vía principal de infestación (SCHULTZ, 1983).

Evidentemente la necesidad de empleo de técnicas agresivas, para el diagnóstico etiológico de la enfermedad humana, sesgó enormemente el tipo de población estudiada, dificultando además el estudio y por lo tanto conocimiento, de su epidemiología. Consider-

ramos que los avances realizados, fundamentalmente durante los últimos años, en el conocimiento de esta enfermedad, han sido la consecuencia de dos hechos importantes :

- a) El descubrimiento de que Cryptosporidium era la causa de cuadros graves de gastroenteritis en individuos inmunodeficientes (MEISEL et al, 1976; NIME et al, 1976; STEMMERMANN et al, 1979; PITLIK et al, 1983; MA y SOAVE, 1983; CURRENT et al, 1983).
- b) La introducción de técnicas diagnósticas que permiten el hallazgo e identificación del protozoo en las heces, lo cual facilita el estudio epidemiológico (GARCIA et al, 1983).

A parte de las denuncias realizadas sobre casos de criptosporidiosis de supuesto origen animal, cada día hay mayor evidencia de que es éste un enteropatógeno, con una epidemiología que podemos considerar similar a la de otros protozoos de distribución cosmopolita, para los cuales la transmisión se realiza bien sea por contacto directo con reservorios animales o a través de la contaminación ambiental, alimenticia, telúrica o hídrica.

La concomitancia entre la infestación humana por Cryptosporidium y Giardia ha sido repetidamente denunciada (WOLFSON et al, 1984; JOKIPII et al, 1985; PORTUS et al, 1985) lo que hace suponer una vía de infestación común para ambos protozoos. La denuncia de infecciones intrahospitalarias de personal de enfermería y auxiliar en contacto con enfermos con criptosporidiosis (BAXBY et al, 1983; KOCH et al, 1985) lo mismo que infecciones de tipo familiar y epidemias de tipo institucional fundamentalmente en guarderías infantiles (ALPERT et al, 1984; McNABB et al, 1985; PORTUS et al, 1985), hace suponer que la transmisión hombre-hombre pueda

jugar un importante papel en la difusión de la enfermedad.

La reciente denuncia de un brote de criptosporidiosis en una población de Tejas, cuya causa se supone que la constituyó el agua de bebida (D'ANTONIO et al, 1985), incluye a éste entre los organismos de transmisión hídrica capaces de originar brotes epidémicos de gastroenteritis. La transmisión por vía hídrica, t<sub>er</sub>rástica y/o alimenticia es lógica si tenemos en cuenta la alta resistencia que presentan los ooquistes de Cryptosporidium a muchos de los agentes desinfectantes en uso. Así, si bien el parásito se muestra sensible al amonio y al formol (CAMPBELL et al, 1982) es resistente a otros desinfectantes tales como yodoformo, ácido cresílico, hipoclorito sódico, cloruro de benzalconio, hidróxido sódico (CAMPBELL et al, 1982) y resiste varios meses en atmósfera anaerobia (TZIPORI, 1983).

#### I. 2. 1. 2. Reservorios

A pesar de que el carácter zoonótico de la criptosporidiosis es universalmente aceptado, resta por dilucidar cuales son las especies animales que actúan como reservorio de la parasitosis humana. El problema de los reservorios no es más que la consecuencia inmediata del desconocimiento que en la actualidad se tiene acerca de la especificidad de Cryptosporidium, el cual ha pasado de ser considerado altamente específico, por analogía con otros Coccidios, a ser propuesto como monoespecífico (TZIPORI et al, 1980). LEVINE (1984) acepta la existencia de cuatro especies, parásitas de cuatro grupos zoológicos bien diferenciados: aves, peces, rep

tiles y mamíferos. Sin embargo UPTON y CURRENT (1985) denuncian la existencia de como mínimo dos especies distintas parásitas de mamíferos.

De la bibliografía científica sobre el tema se desprende que si bien la casi totalidad de mamíferos pueden actuar como huéspedes del parásito, la resistencia o susceptibilidad de los mismos a desarrollar cuadros patológicos, caracterizados generalmente por diarreas agudas, es muy variable. La enfermedad se muestra particularmente severa en ungulados tales como ovejas (ANGUS et al, 1982; TZIPORI, 1983; ROJO et al, 1985), cabras (MANSON et al, 1981), terneros (ANDERSON, 1981; TZIPORI, 1983; HEINE et al, 1984), ciervos (TZIPORI et al, 1981), preferentemente en animales jóvenes. En adultos, lo mismo que en otras especies animales (ratas, ratones, cobayos, etc), la criptosporidiosis suele cursar de forma benigna o asintomática.

### I. 2. 1. 3. Prevalencia

Es difícil, en el momento actual, hablar de la prevalencia de la criptosporidiosis tanto animal como humana, dado el fraccionamiento que presentan los datos de que se dispone.

La criptosporidiosis ha sido considerada la causa de las diarreas que frecuentemente presentan terneros y corderos recién nacidos y de corta edad (TZIPORI et al, 1981; ANGUS et al, 1982 ; ROJO VAZQUEZ et al, 1985) y la morbilidad con que aparece en algunos rebaños alcanza el 100 % (ROJO VAZQUEZ et al, 1985).

En cuanto al parasitismo humano no existen por el momento en-

cuestas lo suficientemente representativas para tener una idea de la incidencia real de este protozoo en los diversos grupos poblacionales. A pesar de ello, de la revisión bibliográfica se desprende que Cryptosporidium es un enteropatógeno habitual, de distribución cosmopolita y más frecuentemente en niños, habitualmente de corta edad, que en adultos. En la tabla nº 2 se efectúa un resumen bibliográfico acerca de la prevalencia de la criptosporidiosis humana en individuos inmunocompetentes en distintos países.

PAIS	TIPO POBLACION	PATOLOGIA	MUESTRAS POSIT/ESTUDIO	REFERENCIAS
Canada	Infantil Adulta	Diarrea Asintomat. Diarrea	12 / 878 1 / 878 6 / 586	RATNAM et al, 1985
U.S.A.	Infantil	Diarrea Asintomat.	11 / 17 3 / 28	ALPERT et al 1984
U.S.A.	Infantil y adulta	Diarrea	33 / 1290	WOLFSON et al 1984
U.S.A.	Infantil	Diarrea	129 / 703 <sup>1</sup>	McNABB et al 1985
U.S.A.	Infantil y adulta	Diarrea	47 / 79 <sup>1</sup>	O'ANTONIO et al 1985
Costa Rica	Infantil	Diarrea	12 / 278	MATA et al 1984
Brasil	Infantil y adulta	Diarrea	9 / 139	WEIKEL et al, 1985.
Rwanda	Infantil Adulta	Diarrea Diarrea	20 / 193 3 / 100	BOGAERTS et al, 1984
India	Infantil	Diarrea Asintomat.	89 / 682 41 / 418	MATHAU et al, 1985
Australia	Infantil Adulta	Diarrea Diarrea	33 / 697 3 / 187	TZIPOHI et al, 1983

PAIS	TIPO POBLACION	PATOLOGIA	MUESTRAS POSIT/ESTUDIO	REFERENCIAS
Finlandia	Infantil y adulta	Diarrea	14 / 154 <sup>2</sup>	JOKIPII et al, 1983
Dinamarca	Infantil y adulta	Diarrea	10 / 800	HOLTEN-ANDERSEN, 1983
Inglaterra	Infantil	Diarrea Asintomat.	7 / 213 1 / 112	ISAACS et al, 1985
España (Madrid)	Infantil y adulta	Diarrea No diarrea	2 / 92 1 / 249	LOPEZ BREA et al, 1985
España (Barcelona)	Infantil Infantil y adulta	Diarrea Diarrea Asintomat.	18 / 22 <sup>1</sup> 7 / 85 1 / 82	PORTOS et al, 1985

1 Brotes epidémicos

2 Muestras seleccionadas previo examen microscópico

Tabla nº 2. Resumen bibliográfico acerca de la prevalencia de la criptosporidiosis humana en el mundo, en individuos sin enfermedad de base reconocida.

## I. 2. 2. PATOLOGIA

El cuadro patológico que presenta la criptosporidiosis humana se caracteriza por una gastroenteritis que varía en intensidad de acuerdo con el estado inmunitario y nutricional del hospedador.

En individuos inmunocompetentes, el estudio histológico de biopsias intestinales revela que los parásitos tienden a concentrarse en la zona media del intestino delgado, yeyuno e íleon, donde se produce un redondeamiento de los villi, acortamiento de los enterocitos y una infiltración celular de la lámina propia más o menos acentuada (TZIPORI, 1983). Dichas alteraciones patológicas se manifiestan como diarreas de duración variable, que para la mayoría de los pacientes se limita a unos pocos días (CURRENT et al, 1983; JOKIPII et al, 1983; BOGAERTS et al, 1984; MATA et al, 1984; BRINES et al, 1985; ISAACS et al, 1985; MATHAN et al, 1985; WEIKEL et al, 1985; KOCH et al, 1985), si bien se describen casos de mayor duración, y que oscilan desde algunas semanas (MATA et al, 1984; WEIKEL et al, 1985) a varios meses (BOGAERTS et al, 1984; ISAACS et al, 1985). BOGAERTS et al (1984) en Rwanda encuentran que si bien la evolución de los individuos sanos y bien nutridos suele mostrarse favorable, autolimitándose el cuadro diarreico en unos pocos días, no ocurre lo mismo con niños afectados de marasmo, en los cuales las diarreas se mostraron severas y prolongadas, conduciendo incluso a la muerte en un caso. Estudios realizados en el sur de la India por MATHAN et al (1985) permitieron observar una mayor incidencia del parasitismo por Cryptosporidium en individuos que presentaban diarreas crónicas, de larga duración, que en casos de diarreas agudas. Según los mencionados autores quizás ello fuera debido al tratamiento antibiótico a que habían

estado sometidos muchos de estos pacientes, el cual, de alguna forma, pudiera favorecer la colonización por Cryptosporidium.

Junto a la diarrea destaca en el cuadro clínico de la criptosporidiosis en individuos inmunocompetentes el dolor abdominal (CURRENT et al, 1983; JOKIPII et al, 1983; BRINES et al, 1985; ISAACS et al, 1985), así como náuseas y vómitos (CURRENT et al, 1983; JOKIPII et al, 1983; MATA et al, 1984; ISAACS et al, 1985), en algunos casos fiebre moderada (CURRENT et al, 1983; JOKIPII et al, 1983; MATA et al, 1984) y con menos frecuencias retraso en el crecimiento y pérdida de peso (JOKIPII et al, 1983; ISAACS et al, 1985), hiponatremia (MATA et al, 1984), cefaleas (KOCH et al, 1985) y trastornos respiratorios (WEIKEL et al, 1985).

La sintomatología se intensifica cuando se trata de individuos inmunodeficientes. En estos casos la colonización puede extenderse a todo el tubo digestivo, desde el esófago hasta el recto (PTILIK et al, 1983; CURRENT, 1984), pudiendo pasar también a las vías respiratorias (FORGACS et al, 1983; MILLER et al, 1984) y conducto biliar (PTILIK et al, 1983). En estos casos se genera un cuadro diarreico prolongado, de varios meses de evolución (STEMMERMANN et al, 1980; KOCH et al, 1983; BAXBY et al, 1983; PTILIK et al, 1983; CHIAMPI et al, 1983; SOAVE et al, 1984), con abundantes deposiciones diarias (KOCH et al, 1983), acompañado de otros trastornos gástricos (náuseas, vómitos, dolor abdominal), deshidratación y pérdida de peso (STEMMERMANN et al, 1980; BAXBY et al, 1983; PTILIK, 1983; SOAVE et al, 1984; KOCH et al, 1985); la fiebre y las linfadenopatías suelen ser constantes (PTILIK et al, 1983). La asociación con otros gérmenes oportunistas como Toxoplasma (STEMMERMANN et al, 1980), Pneumocystis (CHIAMPI et al, 1983; SOAVE et al, 1984), citomegalovirus (PTILIK et al, 1983; KOCH et al, 1983;

SOAVE et al, 1984), Candida (PTILIK et al, 1983; KOCH et al, 1983) u otros enteropatógenos (BAXBY et al, 1983; PTILIK et al, 1983, SOAVE et al, 1984) es habitual en este tipo de enfermos. Si bien en estos casos el desenlace suele conllevar al exitus, es difícil de precisar la responsabilidad de Cryptosporidium en el mismo. En el estudio realizado por SOAVES et al (1984), sobre 6 enfermos de SIDA afectados de criptosporidiosis, el exitus se produjo únicamente en aquellos casos en los que el parásito estuvo asociado a otros oportunistas.

### I. 2. 3. DIAGNOSTICO BIOLÓGICO

#### I. 2. 3. 1. Diagnóstico parasitológico

Se basa en la observación y reconocimiento de los ooquistes.

Según DELUOL et al (1984), éstos aparecen en las heces a los tres días de la contaminación, y permanecen durante dos o tres semanas, en los individuos inmunocompetentes. En inmunodeficientes la persistencia puede ser indefinida, con fluctuaciones en la eliminación de ooquistes, correspondientes a periodos de diarrea más o menos intensa. Las diarreas acuosas y abundantes que se presentan en éstos últimos (algunas veces muchos litros) comportan una dilución del parásito, lo cual, acompañado de su inigual repartición en la masa fecal, dificulta su hallazgo. Al igual que ocurre con otros protozoos parásitos intestinales la emisión de ooquistes es discontinua, por lo que un solo exámen negativo no tiene demasiado valor diagnóstico.

Los procesos seguidos para la identificación de Cryptosporidium en las heces suelen incluir una fijación de la muestra, lo cual tiene como objeto la reducción del riesgo de contaminaciones, la concentración de ooquistes seguida o no de una tinción del frotis preparado a partir del concentrado y la observación microscópica.

Los casos de infección respiratoria diagnosticados hasta el momento lo han sido a través de la aplicación de las tinciones habituales para gérmenes ácido-alcohol resistentes (tinción de Kinyoun o con auramina) (MILLER et al, 1984) o a través de una biopsia transbronquial (FORGACS et al, 1983).

### I. 2. 3. 1. 1. Fijación

El líquido fijador utilizado por la mayoría lo constituye una solución al 10 % de formalina comercial (GARCIA et al, 1983; ZIERD et al, 1984; D'ANTONIO et al, 1985; McNABB et al, 1985; PORTUS et al, 1985), si bien se han ensayado, con más o menos éxito, otros fijadores como solución de KOH al 10% (GARCIA et al, 1983; BRONDSON, 1984), dicromato potásico y alcohol polivinílico (GARCIA et al, 1983). Todos estos fijadores se utilizan para la conservación de la masa fecal o, más frecuentemente, de una porción de la misma, previo a la concentración o confección del frotis.

Los frotis preparados, bien sea directamente de las heces sin fijar, bien sea de heces fijadas o del producto resultante de la concentración, se fijan mediante alcohol etílico o metílico.

### I. 2. 3. 1. 2. Coloración

En general se utilizan dos tipos de técnicas de coloración:

a / Aquellas que tiñen el parásito y que, por lo tanto, permiten observar su morfología y estructura.

b / Aquellas que tiñen los demás elementos fecales y no en cambio a Cryptosporidium, o sea coloraciones negativas en las que destaca el parásito como una pequeña mancha incolora.

Evidentemente las primeras son las más utilizadas ya que son las únicas que permiten asegurar un diagnóstico específico. Entre ellas destacan las tinciones para gérmenes ácido-alcohol re-

sistentes, las cuales vienen utilizándose en sus múltiples variantes (HENRIKSEN y POHLENZ, 1981; GARCIA et al, 1983; DELUOL et al 1984; BRONSDON, 1984; McNABB et al, 1985). La tinción de Giemsa se ha venido utilizando también muchas veces como complementaria a la de Ziehl-Neelsen (JOKIPII et al, 1983; MATA et al, 1984; PORTUS et al, 1985) con resultados variables.

GARCIA et al ,(1983), realizan un estudio comparativo de diversas técnicas para la recuperación e identificación de ooquistes de Cryptosporidium en las heces. La calidad de observación fue excelente al utilizar una modificación de la tinción de Ziehl utilizando  $H_2SO_4$  como decolorante; muy buena mediante la flotación con sucrosa, tinción de Giemsa y Ziehl-Neelsen; buena con la tinción de Kinyoun; bastante buena con la sedimentación bifásica con formalina y la tinción con auramina; regular con el PAS; mediocre con la tinción tricrómica, una modificación del PAS y con metenamina argéntica; y nula con naranja de acridina.

### I. 2. 3. 1. 3. Concentración

La inigual repartición de los ooquistes de Cryptosporidium dentro de la masa fecal y el bajo número con que a veces se encuentran (muchas veces no relacionado con la intensidad del cuadro patológico) obliga, o al menos aconseja, la utilización de técnicas de concentración.

Las técnicas de concentración utilizadas hasta el momento para este menester son de dos tipos :

a / Técnicas difásicas, en las que se recogen los ooquistes de Cryptosporidium en el sedimento de la fracción hidrófila.

b / Técnicas de flotación en medio hipertónico.

Entre las primeras destaca la utilización de las distintas variantes de la técnica de Ritchie, mediante la utilización del formol, empleado como fijador, como fase hídrica y de éter etílico o acetato de etilo como liposolvente.

Entre las segundas, la flotación con sucrosa de Sheather es la más utilizada. Este método presenta la ventaja de no requerir posteriores tinciones ya que los ooquistes de Cryptosporidium destacan en color rosa sobre un fondo incoloro, y pueden visualizarse e identificarse fácilmente, tanto al utilizar óptica normal como mediante óptica de contraste de fases (GARCIA et al, 1983; McNABB et al, 1985). La concentración de Ritchie, sin embargo, se convierte en una técnica idónea cuando se aplican sobre el sedimento técnicas de tinción. Las técnicas difásicas son preferidas por muchos debido a :

- su versatilidad, ya que son técnicas de uso común en parasitología, utilizadas por muchos laboratorios para la concentración de huevos de helmintos y quistes de protozoos (McNABB et al, 1985).

- la posibilidad de utilizar concentradores desechables, comercializados en algunos países (ZIERDT, 1984).

- el problema derivado del uso de soluciones hipertónicas, el cual comporta una modificación de la morfología del protozoo en caso de demorarse la observación (GARCIA et al, 1983; McNABB et al, 1985).

#### I. 2. 3. 1. 4. Microscopía electrónica

Si bien la microscopía electrónica se ha utilizado para dilucidar la ultraestructura de Cryptosporidium (Le CHARPENTIER et al, 1982; REDUKER et al, 1985), ésta no es una técnica aplicable o recomendable con fines diagnósticos, dada la complejidad que comporta y por no estar al alcance de la mayoría de los laboratorios de análisis clínicos.

Sin embargo, BAXBY et al (1984), describen el hallazgo e identificación de ooquistes de Cryptosporidium en muestras de heces preparadas con tinciones negativas para su estudio virológico, lo cual convierte a ésta en una técnica diagnóstica accesoria para aquellos laboratorios en los que se realiza la investigación rutinaria de virus enteropatógenos mediante microscopía electrónica.

#### I. 2. 3. 2. Exámen histopatológico

Este fue el único método diagnóstico utilizado hasta el año 1981 en que HENRIKSEN descubrió el carácter ácido resistente de Cryptosporidium.

Los exámenes histopatológicos se han realizado, bien sea con material procedente de necropsias, bien sea con biopsias de la mucosa estomacal, duodenal, yeyunal, a través de fibroscopía, e incluso de colon y recto (STEMMERMANN et al, 1980; CURRENT et al, 1983; CHIAMPI et al, 1983; DELUOL et al, 1984).

En la actualidad el estudio histopatológico como técnica diagnóstica se ha abandonado a favor de las técnicas de concentración y tinción ya mencionadas, dado su carácter menos agresivo, sencillo, barato y sensible (MA y SOAVE, 1983).

#### I. 2. 3. 3. Inoculación animal

La inoculación animal ha sido también descrita como un método sensible para el diagnóstico de la criptosporidiosis.

SHERWOOD et al (1982) preconizan la inoculación al ratón lactante, de la suspensión fecal sospechosa y posterior examen del íleon terminal y recto, donde los parásitos son abundantes en caso de reacción positiva.

#### I. 2. 3. 4. Reacciones inmunológicas

Si bien las reacciones inmunológicas se han utilizado desde hace años para el diagnóstico de la criptosporidiosis, su uso dista mucho de haberse generalizado, dada la facilidad que supone el examen directo de las heces y por otro lado la ausencia de reactivos comerciales para las pruebas serológicas, lo que obliga al laboratorio a la preparación de sus propios antígenos.

La única técnica utilizada hasta el presente ha sido la inmunofluorescencia indirecta, utilizando como antígeno cortes de intestino.

tino delgado de animales infestados natural o experimentalmente (TZIPORI y CAMPBELL, 1981; CAMPBELL y CURRENT, 1983) o ooquistes obtenidos a partir de heces de animales infestados (KOCH et al, 1985). La seroconversión se realiza hacia el día 14 post-infestación (TZIPORI y CAMPBELL, 1981; BLAGBURN y CURRENT, 1983) , y alcanzan su máximo entre los 2 y 3 meses, permaneciendo alto el título hasta un año después de la curación. Su evolución a largo término es desconocida, lo mismo que los efectos de reinfecciones sucesivas.

#### I. 2. 4. TRATAMIENTO

Como se ha señalado anteriormente en el individuo inmunocompetente la criptosporidiosis es una enfermedad que se autolimita en un espacio de tiempo más o menos largo. Debido a ello el tratamiento utilizado en estos casos no suele ser más que sintomático.

En el individuo inmunodeficiente el cuadro clínico es mucho más grave y raramente se produce la recuperación espontánea. A dicha gravedad se adiciona el hecho de no haberse reconocido hasta el momento una terapia totalmente efectiva. Los primeros ensayos de tratamiento tanto de la criptosporidiosis humana como animal fueron totalmente descorazonadores. En las tablas números 3 y 4 se incluyen los datos recogidos por TZIPORI (1983) y el Centers for Disease Control (1982) sobre ensayos efectuados con distintos antimicrobianos con resultado negativo.

Recientemente, la utilización de la Espiramicina, macrólido de frecuente administración para el tratamiento de otra Coccidiosis humana, la Toxoplasmosis, ha abierto una vía de esperanza para la terapia de la criptosporidiosis. En efecto, los ensayos terapéuticos realizados por PORTNOY et al (1984) y COLLIER et al (1984), con individuos afectados de SIDA o sometidos a transplante de médula ósea, a los que se les administró dicho antibiótico, condujeron a la erradicación del parásito o, como mínimo, a la mejora sintomática.



Tabla nº 4.

TABLE 4 Drugs used to treat males with cryptosporidiosis and AIDS

Drug*	Dose and route of administration †	Number of patients	Unchanged n (%)	Improved § n (%)	Cured ¶ n (%)
No treatment	—	2	0 (0.0)	2 (100.0)	0 (0.0)
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	25 mg/kg QID of sulfamethoxazole	7	7 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	800 mg PO BID of sulfamethoxazole	4	4 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Furazolidone	100 mg PO QID	6	4 (66.7)	1 (16.7)	1 (16.7)
Furazolidone	300 mg PO QID	1	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Metronidazole	750 mg PO TID	5	4 (80.0)	1 (20.0)	0 (0.0)
Metronidazole	750 mg IV TID	1	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
Pyrimethamine/ sulfa	25 mg PO per day of pyrimethamine	4	4 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Diloxanide furoate	500 mg PO TID	3	2 (66.7)	0 (0.0)	1** (33.3)
Quinacrine	100 mg PO TID	3	3 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Diiodohydroxyquin	850 mg PO TID	2	2 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Tetracycline	500 mg PO QID	3	1 (33.3)	2 (66.6)	0 (0.0)
Doxycycline	100 mg PO per day	2	2 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Pentamidine	4 mg/kg IM per day	2	2 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Chloroquine/ primaquine	500 mg PO per day of chloroquine	1	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

\*Some patients received more than one drug.

†BID = twice daily; TID = three times daily; QID = four times daily; PO = orally; IV = intravenously

§Decrease in number of stools by at least 50%.

¶Absence of diarrhea for more than 2 weeks and stool examination negative for *Cryptosporidium*.

\*\*Improvement temporally related to stopping prednisone.

(Tomado del C.D.S. , 1982)

## II PARTE EXPERIMENTAL

## II. 0. OBJETIVO DEL TRABAJO

Los resultados de un estudio preliminar realizado en población hospitalaria, población preescolar y controles sanos en Barcelona (SERRA et al, 1984 ; PORTUS et al, 1985) mostraron que Cryptosporidium era un protozoo frecuente en nuestro medio, fundamentalmente en individuos aquejados de gastroenteritis . Dichos estudios nos indicaron la necesidad de conocer la prevalencia de dicho parasitismo y fundamentalmente su papel en la etiología de las gastroenteritis.

Por ello, nos propusimos averiguar la incidencia de este parásito en las muestras fecales que de forma rutinaria se reciben en la Sección de Parasitología del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

El estudio se planificó en tres vertientes fundamentales :

- Análisis de los métodos diagnósticos que después de una revisión bibliográfica nos parecieron más apropiados a nuestras necesidades, y establecimiento de una pauta de trabajo que pudiera ser incorporada a la rutina del laboratorio.
- Estudio epidemiológico de la criptosporidiosis en la población estudiada. Tipo de población más frecuentemente afectada; influencia de la edad, sexo, variación estacional y ubicación urbana.
- Valoración clínica de los casos de criptosporidiosis detectados

## II. 1. MATERIAL Y METODOS

Se han estudiado un total de 1923 muestras fecales, remitidas a la Sección de Parasitología del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

### II. 1. 1. FIJACION DE LA MUESTRA

Las heces son recogidas por el enfermo en recipientes irrompibles de material plástico y de cierre hermético. Sólo se aceptan las heces que llegan al laboratorio máximo dos horas después de su emisión.

Para la investigación de Cryptosporidium la fijación se realiza en formol al 10 %. Para la investigación de otros protozoos enteroparásitos en M.I.F.

Fijación con formol: como solución fijadora y conservadora se utiliza una solución de formol al 10 %.

Solución de aldehído fórmico comercial	10 ml
Agua destilada	100 ml

Se trabaja con viales de cristal de 15 ml de capacidad a los que se colocan 5 ml de formol al 10 % y se añaden 1-2 gr de heces ( 1 volumen de heces por 3 volúmenes de solución fijadora). Las heces deben suspenderse para su total fijación para lo cual se utilizan pequeños palos de madera.

Es un buen método de fijación, que permite realizar una técnica posterior de concentración formol-éter. Además se ha observado que el formol permeabiliza la pared de los ooquistes de Cryptosporidium, lo que permite observar con mayor facilidad su estructura interna (A.S.C.P. 1984).

## II. 1. 2. CONCENTRACION DE LA MUESTRA

Técnica difásica de sedimentación — Técnica de RITCHIE (1948) modificada por ALLEN y RIDLEY (1970).

Las heces previamente fijadas con formol (2 gr de heces en 5-7 ml de formol al 10 %) se tamizan por cuatro dobleces de gasa para eliminar los residuos pesados o voluminosos.

La suspensión que se obtiene se recoge en tubos de centrifuga cónicos de 10 ml, a los que se añaden 2-3 ml de éter. Se procede a una agitación vigorosa durante unos segundos tapando el tubo con un tapón de goma, y a su centrifugación posterior a 1500 rpm durante 3'.

Con la centrifugación el contenido del tubo se reparte en cuatro capas :

1. Capa de éter donde se encuentran todos los elementos grasos.
2. Interfase que aparece como una capa espesa constituida por restos lipófilos.
3. Capa acuosa.

4. Sedimento donde se acumulan las sustancias hidrófilas pesadas y los diversos elementos parasitarios, huevos y quistes.

Se decanta el sobrenadante volcando bruscamente el tubo de centrifuga, con lo que las tres capas superficiales son eliminadas. Puede ocurrir que la película de restos lipófilos sea muy espesa, deberá entonces despegarse de las paredes del tubo de centrifuga a las que se adhiera, con ayuda de una pipeta Pasteur.

Se preparan diversos frotis de la muestra a partir del sedimento donde deben encontrarse los ooquistes de Cryptosporidium. El sedimento debe homogeneizarse dando giros al tubo o ayudándonos con una pipeta Pasteur.

Mediante esta técnica de concentración quedan aún muchos residuos fecales sin eliminar, como son restos celulósicos, granos de almidón, células pétreas, cristales, pero es una buena y sencilla técnica de concentración de ooquistes.

## II. 1 . 3. PREPARACION DE LOS FROTIS FECALES

a / A partir de heces fijadas y concentradas.

Se deposita una gota del sedimento con una pipeta Pasteur sobre un porta-objetos limpio y desengrasado previamente para favorecer la adhesión. Se realiza una extensión uniforme, no demasiado gruesa de la gota, con la ayuda de un cubre-objetos.

Las extensiones se dejan secar a temperatura ambiente y se fijan después con metanol durante 5'.

Se preparan dos extensiones de cada sedimento, una se tiñe según el método de Ziehl-Neelsen modificado, y la otra se utiliza para comparar con otras tinciones como el Giemsa y la auramina.

Todos los sedimentos realizados se almacenan a 4º C en suero fisiológico para posteriores comprobaciones.

#### b / A partir de heces frescas

Se realizan dos frotis con heces frescas, tomadas de puntos distintos de la muestra fecal. Se preparan extensiones finas con un palito de madera sobre porta-objetos limpios y desengrasados.

Una vez secas las extensiones al aire, se fijan con metanol durante 5' y después se procede a su tinción.

#### II. 1. 4. TINCIONES

Las tinciones que se utilizan para el reconocimiento de los oocistos de Cryptosporidium son :

Método de Ziehl-Neelsen modificado

Método de la auramina

Método de Giemsa

Las dos primeras técnicas se basan en la capacidad de los oocistos de captar el colorante y resistir la decoloración ácida.

## II. 1. 4. 1. Ziehl-Neelsen modificado (HENRIKSEN y POHLENZ, 1981)

La técnica modificada consiste en :

- Tinción con carbol-fucsina

carbol fucsina	1 gr
etanol	10 ml
fenol al 5%	90 ml

La tinción se realiza en 20 minutos, calentando tres veces el frotis, cada 7 minutos, hasta que aparezcan vapores de fucsina , sin permitir que llegue a hervir.

- Dos lavados con agua corriente de 2 minutos.

- Decolorización ácida con ácido sulfúrico al 7 %. El tiempo que tarda en decolorarse el frotis depende de su grosor. Oscila en unos 30 segundos.

- Lavado de 2 minutos con agua corriente.

- Contratinción con verde malaquita al 5 % durante 2 minutos

verde malaquita	5.0 gr
etanol al 10 %	100 ml

- Cuatro lavados de un minuto con agua corriente.

Se elimina el exceso de líquido de lavado con un papel de filtro y se dejan secar las preparaciones al aire. A continuación se procede a su montaje en medio D.P.X.

Los ooquistes adoptan un color rojo-fucsia brillante, más o menos intenso según el tiempo de decoloración, que contrasta en gran manera con el fondo verde. En el interior de los ooquistes pueden visualizarse sus cuatro esporozoitos y el cuerpo residual que apa

rece como una mancha negra.

La observación del frotis se realiza al microscopio ordinario a 400 x y se confirma a 1000 x con el objetivo de inmersión.

#### II. 1. 4. 2. Giemsa

Los frotis bien secos ,una vez fijados con metanol, se cubren durante 30 minutos con el colorante de Giemsa.

La solución colorante se prepara con 2 gotas de solución de Giemsa preparada en el comercio por mililitro de agua destilada y el mismo número de gotas de agua del grifo.

Al cabo de los 30 minutos, el exceso de colorante se elimina y el frotis se lava con cuidado con agua corriente y se deja secar al aire.

Los ooquistes tienen un tamaño de 4-5  $\mu\text{m}$ . La coloración del citoplasma varía desde incoloro a rosa-violeta más o menos intensa, granuloso, con una zona central más clara. El cuerpo residual queda muy marcado en posición excéntrica y los esporozoitos aparecen teñidos en rojo. Muchas formas captan mal la coloración y son difíciles de distinguir. Las levaduras se distinguen porque son un poco más alargadas, aunque son de tamaño parecido, se colorean más intensamente en azul y su citoplasma es uniforme y liso.

La observación del frotis se realiza a 400 x con un microscopio ordinario. Los frotis teñidos y secos se someten a montaje con D.P.X. antes de su observación.

### II. 1. 4. 3. Auramina (SMITHWICK, 1975)

Es una técnica de fluorescencia muy utilizada para el diagnóstico de gérmenes ácido-alcohol resistentes.

La técnica consiste en :

- Tinción fría por la solución de auramina-fenol durante 15 minutos, preparada a base de dos soluciones que se mezclan y conservan a temperatura ambiente.

Solucion A	Auramina O	0.1 gr
	Alcohol etílico 95 %	10 ml
Solución B	Fenol	3 gr.
	Agua destilada	87 ml

- Lavado con agua

- Decolorización con ácido-alcohol durante 2 minutos

HCl concentrado	0.5 ml
Alcohol etílico 70 %	100 ml

- Lavado con agua

- Coloración durante 3 minutos con permanganato

$\text{KMnO}_4$	0.5 gr
Agua destilada	100 ml

Esta solución debe guardarse a temperatura ambiente en frascos de color topacio.

- Lavado con agua

- Dejar secar los frotis a temperatura ambiente

Los frotis una vez teñidos se miran al microscopio de fluorescencia. Los ooquistes aparecen como estructuras fluorescentes redondeadas de 3-5  $\mu$ m de diametro. Las levaduras, por el contrario, no toman la auramina. Por otra parte pueden existir dificultades de identificación por el riesgo de fluorescencias inespecíficas que pueden surgir.

La observación del frotis se realiza a 100 x y se confirma a 400 x utilizando un microscopio de fluorescencia.

El estudio comparativo de los tres métodos de tinción utilizados nos ha mostrado la superioridad del método de Ziehl-Neelsen sobre la tinción con el colorante de Giemsa y con la auramina.

## II. 1. 5. CUANTIFICACION DE LOS RESULTADOS

Para tener una idea del grado de infestación que presentan las distintas muestras estudiadas, los resultados se cuantifican mediante un sistema de cruces :

x/- cuando la observación de la totalidad del frotis con un objetivo de 40 x permite la visualización de 1-5 elementos parasitarios.

x cuando se observan uno o dos elementos parasitarios en unos 10 campos microscópicos

- xx cuando se observan hasta 1-2 parásitos por campo
- xxx cuando se observan varios parásitos por campo

## II. 2. RESULTADOS DEL EXAMEN FECAL

### II. 2. 1. ANALISIS COPROPARASITOLÓGICO

Se han analizado un total de 1923 muestras fecales recibidas en la Sección de Parasitología del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, desde Julio de 1984 a Diciembre de 1985 inclusive. Dicho estudio coproparasitológico se ha practicado en el total de las muestras estudiadas mediante:

a/ Fijación de una porción de las muestras con el reactivo M.I.F. y posterior observación microscópica.

b/ Concentración de huevos de helmintos por la técnica de KATO.

c/ Fijación con formol al 10 %, concentración formol-éter y tinción de Ziehl-Neelsen modificada.

Las muestras recogidas durante el primer año de estudio (un total de 508) correspondían a muestras seleccionadas en función del resultado del exámen microscópico de las heces fijadas mediante el reactivo de M.I.F. La presencia de Cryptosporidium se investigó tan solo, en aquellas en las cuales a través de dicho exámen se observaron formas morfológicas que a priori consideramos podían ser compatibles con el mencionado protozoo. Se incluyó también en el estudio aquellas otras muestras que procedían de enfermos inmunodeficientes o de individuos con diarreas crónicas de etiología no diagnosticada.

Durante el segundo año el estudio se amplió a todas las muestras fecales que llegaron a dicha Sección, lo cual significó un total de 1415 muestras.

En la tabla nº 5 se especifica la positividad de las muestras analizadas frente a diversas especies enteroparásitas. A partir de la misma puede observarse que la selección previa de las muestras en función de la morfología de los elementos observados durante el exámen del M.I.F , no influye en la positividad del exámen posterior mediante técnicas específicas para la detección de Cryptosporidium. Se observa que el porcentaje de muestras positivas fue superior en el año 1985, cuando no se realizó ningún tipo de selección.

## II. 2. 2. ESTUDIO COMPARATIVO DE OTRAS PAUTAS DE TRABAJO

En el transcurso de la experiencia se ha ensayado la efectividad de otras técnicas diagnósticas con el fin de obtener el máximo rendimiento de los procesos a seguir.

### II. 2. 2. 1. Utilidad del exámen directo

En un total de 60 muestras fecales se realizó en paralelo la tinción de Ziehl sobre el frotis fecal directo o sobre el frotis fecal del sedimento obtenido en la concentración difásica. Ninguna de las muestras que fueron positivas durante el exámen directo resultó negativa en el exámen previa concentración. La reconoci-

	AÑO 1984 (508 muestras)		AÑO 1985 (1415 muestras)		TOTAL (1923)	
	M	%	M	%	M	%
<u>Cryptosporidium</u>	8	( 1.6 )	77	( 5.4 )	85	( 4.4 )
<u>E. coli</u>	14	( 2.7 )	49	( 3.5 )	63	( 3.3 )
<u>E. hartmani</u>	5	( 0.1 )	15	( 1.1 )	20	( 1.0 )
<u>E. histolytica</u>	0	( - )	15	( 1.1 )	15	( 0.8 )
<u>E. nana</u>	5	( 1.0 )	29	( 2.0 )	34	( 1.8 )
<u>Y. böttschlii</u>	1	( 0.2 )	9	( 0.6 )	10	( 0.5 )
<u>Ch mesnilli</u>	2	( 0.4 )	3	( 0.2 )	5	( 0.3 )
<u>D. fragilis</u>	21	( 4.1 )	90	( 6.4 )	111	( 5.8 )
<u>G. intestinalis</u>	31	( 6.1 )	117	( 8.3 )	148	( 7.7 )
<u>Ir. hominis</u>	0	( - )	3	( 0.2 )	3	( 0.2 )
<u>I. saginata</u>	3	( 0.6 )	3	( 0.2 )	6	( 0.3 )
<u>A. duodenale</u>	0	( - )	3	( 0.2 )	3	( 0.2 )
<u>E. vermicularis</u>	1	( 0.2 )	3	( 0.2 )	4	( 0.2 )
<u>I. trichura</u>	0	( - )	7	( 0.5 )	7	( 0.4 )

Tabla nº 5. Resultados del examen coproparasitológico de las muestras analizadas.

da mala dispersión de los ooquistes de Cryptosporidium en las heces nos aconsejó la realización de dos frotis fecales distintos, de pequeñas porciones de muestra tomadas en distintos puntos de la masa fecal. En la tabla nº 6 se recogen los resultados obtenidos mediante la utilización de los dos métodos. Puede observarse que el exámen previa concentración es mucho más fiable que el exámen realizado en el frotis fecal directo. Debe destacarse también el hecho, difícilmente demostrable en números, de la irregular dispersión que presentan los ooquistes de Cryptosporidium en este último. Es por ello que la mayor sensibilidad de un exámen previa concentración vendrá dada no sólo por el hecho de haber concentrado los ooquistes de Cryptosporidium sino de haber homogeneizado una parte más representativa de la masa fecal y haber obtenido por lo tanto una dispersión más regular del parásito.

#### II. 2. 2. 2. Tinción de Giemsa

En un total de 391 muestras se realizó en paralelo la tinción de Ziehl modificada y la tinción de Giemsa con los frotis obtenidos de la concentración difásica. Los resultados obtenidos con aquellas muestras que fueron positivas para una u otra de las técnicas utilizadas se representan en la tabla nº 7.

Si bien a tenor de los resultados expresados en dicha tabla puede observarse que la tinción de Giemsa es una técnica sensible para la detección de ooquistes de Cryptosporidium en las heces, el hecho de que en la mayoría de los casos la coloración del parási-

MUESTRA	EXAMEN DIRECTO		EXAMEN PREVIA CONCENTRACION
	1 <sup>er</sup> frotis	2 <sup>o</sup> frotis	
441/p	xx	x/-	xx
468/p	neg	-	xxx
509/p	neg	neg	x
531/p	neg	neg	xxx
637/p	xxx	xx	xxx
705/p	xxx	xx	xxx
730/p	neg	neg	xx
825/p	neg	neg	x
948/p	xx	x	xxx
958/p	neg	neg	x/-
P-48	x/-	neg	x
P-409	x/-	neg	x/-
P-436	neg	neg	x/-
P-437	x/-	neg	x
P-438	neg	neg	x/-
P-466	x/-	neg	x/-

Tabla nº 6. Positividad a Cryptosporidium en los frotis teñidos con fucsina y confeccionados directamente de la masa fecal o del sedimento obtenido en la concentración difásica.

MUESTRA	ZIEHL-NEELSEN	GIEMSA
P-110	xxx	xx
P-125	xxx	xxx
P-126	xxx	xxx
P-138	xxx	xxx
P-140	xxx	xx
P-143	x	x
P-162	x/-	x/-
P-171	xxx	xxx
P-192	x	x/-
P-199	xxx	xx
P-200	xx	xxx
P-202	x	xx
P-203	xxx	xxx
P-217	xx	xx
P-220	xx	xx
P-250	xx	xxx
P-255	xxx	xxx
P-258	xx	xx

Tabla nº 7. Positividad a Cryptosporidium en los frotis preparados a partir del sedimento de la concentración difásica y teñidos mediante la coloración de Ziehl-Neelsen y de Giemsa.

to resulta practicamente imperceptible, lo que la convierte casi en una tinción negativa, dificulta el establecimiento de un diagnóstico seguro. En la mayoría de los casos dicho diagnóstico ha debido de confirmarse mediante la tinción con fucsina, puesto que la observación de unas pocas formas incoloras de tamaño compatible con el de Cryptosporidium, si bien es sugestivo, dista mucho de ser concluyente. Es por ello que consideramos que dicha tinción no es una técnica válida para ser utilizada de forma única para la investigación del parásito.

#### II. 2. 2..3. Tinción con auramina

La tinción con auramina se ha realizado sobre un total de 42 muestras, de las cuales se había determinado previamente su positividad o negatividad a Cryptosporidium mediante la técnica de - Ziehl.

A partir de los resultados expresados en la tabla nº 8 se observa que la tinción con auramina es una técnica muy sensible, que permite una observación rápida del frotis. Sin embargo, junto a esta alta sensibilidad observamos también falta de especificidad, fundamentalmente en aquellas muestras en las cuales la parasitación fuera escasa o nula, siendo muy difícil en estos casos el discernir cuales eran los realmente negativos.

MUESTRA	ZIEHL-NEELSEN	AURAMINA
P-294	x	x/-
P-308	xxx	xxx
P-331	xx	xxx
P-335	x	xx
P-359	xx	xxx
P-397	xx	xxx
P-409	x/-	xx
P-431	xx	xxx
P-436	x/-	x
P-437	x	xx
P-438	x	x
P-446	x/-	xx
P-466	x/-	x
P-472	xxx	xxx
P-503	xxx	xxx
P-505	xxx	xxx
P-512	xxx	xxx
P-537	x	x
P-541	x/-	x
P-543	x/-	x

Tabla nº 8. Positividad a Cryptosporidium en los frotis preparados a partir del sedimento de la concentración difásica y teñidos mediante las coloraciones de Ziehl y de la auramina.

MUESTRA	ZIEHL-NEELSEN	AURAMINA
299/p	neg	neg
326/p	neg	neg
P-53	neg	neg
P-496	neg	neg
P-497	neg	x/-
P-510	neg	x/-
P-516	neg	x/-
P-520	neg	x/-
P-522	neg	neg
P-526	neg	neg
P-527	neg	x/-
P-535	neg	neg
P-544	neg	neg
P-551	neg	neg
P-559	neg	neg
P-567	neg	neg
P-572	neg	neg
P-581	neg	neg
P-583	neg	neg
P-585	neg	neg
P-586	neg	x/-
P-587	neg	neg

Tabla nº 9. Positividad a Cryptosporidium en los frotis preparados a partir del sedimento de la concentración difásica y teñidos mediante la coloración de Ziehl y la técnica de la auramina.

En la tabla nº 9 puede observarse que en 6 de las muestras previamente negativas se encontraron estructuras fluorescentes de morfología compatible con Cryptosporidium. La realización subsiguiente de nuevos frotis fecales a los que se practicó la tinción de - Ziehl-Neelsen modificada no permitió confirmar dicha positividad. Junto a ello la observación de algunas formas que pudieramos considerar dudosas es prácticamente constante en todos los frotis teñidos con auramina. La imposibilidad en la observación de la estructura interna del parásito en estos casos, impide la confirmación de un diagnóstico positivo o negativo.

## II. 2. 3. EXAMEN DE OTROS ENTEROPATOGENOS

La investigación de otros organismos enteropatógenos de origen bacteriano se realizó en un total de 1040 muestras. El estudio bacteriológico se basó en la inoculación en medio de MacConkey, agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD), agar Salmonella-Shigella (SS) y agar cefsulodin-irgasan-novobiocina (CIN). Para el enriquecimiento de Salmonella se utilizó el selenito F (SF), el medio de Butzler (Bu) para el aislamiento de C. jejuni y el agar cefoxitin-cicloserina-fructosa en anaerobiosis para Cl. difficile.

La investigación de organismos enteropatógenos de origen vírico se realizó mediante la técnica ELISA, para la detección de antígeno de rotavirus en las heces, en un total de 226 muestras.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla nº 10.

	MUESTRAS	
	N	%
ESTUDIO BACTERIOLOGICO	1040	
Positivos para:		
<u>Salmonella</u>	61	(5.8)
<u>C. jejuni</u>	58	(5.6)
<u>Shigella</u>	4	(0.4)
<u>Yersinia</u>	9	(0.9)
<u>Aeromonas</u>	2	(0.2)
<u>Plesiomonas</u>	3	(0.3)
<u>Cl. difficile</u>	3	(0.3)
ESTUDIO VIROLOGICO	226	
Positivos para rotavirus	26	(11.5)

Tabla nº 10. Investigación de otros enteropatógenos.

#### II. 2. 4. RELACION ENTRE LA INFESTACION POR CRYPTOSPORIDIUM Y LA SINTOMATOLOGIA DEL ENFERMO.

El total de las muestras fecales estudiadas pertenecientes a individuos afectados de gastroenteritis ha sido de 1324, de las cuales 81 fueron positivas para Cryptosporidium, mientras que de las 599 muestras correspondientes a individuos afectados de otros cuadros patológicos tan solo 4 resultaron positivos a dicho parásito. (Tabla nº 11). En la tabla nº 12 y con fines comparativos se incluyen los mismos datos correspondientes al parasitismo por Giardia intestinalis en la población estudiada. Puede observarse que de 148 muestras que resultaron positivas a G intestinalis, 124 correspondían a individuos afectados de gastroenteritis mientras que tan solo 24 correspondían a individuos afectados de otras patologías.

En la tabla nº 13 se indican entre otros datos el estado físico de la muestra fecal remitida al laboratorio correspondiente a aquellos individuos que resultaron positivos a Cryptosporidium. Puede observarse que el 9.4% de las muestras tenían consistencia líquida, 84.7% pastosa y unicamente el 5.8% eran formes. Se señalan también los estudios coprológicos realizados en dichas muestras y el resultado de los mismos.

	GASTROENTERITIS				OTROS CUADROS PATOLOGICOS			
	Muestras totales N	Muestras positivas N %	Pacientes N		Muestras totales N	Muestras positivas N %	Pacientes N	
ADULTOS	502	5 (0.99)	3		426	2 (0.46)	2	
NIÑOS	822	76 (9.24)	50		173	2 (1.15)	2	
TOTAL	1324	81 (6.11)	53		599	4 (0.66)	4	

Tabla nº 11. Criptosporidiosis. Relación entre la positividad de las muestras y la presencia de cuadros de gastroenteritis en los pacientes analizados según se trate de población adulta o pediátrica.

	GASTROENTERITIS				OTROS CUADROS PATOLOGICOS			
	Muestras totales N	Muestras positivas N %	Pacientes N		Muestras totales N	Muestras positivas N %	Pacientes N	
ADULTOS	502	17 (3.33)	17		426	14 (3.28)	9	
NIÑOS	822	107 (13.01)	95		173	10 (5.78)	10	
TOTAL	1324	124 (9.36)	112		599	24 (4.00)	19	

Tabla nº 12. Parasitismo por Giardia intestinalis. Relación entre la positividad de las muestras y la presencia de cuadros de gastroenteritis en los pacientes analizados según se trate de población adulta o pediátrica.

MUESTRA	E <sub>(1)</sub>	S	SINTOMATOLOGIA	ESTADO HECES	$\frac{P}{V} \frac{B}{(2)}$	OTROS ENTEROPATOGENOS
220	2	M	GE	pastosa	x	
256	57	M	GE	pastosa	x	
395/p	27	M	estreñimiento	formes	x	
667/p	18m	M	GE	pastosa	x	<u>G. intestinalis</u>
673/p	2	M	GE	pastosa	x	
721/p	n	M	GE	pastosa	x	
755/p	n	M	GE	pastosa	x	
778/p	16m	M	GE	pastosa	x	
142	56	F	GE	pastosa	x	<u>C. jejuni</u>
144	56	F	GE	pastosa	x	<u>C. jejuni</u>
189	56	F	GE	pastosa	x	<u>Ch. mesnillii</u>
304/p	12m	M	GE	pastosa	x	
413/p	3	M	GE	liquida	x	
441/p	3	M	GE	pastosa	x	
468/p	13m	M	GE	pastosa	x	
509/p	3	M	GE	pastosa	x	
531/p	49	M	GE	liquida	x	<u>C. jejuni</u>
615/p	3	M	GE	pastosa	x	
627/p	2	M	GE	pastosa	x	
637/p	3	M	GE	pastosa	x	
705/p	17m	M	GE	pastosa	x	
730/p	17m	M	GE	pastosa	x	
736/p	17m	M	GE	pastosa	x	

MUESTRA	E (1)	S	SINTOMATOLOGIA	ESTADO HECES	P	V	B	OTROS ENTEROPATOGENOS
					(2)			
771/p	17m	M	GE	pastosa	X		X	
773/p	17m	M	GE	pastosa	X		X	
807/p	18m	M	GE	pastosa	X			
808/p	17m	M	GE	pastosa	X			
825/p	17m	M	GE	pastosa	X			
878/p	12m	M	GE	liquida	X	X	X	<u>G. intestinalis</u>
948/p	10m	M	GE	formes	X	X	X	<u>Salmonella grupo D</u>
955/p	20m	M	GE	pastosa	X	X	X	
958/p	20	F	urticaria	pastosa	X			
991/p	20m	M	GE	pastosa	X			<u>G. intestinalis</u>
P-10	20m	M	GE	pastosa	X	X	X	
P-42	5	M	tos	formes	X			
P-48	10m	M	GE	pastosa	X			
P-69	22m	M	GE	pastosa	X	X	X	
P-90	22m	M	GE	pastosa	X	X	X	<u>Salmonella enteriti</u>
P-94	16m	F	GE	formes	X	X	X	<u>dis grupo C</u>
P-97	22m	F	GE	pastosa	X	X	X	<u>D. fragilis</u>
P-110	2	F	GE	liquida	X	X	X	<u>G. intestinalis</u>
P-125	18m	F	GE	pastosa	X	X	X	
P-126	20m	F	GE	pastosa	X	X	X	
P-138	2	F	GE	pastosa	X			<u>D. fragilis</u>
P-140	2	F	GE	pastosa	X			<u>G. intestinalis</u>
P-143	22m	M	GE	pastosa	X	X	X	
P-162	2	M	bronquitis	pastosa	X			<u>G. intestinalis</u>
P-171	2	F	GE	pastosa	X			<u>Salmonella grupo B</u>
P-181	3	M	GE	pastosa	X	X	X	<u>G. intestinalis</u>
P-192	12m	M	GE	formes	X		X	

MUESTRA	E (1)	S	SINTOMATOLOGIA	ESTADO HECES	P	V	B	OTROS ENTEROPATOGENOS
P-199	20m	F	GE	liquida	x		x	
P-200	n	M	GE	pastosa	x		x	
P-202	12m	M	GE	pastosa	x			
P-203	22m	M	GE	pastosa	x	x	x	
P-217	3	F	GE	pastosa	x		x	
P-220	n	M	GE	pastosa	x			
P-250	2	F	GE	pastosa	x			
P-255	18m	M	GE	pastosa	x	x	x	
P-258	2	M	GE	pastosa	x			
P-261	13m	F	GE	pastosa	x			
P-273	2	F	GE	liquida	x	x	x	<u>G. jejuni</u>
P-278	4m	F	GE	pastosa	x	x	x	
P-294	22m	M	GE	pastosa	x	x	x	
P-308	6m	M	GE	pastosa	x	x	x	
P-331	18m	M	GE	pastosa	x	x	x	
P-335	2	F	GE	pastosa	x			
P-357	18m	M	GE	pastosa	x			
P-359	12m	M	GE	pastosa	x	x	x	<u>G. intestinalis</u>
P-397	2	F	GE	pastosa	x	x	x	<u>G. intestinalis</u>
P-409	12m	M	GE	pastosa	x			
P-411	2	M	GE	pastosa	x	x	x	
P-431	12m	M	GE	pastosa	x	x	x	
P-436	2	M	GE	pastosa	x	x	x	
P-437	9m	F	GE	pastosa	x			
P-438	2	M	GE	pastosa	x			
P-446	2	M	GE	liquida	x	x	x	
P-466	5m	F	GE	pastosa	x	x	x	

MUESTRA	E (1)	S	SINTOMATOLOGIA	ESTADO HECES	$\frac{P \quad V \quad B}{(2)}$	OTROS ENTEROPATOGENOS
P-472	2	M	GE	pastosa	x x x	<u>G. intestinalis</u>
P-486	6m	M	GE	pastosa	x x x	
P-503	2	M	GE	pastosa	x x x	<u>D. fragilis</u>
P-505	18m	F	GE	pastosa	x x x	
P-512	21m	M	GE	liquida	x x x	
P-537	5m	F	GE	pastosa	x x x	
P-541	5m	F	GE	pastosa	x x x	
P-543	5m	F	GE	pastosa	x	

Tabla nº 13. Algunos datos referentes al paciente, estado físico de las heces y estudios coprológicos realizados en aquellas muestras que fueron positivas a Cryptosporidium.

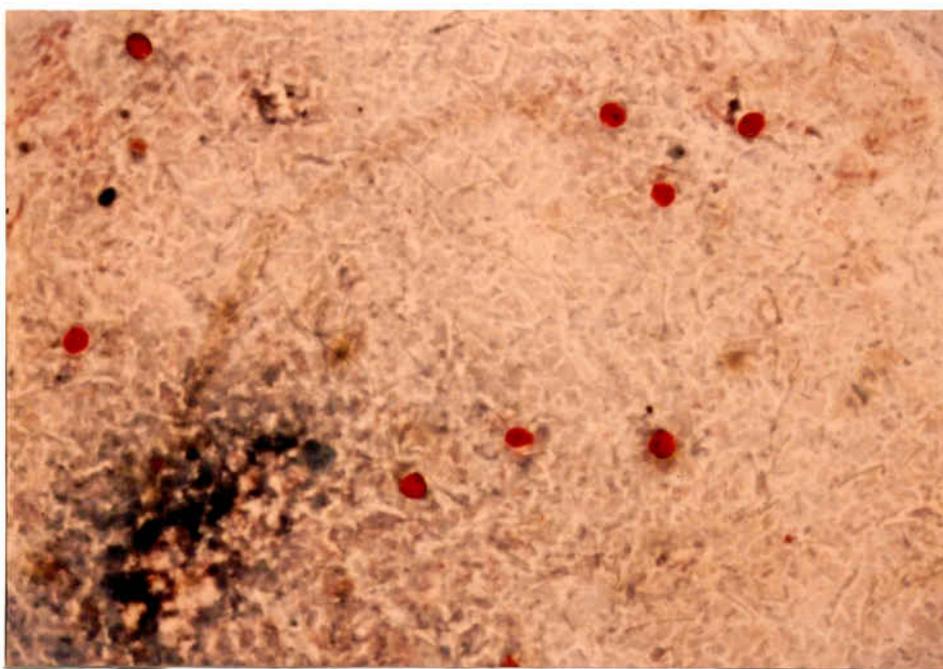


Figura nº 5  
Ooquistes de Cryptosporidium  
Tinción de Ziehl 600x

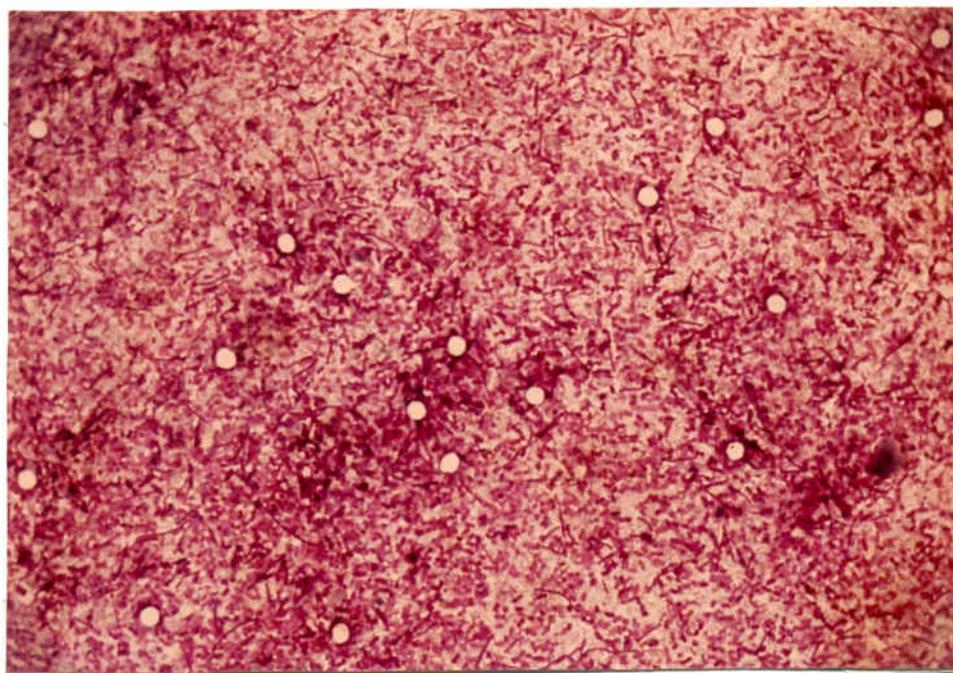


Figura nº 6  
Ooquistes de Cryptosporidium  
Tinción de Giemsa 400x

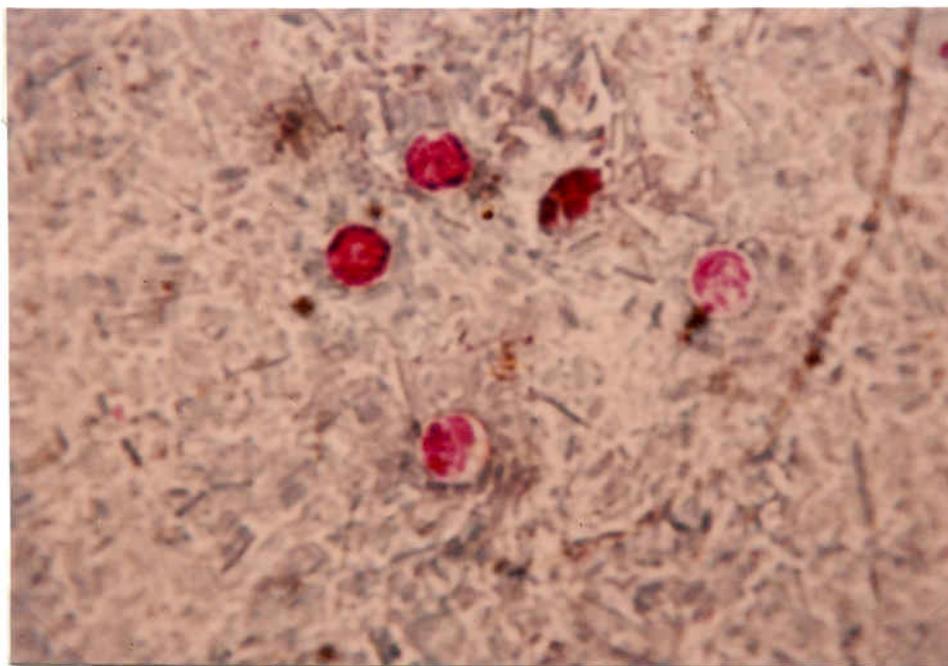


Figura nº 7  
Ooquistes de Cryptosporidium  
Tinción de Ziehl 1800x

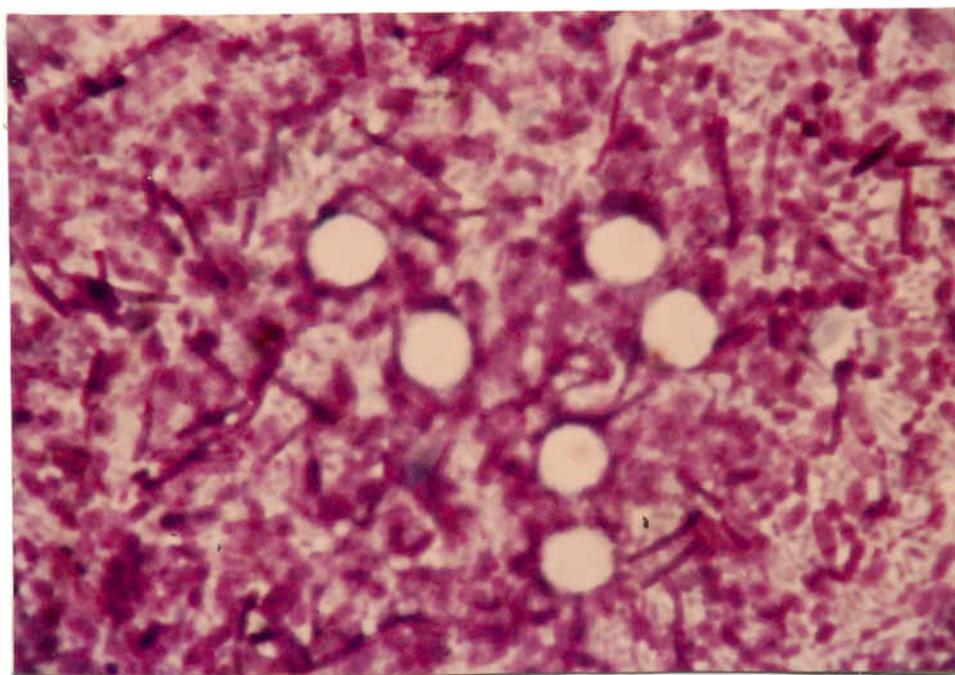


Figura nº 8  
Ooquistes de Cryptosporidium  
Tinción de Giemsa 1800x

## II. 3. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

### II. 3. 1. INFLUENCIA DE LA EDAD

A partir de los datos referidos en la tabla nº 13 se observa que la mayoría de los pacientes a los cuales se detectaron ooquistes de Cryptosporidium en sus heces eran niños de edad inferior a los 2 años. Tan solo en 4 casos se trataba de individuos adultos ya que las muestras 142, 144 y 189 correspondían a un estudio seriado de un mismo paciente.

En la tabla nº 14 se indican los grupos de edad a que correspondían los pacientes parasitados.

Puede observarse en la misma que la criptosporidiasis es más frecuente en niños de corta edad, convirtiéndose en esporádica a partir de los 3 años.

### II. 3. 2. INFLUENCIA DEL SEXO

En las tablas nº 15 y 16 se reparten las muestras y pacientes que fueron positivos para Cryptosporidium y para Giardia intestinalis según el sexo y grupos de edad. En ambos casos se observa que si bien la población adulta no parece presentar una influencia del sexo en la prevalencia de la parasitación, en la población pediátrica parece observarse en ambos casos una mayor predisposición del sexo masculino.

EDAD	PACIENTES	
	N	%
< 12m	7	(12.28)
12 - 24m	22	(38.59)
24 - 48m	17	(29.82)
3 - 4 a	3	( 5.26)
5 - 6 a	1	( 1.75)
7 - 14a	0	( - )
> 14a	5	( 8.77)
Edad desconocida	2	( 3.50)

Tabla nº 14. Repartición de los casos positivos según los grupos de edad.

	MUESTRAS		PACIENTES
	N	%	N
ADULTOS	7	(0.75)	5
♂	3	(0.72)	3
♀	4	(0.78)	2
NIÑOS	78	(7.80)	52
♂	55	(9.35)	35
♀	23	(5.58)	17
TOTALES	85	(4.42)	57

Tabla nº 15. Parasitismo por Cryptosporidium. Repartición según edad y sexo.

	MUESTRAS		PACIENTES
	N	%	N
ADULTOS	29	(3.14)	26
♂	13	(3.14)	13
♀	16	(3.13)	13
NIÑOS	119	(11.90)	105
♂	85	(14.45)	72
♀	34	(8.25)	33
TOTALES	148	(7.69)	131

Tabla nº 16. Parasitismo por G. intestinalis. Repartición según edad y sexo.

### II. 3. 3. EVOLUCION ANUAL

La evolución anual de la prevalencia de la criptosporidiasis en la población estudiada se indica en la tabla nº 17 y la figura nº 9 . Para fines comparativos se incluyen también los datos correspondientes al parasitismo por Giardia intestinalis en la misma. En ambos casos puede observarse una heterogénea distribución de los casos positivos a lo largo del año. Si bien es de notar que los incrementos en ambas parasitosis coinciden en algunos momentos determinados (Octubre y Noviembre de 1985) esto no ocurre de forma habitual ni regular.

### II. 3. 4. PROCEDENCIA DEL PACIENTE

A excepción de 9 pacientes residentes fuera de Barcelona todos los demás casos estudiados correspondían a individuos procedentes de distintas zonas de esta ciudad. En la figura nº 10 se sitúan en el mapa de Barcelona los domicilios de cada uno de los pacientes afectados de criptosporidiasis. A priori parece observarse que dicha repartición este unicamente condicionada por el área de influencia del hospital en el que se ha realizado el estudio.

La procedencia de los otros enfermos fue la que a continuación se indica : Badalona, Cerdanyola del Vallés, Hospitalet, El Prat de Llobregat, Vic, Viladecans y Vilanova i la Geltrú. Puede observarse que también en este caso la misma es muy heterogénea.

	<u>CRYPTOSPORIDIUM</u>		<u>GIARDIA INTESTINALIS</u>	
	Muestra N	Paciente %	Muestra N	Paciente %
<b>Año 1984</b>				
Julio	2 (6.2)	2	2 (6.2)	2
Agosto	0 ( - )	0	9 (14.7)	8
Septiembre	1 (1.3)	1	2 (2.5)	2
Octubre	1 (0.8)	1	4 (3.2)	4
Noviembre	4 (3.0)	3	10 (7.6)	10
Diciembre	0 ( - )	0	4 (5.0)	4
<b>Año 1985</b>				
Enero	0 ( - )	0	11 (10.9)	11
Febrero	3 (2.8)	1	13 (12.3)	11
Marzo	1 (1.0)	1	6 (6.0)	6
Abril	0 ( - )	0	6 (8.3)	5
Mayo	5 (3.7)	3	7 (5.3)	7
Junio	4 (3.0)	3	10 (7.5)	9
Julio	7 (6.5)	1	4 (3.7)	3
Agosto	1 (1.7)	1	4 (6.8)	4
Septiembre	5 (5.4)	4	14 (15.2)	9
Octubre	26 (11.4)	19	22 (9.7)	20
Noviembre	16 (10.2)	11	12 (7.6)	10
Diciembre	9 (7.0)	6	8 (6.2)	6

Tabla nº 17. Evolución anual de los casos de criptosporidiosis y giardiasis diagnosticados.

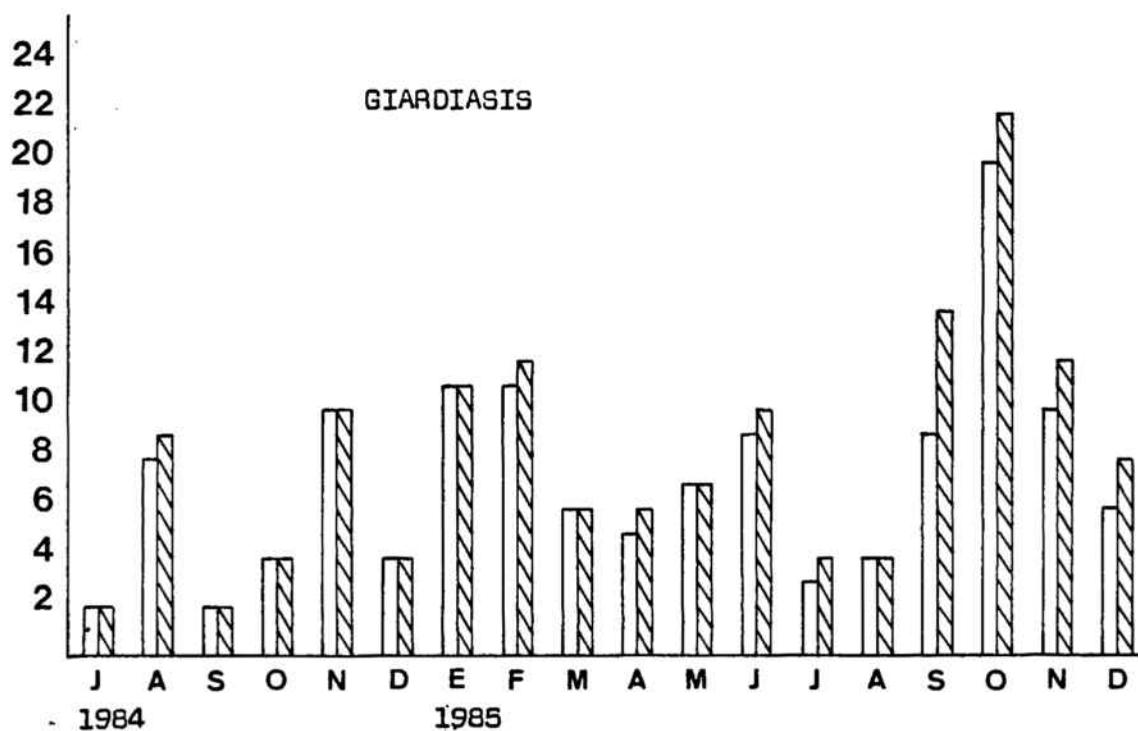
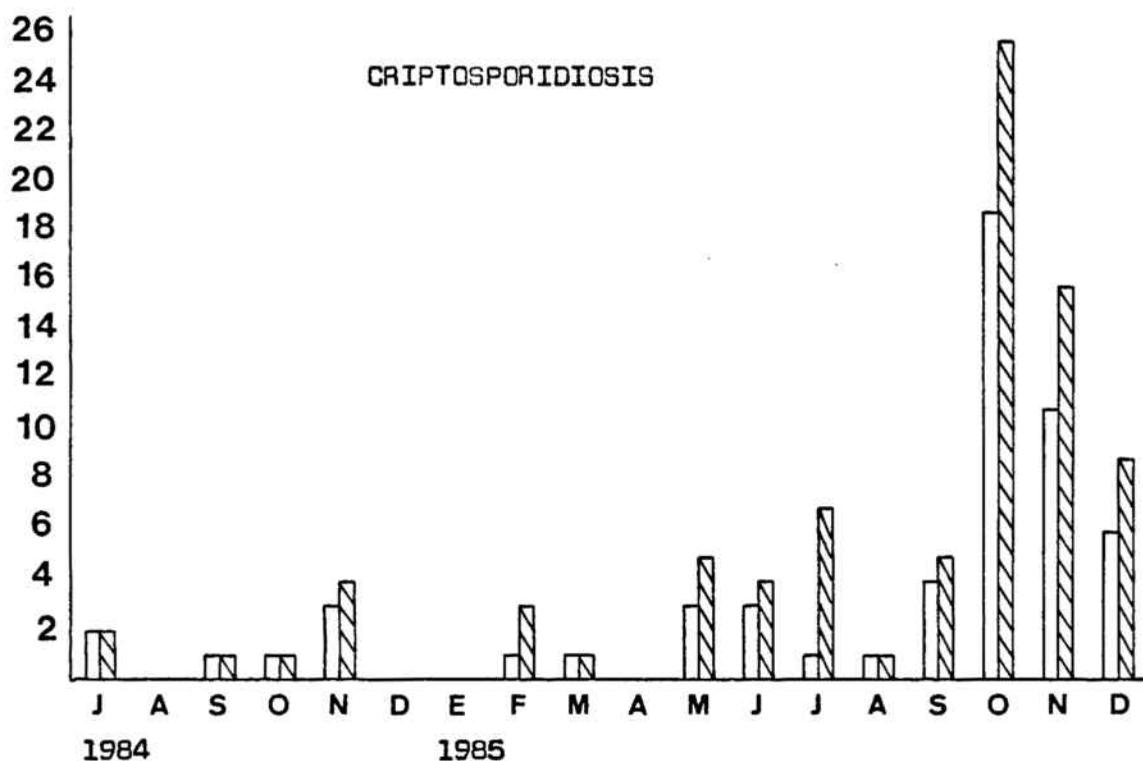


Figura nº 9. Evolución anual de los casos de criptosporidiosis y giardiasis diagnosticados.

□ Pacientes  
 ▨ Muestras

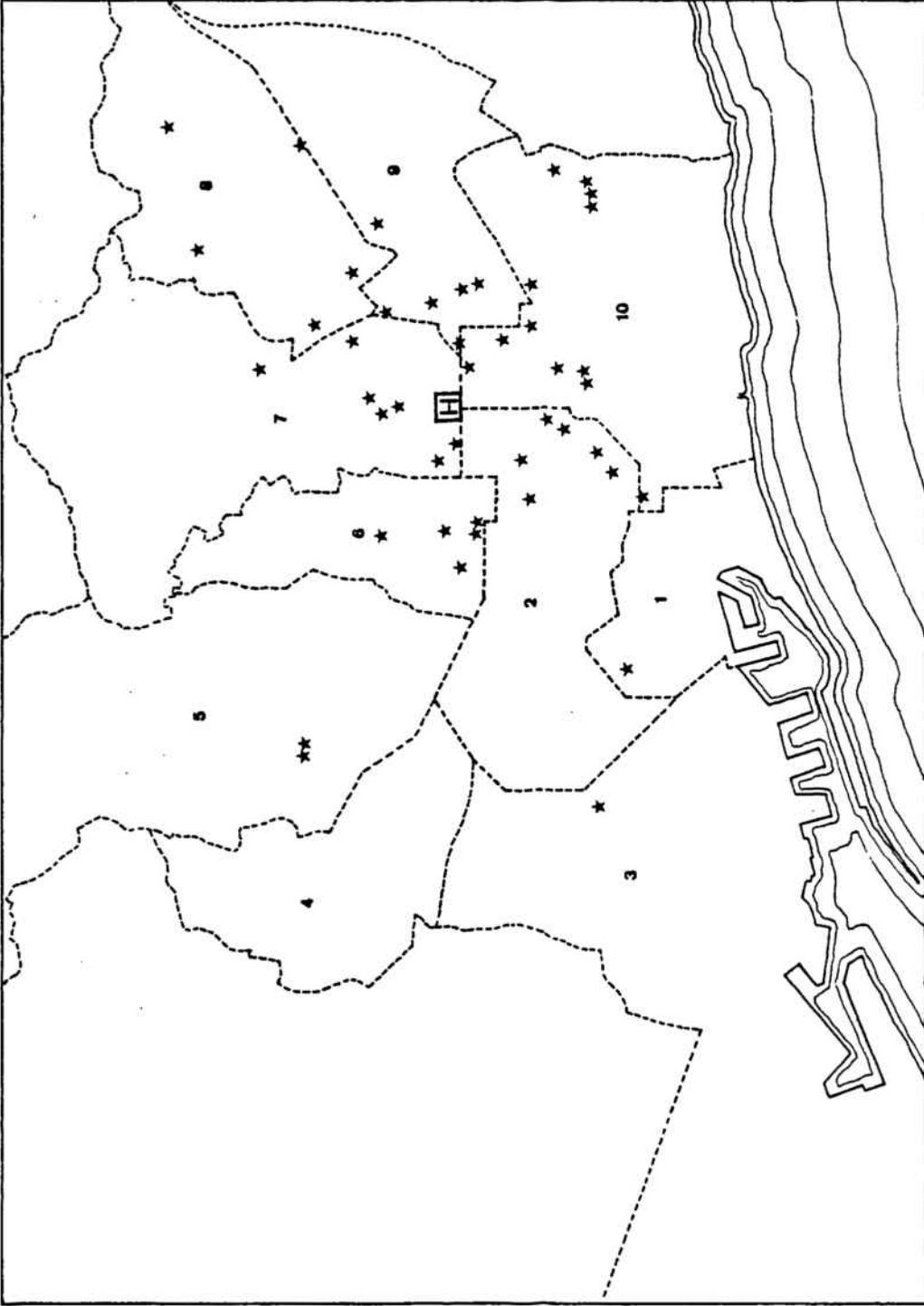


Figura nº 10. Situación urbana de los casos de criptosporidiosis detectados.

## II. 4. MANIFESTACIONES CLINICAS

En la tabla nº18 se resumen los datos obtenidos de los historiales clínicos de aquellos pacientes de los cuales se aisló Cryptosporidium. Como ya se ha indicado anteriormente 53 presentaban trastornos gastrointestinales, todos ellos afectados de diarrea más o menos aguda con un número de deposiciones variable que oscilaba entre 1-15 deposiciones diarias, aun cuando lo habitual fuera de entre 3 y 5. Tan solo en 3 casos se señalaba la presencia de moco en las heces y unicamente en 1 la presencia de sangre. Dicho paciente, de 49 años de edad, que manifestaba tener trastornos intestinales desde hacía 2 años, acudió al servicio de urgencias y tuvo que ser hospitalizado al presentar un cuadro de gastroenteritis con 12 a 15 deposiciones diarias, fiebre y deshidratación. El coprocultivo detectó también la presencia de Campylobacter jejuni. El cuadro clínico remitió espontaneamente en 3 días al cabo de los cuales fue dado de alta y los controles subsiguientes resultaron negativos.

Junto al cuadro diarreico destaca en la mayoría de los casos la presencia de un dolor abdominal agudo. De forma más esporádica se señala la presencia de fiebre sin que en la mayoría de los casos se conozca el límite alcanzado. También de forma esporádica se señala la presencia de nauseas y vómitos. La deshidratación viene indicada unicamente en 2 casos, lo mismo que la pérdida de peso.

Los otros cuatro pacientes afectados de criptosporidiasis que no presentaban cuadro de gastroenteritis tenían patologías muy variadas. En un caso se trataba de una paciente de 20 años afecta de

urticaria. En otro caso fue un paciente de 27 años con un cuadro de estreñimiento posterior a un viaje a Africa. En los otros dos casos se trataba de dos niños cuyos historiales clínicos señalaban : en el primero bronquitis, tos y otitis, si bien el exámen fecal dió como resultado la presencia de Cryptosporidium, Giardia intestinalis y Salmonella enteritidis grupo B; en el otro caso se trataba de un niño con sospecha de oxiuriasis, al manifestar dolor abdominal, tos nocturna y rechinar de dientes, sin que en la cinta de Graham se detectara la presencia de Enterobius vermicularis.

A pesar de que en todos los casos se solicitó, bien fuera telefónicamente, bien fuera a través de carta, la presencia del paciente para la realización de sucesivos controles, éstos se pudieron únicamente realizar en un número limitado de casos. Debemos de suponer que en aquellos en los cuales el paciente no se sometió a control la sintomatología debió de remitir espontaneamente en poco tiempo. El total de dichos pacientes se elevó a 29.

Algunos de los pacientes que se sometieron a control abandonaron el mismo antes de que la emisión de ooquistes se interrumpiera, por lo que no podemos en estos casos precisar el tiempo máximo que duró la misma, si bien sabemos que en 1 caso se prolongó más de una semana y en otros 2 casos más de dos semanas.

En otros 5 casos el control se demoró más tiempo del establecido por lo que si bien el mismo resultó negativo, no sabemos en que momento remitió la eliminación de ooquistes. Dichos controles se efectuaron a las dos semanas en un paciente, a las tres semanas en 2 pacientes, al mes y a los dos meses en otros 2 pacientes.

Tan solo en 20 casos se efectuaron controles semanales que permitieron observar el tiempo de eliminación de ooquistes. En 8 casos dicho tiempo fue inferior a una semana, en 3 se prolongó hasta la segunda semana, en 8 se prolongó entre 15 días y un mes, y tan solo en 1 caso fue superior al mes, sin que llegara a negativizarse.

PACIENTES CON GASTROENTERITIS	53	(92.98 %)
Diarrea	53	(92.98 %)
con moco	3	( 5.26 %)
con sangre	1	( 1.75 %)
Dolor abdominal	39	(68.42 %)
Nauseas	2	( 3.50 %)
Vómitos	6	(10.52 %)
Fiebre	8	(14.03 %)
Deshidratación	2	( 3.50 %)
Nº de deposiciones	1-15	
Pérdida de peso	2	( 3.50 %)
PACIENTES CON OTRAS PATOLOGIAS	4	( 7.01 %)
Urticaria	1	( 1.75 %)
Estreñimiento	1	( 1.75 %)
Bronquitis	1	( 1.75 %)
Tos	1	( 1.75 %)
NUMERO TOTAL DE PACIENTES	57	

Tabla nº 18. Resumen de la sintomatología presentada por los pacientes diagnosticados de criptosporidiosis.

### III. DISCUSSION

El trabajo que se presenta se planteó con el objetivo fundamental de la determinación de la incidencia de la Criptosporidiosis en la población hospitalaria Barcelonesa. Las técnicas empleadas en un principio fueron aquellas que la bibliografía consultada aconsejaba como de mayor fiabilidad y fácil ejecución, y que nos fueron también recomendadas, mediante comunicación personal, por el Dr L.J. García del C.D.C. de Atlanta (U.S.A.).

La aplicación conjunta de diversas técnicas diagnósticas para la detección de parásitos enteropatógenos incrementa siempre el número de positividades detectadas, máxime cuando estas técnicas se basan unicamente en la observación y reconocimiento de tales parásitos, en base a sus características tintoriales y morfológicas. Sin embargo la rutina hospitalaria obliga a limitar el número de procesos a seguir y de determinaciones a efectuar en función de la relación rendimiento/costo que de las mismas pueda obtenerse.

La aplicación conjunta de la tinción de Ziehl-Neelsen modificada y de Giemsa a los frotis confeccionados, previa concentración formol-éter, a tenor de los resultados obtenidos, consideramos que es innecesaria, ya que practicamente nunca la tinción de Giemsa ha permitido confirmar un diagnóstico que no lo estuviera ya con la sola utilización de la tinción con fucsina. No ha sido así en el caso inverso ya que la tinción negativa o debilmente azulada que se produce mediante el Giemsa, no permite afirmar una Criptosporidiosis, fundamentalmente cuando el número de elementos presentes es bajo.

La tinción del frotis directo en lugar del procedente del con centrado se ha mostrado como una técnica muy inconstante, dada la irregular repartición de los ooquistes en la masa fecal (Tabla nº 6). A tenor de ello y de acuerdo con JOKIPII et al (1983) y GARCIA et al (1983), consideramos que la concentración formol-éter reúne una serie de ventajas que la convierten de gran utilidad en el diagnóstico de esta parasitosis :

- a / La fijación con formol de la muestra evita el riesgo de contaminación, de gran importancia sobre todo cuando se trata de manejar muestras procedentes de individuos afectados de SIDA, en los cuales la criptosporidiosis presenta una importancia especial.
- b / La concentración formol-éter es aplicada en muchos la boratorios para la determinación de otros parásitos in testinales. Su utilización, por lo tanto, no requiere en muchos casos la introducción de una técnica adicional o, en cualquier caso, puede sustituir a otra que pa ra este fin se estuviera utilizando.
- c / La concentración formol-éter comporta la utilización de un volumen aceptable de muestra fecal (aproximadamente 1 gr), obteniéndose frotis en los que la dispersión de los ooquistes de Cryptosporidium es homogénea, facilitando por lo tanto su visualización.
- d / Los sedimentos obtenidos en la concentración formol-éter pueden ser utilizados para la confección de preparaciones permanentes, las cuales pueden ser sometidas a diversas técnicas de tinción.

La tinción con auramina, tal como se ha indicado en el apartado II. 2. 2. 3. , se ha mostrado como una técnica muy sensible, y de fácil y rápida observación cuando la muestra presentaba una tasa de infestación aceptable. En efecto, el carácter fluorescente de este colorante facilita enormemente la observación de los ooquistes, la cual puede realizarse con toda comodidad mediante un objetivo de 10x o 20x. Ello no es habitualmente posible cuando se trata de una tinción con fucsina, debido a la frecuente presencia de artefactos teñidos de rojo, que pueden inducir a confusión cuando se observa la muestra a pocos aumentos, o a la de ooquistes poco teñidos que pueden pasar desapercibidos. Sin embargo también en este caso aparecen artefactos fluorescentes de tamaño compatible con el de Cryptosporidium que dificultan la emisión del diagnóstico, sobre todo cuando se hallan en muy bajo número. WEIKEL et al (1985) recomiendan la aplicación de la tinción con auramina como técnica de screening y la posterior tinción del frotis con fucsina en caso de duda. Sin embargo, de los resultados de nuestra experiencia deducimos que este proceder dificulta más que simplifica la rutina de trabajo.

Por todo ello, al igual que GARCIA et al (1983) y a tenor de nuestra experiencia, consideramos que la concentración formol-éter, seguida de la tinción de Ziehl-Neelsen modificada, es la pauta de trabajo que proporciona mejores resultados.

El exámen de las 1923 muestras fecales de este estudio confirma la opinión ya expresada por PORTUS et al (1985) acerca la frecuencia de la criptosporidiosis humana en nuestro entorno, en individuos sin enfermedad de base, ya que han resultado positivas

el 4.4 % de las muestras examinadas, porcentaje parecido al hallado por TZIPORI et al (1983) en Australia, también en población hospitalaria afecta de gastroenteritis (4.1 %), en un estudio realizado durante un periodo de tiempo similar al presente (16 meses), y sobre un número de muestras considerable (884).

De los datos obtenidos en la bibliografía <sup>grá</sup> acerca la prevalencia de la criptosporidiosis humana, resumidos en la tabla nº 2 se desprende la variable prevalencia de esta parasitosis en los países donde la misma se ha estudiado. Ello no es, sin embargo, sorprendente si tenemos en cuenta que dichos estudios se han realizado siempre en series muy cortas y corresponden a trabajos muy puntuales.

De los resultados de la tabla nº 17 puede desprenderse la irregular incidencia de esta parasitosis durante el año, siendo habitualmente baja, mucho más que Giardia intestinalis, si bien en ocasiones, por causas no aclaradas alcanza valores altos, tales como los hallados durante los meses de Octubre y Noviembre de 1985, en los cuales resultaron positivas por Cryptosporidium el 11.4 % y 10.2 %, respectivamente, de las muestras llegadas al laboratorio, frente al 9.7 % y 7.6 % parasitadas por Giardia durante el mismo periodo. Un estudio previo y puntual realizado por SERRA et al (1984), durante la primavera de 1984 permitió detectar la presencia de Cryptosporidium en 25 de 160 muestras fecales obtenidas de distintos grupos de población (infantil y adulta; controles sanos, pacientes con gastroenteritis o con otras sintomatologías), si bien, 18 de entre las positivas correspondían a un lote de 22 procedente de una guardería infantil en la

que se había declarado un brote de gastroenteritis.

Esta tendencia de Cryptosporidium a producir brotes epidémicos (4 epidemias detectadas en guarderías infantiles de Barcelona, según datos no publicados, aportados por SERRA et al), justifica su irregular distribución anual, máxime cuando los estudios se han realizado con series cortas de pacientes. TZIPORI et al (1983) encuentran un 7 % de muestras positivas durante los meses de febrero-mayo de 1981 y tan solo un 2.7 % en el mismo periodo del año siguiente. MATHAN et al (1985) en el sur de la India hallan una mayor incidencia durante los meses de lluvia, si bien WEIKEL et al (1985) en el Brasil señalan una mayor prevalencia de casos durante la estación seca.

La heterogeneidad de las poblaciones estudiadas por los diversos autores, justifica también la heterogeneidad de resultados, aun cuando podemos afirmar que nuestros resultados, coinciden con la mayoría que afirma que la criptosporidiosis en individuos sin enfermedad de base afecta fundamentalmente a la población pediátrica.

En la tabla nº 14 puede observarse que el 80 % de los pacientes diagnosticados de criptosporidiosis tenían una edad inferior a los 3 años, lo que coincide con los datos obtenidos por MATHAN et al (1985) en el sur de la India, WEIKEL et al (1985) en el norte de Brasil y BOGAERTS et al (1984) en Africa Central.

Vemos por lo tanto que el tipo de población parasitada por Cryptosporidium es similar a la de otros enteropatógenos, fundamentalmente Salmonella y Campylobacter jejuni, que infestan habi-

tualmente a niños de hasta 2 años (MIRELIS et al, en prensa).

Si comparamos el parasitismo por Cryptosporidium y por Giardia en la población estudiada, vemos que si bien en ambos casos la población infantil es la más afectada, la incidencia de Giardia en la población adulta es mayor (Tablas nº 15 y 16).

Al relacionar el sexo con los dos grupos poblacionales establecidos (pediátrico y adulto) y sin que podamos vislumbrar la causa, notamos que en la edad adulta el sexo no parece influir en la tasa de infestación, por el contrario, sí que parece tener influencia en la edad infantil, en la cual el número de varones parasitados tanto por Cryptosporidium como por Giardia es más del doble que el número de hembras. (Tablas nº 15 y 16).

La distribución de los domicilios de los pacientes diagnosticados de criptosporidiosis no parece manifestar la existencia de un foco de infestación urbana, sino que la misma obedece al área de influencia hospitalaria del centro donde se realizó el estudio.

La importancia de Cryptosporidium como causa de diarrea parece quedar manifiesta al haberse hallado en el 6.1 % de las muestras procedentes de individuos con gastroenteritis frente a una positividad de tan solo el 0.6 % de aquellas que provenían de pacientes con otros cuadros patológicos. La diferencia es mucho menor en el caso de la giardiasis para la cual los porcentajes obtenidos fueron de un 9.4 % y 4.0 % respectivamente (Tablas nº 11 y 12). De todas maneras la frecuencia del estado de portador en esta última afección es de todos conocida.

El hecho de tratarse de un estudio realizado sobre una población hospitalaria y sin un lote de controles sanos nos impide precisar la incidencia real de esta afección en la población normal y la frecuencia del estado de portador, Sin embargo, y a tenor de los resultados obtenidos parece desprenderse que la infección por Cryptosporidium da lugar por regla general a cuadros de gastroenteritis, sobre todo en pacientes de corta edad (<3 años). Es también de señalar que la mayoría de los casos diagnosticados procedían del Servicio de Urgencias Pediátricas del Hospital.

La asociación de Cryptosporidium con otros enteropatógenos fue frecuente, en 10 ocasiones se halló asociado a Giardia intestinalis, en 4 a Campylobacter jejuni, en 3 a Salmonella y en otras tres a Dientamoeba.

Los datos resumidos en el cuadro nº 18 muestran que la criptosporidiosis en la población estudiada, sin enfermedad de base conocida, presenta unas manifestaciones clínicas que coinciden con las descritas por otros autores y ya resumidas en el capítulo I. 2. 2.

La prolongación de la emisión de ooquistes fue muy variable. Si suponemos que en los 29 pacientes que no se sometieron a control, la remisión del cuadro patológico y de la emisión de ooquistes fue rápida, podemos considerar que en más de la mitad de los pacientes ésta se produjo en menos de una semana, desde el momento en que se diagnosticó la criptosporidiosis, si bien en muchos casos cuando ello se realizó el cuadro de gastroenteritis llevaba varios días e incluso semanas de evolución. En 11 ocasiones

(20 % de los casos) la eliminación de ooquistes se prolongó más de 15 días desde el momento de su hallazgo, si bien debe señalarse que en algunos de estos casos los pacientes sometidos a control estaban ya totalmente asintomáticos y las tasa de infestación fecal era muy baja. Debemos hacer mención que ninguno de los pacientes diagnosticados recibió una terapia específica, siendo únicamente sometidos a dieta astringente o tratamiento sintomático.

Si bien los resultados obtenidos no nos permiten ser concluyentes acerca la prolongación del cuadro de gastroenteritis producido por Cryptosporidium, y del tiempo que se prolonga la eliminación de ooquistes, permaneciendo o no en estado de portador, a tenor de los mismos podemos indicar que al igual que MATHAN et al (1985) e ISAACS et al (1985), consideramos que Cryptosporidium se presenta muy frecuentemente en individuos con diarreas crónicas de larga duración, y que la eliminación de ooquistes en la mayoría de los casos se prolonga como mínimo unos 10-15 días, aún en ausencia de cuadro patológico.

#### IV. CONCLUSIONES

Relacionadas con las técnicas diagnósticas :

- 1/ La repartición de Cryptosporidium en la masa fecal es muy irregular por lo que los resultados obtenidos del frotis directo son muy variables. Es aconsejable por lo tanto la utilización de técnicas de concentración.
- 2/ La tinción de Ziehl-Neelsen modificada permite una fácil visualización y reconocimiento del parásito en base a sus características morfológicas y tintoriales.
- 3/ La tinción de Giemsa no aporta ninguna ventaja a la anterior, antes bien, la tinción negativa que se produce en la mayoría de los casos dificulta el reconocimiento específico del parásito.
- 4/ La tinción con auramina es una técnica muy sensible y que facilita la visualización del parásito, si bien la presencia de artefactos fluorescentes da lugar a errores de lectura.
- 5/ De los resultados obtenidos en este estudio concluimos que la concentración formol-éter de Ritchie, acompañada de la tinción con fucsina fenicada es un buen método para el diagnóstico de la criptosporidiosis humana.

Relacionadas con la epidemiología :

- 1/ Cryptosporidium es un protozoo frecuente en nuestro medio, fundamentalmente entre la población afecta de gastroenteritis, en la cual se ha detectado en el 6.1 % de las muestras

estudiadas.

- 2/ La positividad se incrementa en la edad infantil (9.2 % de muestras positivas, en niños con trastornos intestinales), habiendo correspondido el 80 % de las positividades a niños menores de 3 años.
- 3/ Dos tercios de las muestras positivas para Cryptosporidium han correspondido a niños del sexo masculino, y tan solo el tercio restante a niños del sexo femenino.
- 4/ La distribución anual de la criptosporidiosis es irregular, si bien parece que ello no obedece a una marcada estacionalidad, sino a brotes epidémicos de origen, por el momento, desconocido.
- 5/ La repartición urbana de la criptosporidiosis en Barcelona no parece estar focalizada.

Relacionadas con la sintomatología :

- 1/ La criptosporidiosis en niños de corta edad y sin enfermedad de base se caracteriza por un cuadro de diarrea más o menos aguda, con heces habitualmente pastosas, raramente con moco y sangre. El número de deposiciones diarias es variable si bien, por lo general, oscila entre 3 y 5. El cuadro diarreico se acompaña generalmente de dolor abdominal agudo, más raramente de nauseas y vómitos, lo mismo que de fiebre. De forma muy esporádica llega a producirse des

hidratación y pérdida de peso.

La duración de la eliminación de ooquistes es variable, desde una semana a más de un mes, con remisión espontánea de la misma.

**V. BIBLIOGRAFIA**

- ALPERT, G. ; BELL, L.M. ; KIRKPATRICK, C.E. et al. Cryptosporidiosis in a day-care center. N. Engl. J. Med., 311 : 860-861 , 1984.
  
- ALLEN, A.V.H. y RIDLEY, D.S. - Futher observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. J. Clin. Pathol.; 23 : 545-546 , 1970.
  
- American Society of Clinical Pathologists. Comision on Continuing Education. Microbiology Check Sample nº MB 81-6 , 1984.
  
- ANDERSON, B.C. - Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. ; 178 : 982-984 , 1981.
  
- ANDERSON, B. ; DONNDELINGER, T. ; WILKINS, R.M. et al. - Cryptosporidiosis in a veterinary student. J. Am. Vet. Med. Assoc. 180 : 408-409 , 1982.
  
- ANGUS, K.W. ; APPLEYARD, W.T. ; MENZIES, J.D. et al. - An outbreak of diarrhoea associated with cryptosporidiosis in naturally reared lambs. Vet. Rec., 110 : 129-130 , 1982.
  
- BAXBY, D. ; HART, C.A. and TAYLOR, C. - Human cryptosporidiosis : a possible case of hospital cross infection. Br. Med. J. 287 : 1760-1761 , 1983.
  
- BAXBY, D. ; GETTY, B. ; BLUNDELL, N. and RATCLIFFE, S. - Recognition of whole Cryptosporidium oocysts in feces by negative staining and electron microscopy. J. Clin. Microbiol., 19 : 566-567 , 1984.

- BLAGBURN, B.E. y CURRENT, W.L. - Accidental infection of a researcher with human Cryptosporidium. J. Infect. Dis., 148 : 772-773 , 1983.
  
- BOGAERTS, J. ; LEPAGE, P. ; ROUVROY, D. and VANDEPITTE, J. - Cryptosporidium spp., a frequent cause of diarrhea in Central Africa. J. Clin. Microbiol., 20 : 874-876 , 1984.
  
- BRINES, J. ; GARCIA DE LOMAS, J. ; GARCIA-VILA, A. et al. - In testinal infection by Cryptosporidium in three children with abdominal pain and chronic diarrhoea. Second Joint Meeting Pediatric Research Societies in Europa. Munich, 1985.
  
- BRONSDON, M.A. - Rapid dimethyl sulfoxide-modified acid-fast stain of Cryptosporidium oocysts in stool specimens. J. Clin. Microbiol., 19 : 952-953 , 1984.
  
- CAMPBELL, I. ; TZIPORI, S. ; HUTCHISON, G. and ANGUS, K. W. - Effect of disinfectants on survival of Cryptosporidium oocysts. Vet. Rec., 111 : 414-415 , 1982.
  
- CAMPBELL, P.N. y CURRENT, W.L. - Demonstration of serum antibodies to Cryptosporidium sp. in normal and immunodeficient humans with confirmed infections. J. Clin. Microbiol., 18 : 165-169 , 1983.
  
- Centers for Disease Control. - Cryptosporidiosis : Assessment of chemotherapy of males with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Morbid. Mortal. Weekly Rep., 31 : 589-592 , 1982.

- COLLIER, A.C. ; MILLER, R.A. and MEYERS, J.D. - Cryptosporidiosis after marrow transplantation : Person to person transmission and treatment with spiramycin. Ann. Intern. Med., 101 : 205 - 206 , 1984.
  
- CURRENT, W.L. y LONG, P.L. - Development of Human and Calf Cryptosporidium in chicken embryos. J. Infect. Dis., 148 : 1108 -1113 , 1983.
  
- CURRENT, W.L. ; REESE, N.C. ; ERNST, J.V. et al. - Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons. N. Engl. J. Med., 308 : 1252-1257 , 1983.
  
- CURRENT, W.L. - Human cryptosporidiosis. Microbiology 1984 , A.S.C.M. 220-223 , 1984.
  
- CURRENT, W.L. y HAYNES, T.B. - Complete development of Cryptosporidium in cell culture. Science, 224 : 603-605 , 1984.
  
- CHIAMPI, N.P. ; SUNDBERG, R.D. ; KLOMPUS, J.P. and WILSON, A.J. - Cryptosporidial enteritis and pneumocystis pneumonia in a homosexual man. Human Pathology, 14 : 734-737 , 1983.
  
- D'ANTONIO, R.G. ; WINN, R.E. ; TAYLOR, J.P. et al. - A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. Ann. Intern. Med., 103 : 886-888 , 1985.
  
- DELUOL, A.M. ; CENAC, J. ; MATHERON, S. et al. - La cryptosporidiose II. Diagnostic biologique. Ann. Biol. Clin., 42 : 399-405 , 1984.

- FORGACS, P. ; TARSHIS, A. ; MA, P. et al. - Intestinal and bronchial cryptosporidiosis in an immunodeficient homosexual man. Ann. Intern. Med., 99 : 793-794 , 1983.
  
- GARCIA, L.S. ; BREWER, T.C. ; BRUCKNER, D.A. and SHIMIZU, R. Y. - Acid-fast staining of Cryptosporidium from human fecal specimens. Clin. Microbiol. Newsletter, 5 : 60-62 , 1983.
  
- GARCIA, L.S. ; BRUCKNER, D.A. ; BREWER, T.C. and SHIMIZU, R. Y. - Techniques for the recovery and identification of Cryptosporidium oocysts from stool specimens. J. Clin. Microbiol. 18 : 185-190 , 1983.
  
- HEINE, J. ; POHLENZ, J.F.L. ; MOON, H.W. and WOODE, G.N. - Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with Cryptosporidium species. J. Infect. Dis., 150 : 768-775, 1984.
  
- HENRIKSEN, S.A. - Differential staining of cryptosporidiosis in smears. X Symposium of the Scandinavian Society of Parasitology, Kage (Dinamarca) , 1981.
  
- HENRIKSEN, S.A. y POHLENZ, J.F.L. - Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Vet. Scand. , 22 : 594-596 . 1981.
  
- HOLTEN-ANDERSEN, W. ; GERSTOFT, J. and HENRIKSEN, S.A. - Human cryptosporidiosis. N. Engl. J. Med., 24 : 1325-1326 , 1983.

- ISAACS, J. ; HUNT, G.H. ; PHILLIPS, A.D. et al. - Cryptosporidiosis in immunocompetent children. J. Clin. Pathol., 38 : 76-81 , 1985.
  
- JOKIPII, L. ; POHJOLA, S. and JOKIPII, A.M.M. - Cryptosporidium : un hallazgo frecuente en pacientes con sintomatología gastrointestinal. Lancet (Ed. Esp.), 3 : 422-425 , 1983.
  
- JOKIPII, A.M.M. ; HEMILA, M. and JOKIPII, L. - Prospective study of acquisition of Cryptosporidium , Giardia lamblia, and gastrointestinal illness. Lancet ii : 487-489 , 1985.
  
- KOCH, K.L. ; SHANKEY, T.V. ; WEINSTEIN, G.S. et al. - Cryptosporidiosis in a patient with hemophilia, common variable hypogammaglobulinemia, and the Acquired Immunodeficiency Syndrome. Ann. Intern. Med., 99 : 337-340 , 1983.
  
- KOCH, K.L. ; DEBRA, J.P. ; ABER, R.C. and CURRENT, W.L. - Cryptosporidiosis in hospital personnel. Ann. Intern. Med., 102 : 593-596 , 1985.
  
- LE CHARPENTIER, Y. ; GALIAN, A. ; MESSING, B. et al. - Diagnostic ultrastructural d'une infection intestinale humaine à Cryptosporidium sp. Ann. Pathol., 336-338 , 1982.
  
- LEVINE, N.D. - Taxonomy and review of the coccidian genus Cryptosporidium (Protozoa, Apicomplexa). J. Protozoology, 31: 94-98 , 1984.

- LOPEZ-BREA, M. ; GARCIA-PICAZO, L. ; DEL REY, M. and JIMENEZ, M.L. - Cryptosporidium in stool specimens in Madrid. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 79 : 422-423 , 1985.
- MA, P. y SOAVE, R. - Three step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. J. Infect. Dis., 147 : 824-828 , 1983.
- MASON, R.W. ; HARTLEY, W.J. and TILT, L. - Intestinal cryptosporidiosis in a kid goat. Aust. Vet. J., 57 : 386-388 , 1981.
- MATA, L. ; BOLAÑOS, H. ; PIZARRO, D. and VIVES, M. - Criptosporidiosis en niños de Costa Rica. Rev. Biol. Trop., 32 : 129-135 , 1984.
- MATA, L. ; BOLAÑOS, H. ; PIZARRO, D. and VIVES, M. - Cryptosporidiosis in children from some highland Costa Rica rural and urban areas. Am. J. Trop. Med. Hyg., 33 : 24-29 , 1984.
- MATHAN, M.M. ; VENKATESAN, S. ; GEORGE, R. et al. - Cryptosporidium and diarrhoea in Southern Indian children. Lancet : ii 1172-1175 , 1985.
- McNABB, S.J.N. ; HENSEL, D.M. ; WELCH, D.F. et al. - Comparison of sedimentation and flotation techniques for identification of Cryptosporidium sp. Oocysts in a large outbreak of human diarrhea. J. Clin. Microbiol., 22 : 587-589 , 1985.
- MEISEL, J.L. ; PERERA, D.R. ; MELIGRO, C. et al. - Overwhelming watery diarrhea associated with a Cryptosporidium in an immunosuppressed patient. Gastroenterology, 70 : 1156-1160 , 1976.

- MILLER, R.A. ; WASSERHEIT, J.N. ; KIRIHARA, J. ; COYLE, M.B. - Detection of Cryptosporidium oocysts in sputum during screening for Mycobacteria. J. Clin. Microbiol., 20 : 1192-1193 , 1984.
- MIRELIS, B. ; PORTUS, M. ; RABELLA, N. et al. - Etiología de las gastroenteritis en un hospital universitario en el año 1983. Enf. Infect. (en prensa).
- NIME, F.A. ; BUREK, J.D. ; PAGE, D.I. et al. - Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan Cryptosporidium. Gastroenterology, 70 : 592-598 , 1976.
- PORTNOY, D. ; WHITESIDE, M.E. ; BUCKLEY, E. and Mac LEOND, C.L. Treatment of intestinal cryptosporidiosis with spiramycin. Ann. Intern. Med., 101 : 202-204 , 1984.
- PORTUS, M. ; SERRA, T. ; BOTET, J. and GALLEGU, J. - Criptosporidiosis humana en España. Med. Clin., 84 : 56 , 1985.
- PTILIK, S.D. ; FAINSTEIN, V. ; RIOS, A. et al. - Cryptosporidial cholecystitis. N. Engl. J. Med., 308 : 967-968 , 1983.
- PITLIK, S.D. ; FAINSTEIN, V. ; GARZA, D. et al. - Human cryptosporidiosis: Spectrum of disease. Arch. Intern. Med., 143 : 2269-2275 , 1983.
- RABE et al. Abst. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1984. (Toma do de MILLER, 1984)
- RATNAM, S. ; PADDOCK, J. ; McDONALD, E. et al. - Occurrence of Cryptosporidium oocysts in fecal samples submitted for routine microbiological examination. J. Clin. Microbiol., 22 : 402-404 1985.

- REDUKER, D.W. ; SPEER, C.A. and BLIXT, J.A. - Ultrastructure of Cryptosporidium parvum oocysts and excysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy. J. Protozool., 32 : 708-711 , 1985.
- REESE, N.C. ; CURRENT, W.L. ; ERNST, J.V. et al. - Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats. Am. J. Trop. Med. Hyg. , 31 : 226-229 , 1982.
- RITCHIE, L.S. - An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Bull. U.S. Army. Med. Dept., 8 : 326 , 1948.
- ROJO VAZQUEZ, F.A. ; GASS, A. and ALUNDA, J.M<sup>a</sup>. - Denuncia en España de la criptosporidiosis ovina. IV Congreso Nacional de Parasitología. Tenerife, 1985.
- SHULTZ, M.G. - Emerging zoonosis. N. Engl. J. Med., 308 : 1285-1286 , 1983.
- SERRA, T. ; BOTET, J. ; PORTUS, M. and GALLEGU, J. - La criptosporidiosis humana en España. Estudio preliminar. IV Reunión anual de la Asociación de Parasitólogos. Madrid, 1984.
- SHERWOOD, D. ; ANGUS, K.W. ; SNOOGRASS, D.R. and TZIPORI, S. - Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. Infect. Immun., 38 : 471-475 , 1982.
- SMITHWICK, R.W. - Laboratory Manual for acid-fast microscopy. U.S. Department of Health, Education, and Welfare. Public Health Service. Centers for Disease Control. Atlanta, Georgia. 1976.

- SOAVE, R. ; DANNER, R.L. ; HONIG, C.L. et al. - Cryptosporidiosis in homosexual men. Ann. Intern. Med., 100 : 504-511 , 1984.
- STEMMERMANN, G.N. ; HAYASHI, T. ; GLOBER, G.A. et al. - Cryptosporidiosis. Report of a fatal case complicated by disseminated toxoplasmosis. Am. J. Med., 69 : 637-642 , 1980.
- TYZZER, E.E. - A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 5 : 12-13 , 1907.
- TYZZER, E.E. - Cryptosporidium parvum (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Archiv. Protistenk., 26 : 394-412 , 1912.
- TZIPORI, S. ; ANGUS, K.W. ; CAMPBELL, I. and GRAY, E.W. - Cryptosporidium : Evidence for a single-species genus. Infect. Immun., 30 : 884-886 , 1980.
- TZIPORI, S. ; ANGUS, K.W. ; CAMPBELL, I. and SHERWOOD, D. - Diarrhea in young red deer associated with infection with Cryptosporidium. J. Infect. Dis., 144 : 170-175 , 1981.
- TZIPORI, S. y CAMPBELL, I. - Prevalence of Cryptosporidium antibodies in ten species of animals. J. Clin. Microbiol., 14 : 455-456 , 1981.
- TZIPORI, S. - Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiol. Rev., 47 : 84-96 , 1983.
- TZIPORI, S. ; SMITH, M. ; BIRCH, C. et al. - Cryptosporidiosis in hospital patients with gastroenteritis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32 : 931-934 , 1983

- UPTON, S.J. y CURRENT, W.L. - The species of Cryptosporidium (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. J. Parasit. 71 : 625-629 , 1985.
- WEIKEL, C.S. ; JOHNSTON, L.I. ; DE SOUSA, M.A. and GUERRANT, R. L. - Cryptosporidiosis in Northeastern Brazil: Association with sporadic diarrhea. J. Infect. Dis., 151 : 963-965 , 1985.
- WOLFSON, J.S. ; CYRUS, Ph.D. ; HOPKINS, M.D. et al. - An association between Cryptosporidium and Giardia in stool. N. Engl. J. Med., 310 : 788-, 1984.
- WOLFSON, J.S. ; RICHTER, J.M. ; WALDRON, M.A. et al. - Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. N. Engl. J. Med., 312 : 1278-1282 , 1985.
- ZIERDT, W.S. - Concentration and identification of Cryptosporidium sp. by use of a parasite concentrator. J. Clin. Microbiol. 20 : 860-861 , 1984.