



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

DETECCIÓN DE *Cryptosporidium* sp. POR DIFERENTES TÉCNICAS
DIAGNÓSTICAS EN PACIENTES INMUNOSUPRIMIDOS. SAHUAPA,
CUMANÁ, ESTADO SUCRE
(Modalidad: Tesis de Grado)

NAIRUSKA DEL VALLE GOITÍA MORENO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2013

DETECCIÓN DE *Cryptosporidium* sp. POR DIFERENTES TÉCNICAS
DIAGNÓSTICAS EN PACIENTES INMUNOSUPRIMIDOS. SAHUAPA,
CUMANÁ, ESTADO SUCRE

APROBADO POR:

Profa. Del Valle Guilarte
Asesora

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	9
Muestra poblacional.....	9
Obtención de la muestra	9
Procedimiento técnico.....	9
Interpretación de resultados	11
Análisis de datos	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
CONCLUSIONES	20
RECOMENDACIONES.....	21
BIBLIOGRAFÍA	22
ANEXOS	27
APÉNDICES	32
HOJAS DE METADATOS	34

DEDICATORIA

A JEHOVÁ Dios sobre todas las cosas.

A mis padres, quienes me brindaron en todo momento su apoyo moral y material para llegar a esta meta.

A mis hermanos Jorge, Luis y Veruska, mis sobrinos Jenifer, Daniel, Enrique y Santiago, mi esposo Eliéser Salazar, mis tías (os) y primas (os). También a mis amigas (os), que han estado a mi lado siempre ayudándome y dándome su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que me ayudaron no sólo en este trabajo de grado, sino también, a lo largo de toda mi carrera:

A la profesora Del Valle Guilarte, por brindarme su tiempo, ideas y sugerencias en la realización de este trabajo.

A la licenciada Ninomar Mundaray, por su amistad, confianza y gran ayuda en la realización de este trabajo.

A los profesores Elvia Michelli y Erasto Bastardo, por brindarme su colaboración, conocimientos, confianza y apoyo.

A las licenciadas Georgina Basmadji, Dianny Martínez, Diorelys González y Patricia González. ¡Gracias!.

Al personal del Laboratorio Clínico Universitario I y al personal del Laboratorio Clínico Jesús de Nazareth, por permitir el procesamiento de las muestras en sus instalaciones.

Al personal de salud que labora en el Departamento de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, en especial a las enfermeras: Ana, Iraima, Vicent, y las doctoras Maribel Morillo y María Teresa de Freitas por la colaboración prestada, fundamental en la realización de este estudio.

A los profesores: Elvia Michelli y Erasto Bastardo por brindarme su ayuda, conocimientos, confianza y apoyo.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. <i>Cryptosporidium</i> sp. diagnosticado parasitológicamente en las muestras fecales de pacientes inmunosuprimidos de la Unidad de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.....	13
Tabla 2. Resumen estadístico de las densidades ópticas del estuche comercial ELISA (Diagnostic Automation, Inc.) utilizado para la detección de antígenos de <i>Cryptosporidium</i> sp. en las muestras fecales de pacientes inmunosuprimidos de la Unidad de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.	16
Tabla 3. Tabla de contingencia de casos de <i>Cryptosporidium</i> sp. detectados por el método de Ziehl Neelsen modificado y el estuche comercial ELISA (Diagnostic Automation, Inc.), en las muestras fecales de pacientes inmunosuprimidos de la Unidad de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (SAHUAPA), de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.	18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografía de ooquiste de <i>Cryptosporidium</i> sp. teñido con el método de Ziehl Neelsen modificado (1 000X), observado en las muestras fecales de pacientes inmunosuprimidos de la Unidad de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.	14
---	----

RESUMEN

En el presente estudio se compararon métodos diagnósticos para la detección de *Cryptosporidium* sp. Se evaluaron 35 muestras fecales de pacientes adultos inmunosuprimidos, provenientes de la Unidad de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (SAHUAPA), de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Las muestras se analizaron parasitológicamente con examen directo con solución salina fisiológica al 0,85% y lugol, método de Sheather modificado y tinción de Ziehl Neelsen modificado; para detectar coproantígenos de *Cryptosporidium* sp. se usó el estuche comercial ELISA (Diagnostic Automation, Inc.). Este procedimiento de ELISA detectó la mayor cantidad de muestras positivas 20,00% seguido de Ziehl Neelsen modificado 14,29%, el examen directo y el método de Sheather modificado no detectaron ooquistes del parásito. Se encontró que la técnica de ELISA reflejó una sensibilidad de 100%, especificidad de 93,33%, un valor predictivo positivo de 71,43% y un valor predictivo negativo de 100%. El índice de concordancia kappa entre el estuche comercial ELISA y el método parasitológico de Ziehl Neelsen modificado fue de 0,80, lo que significa que para el diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. puede utilizarse uno u otro método, aunque el ELISA resultó ser más sensible para la identificación de *Cryptosporidium* sp. especialmente, cuando se requieren resultados rápidos, confiables y masivos.

INTRODUCCIÓN

Cryptosporidium parvum es un parásito patógeno que ocasiona problemas de salud a nivel mundial, principalmente, en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Aunque se reconoció como patógeno de humanos en 1976, desde 1982, el número de casos de diarrea asociados con el parásito se incrementó en gran medida como parte de la epidemia de SIDA (Juraneck, 1995).

Este parásito es el causante de la cryptosporidiosis, una de las infecciones parasitarias emergentes del siglo XX considerada hoy como un problema de salud pública (Velasco y García, 2002). Su morbilidad depende del grado de inmunocompromiso del organismo, edad y estado nutricional, del número de parásitos causantes de la infección y del medio ambiente, ya que los ooquistes mantienen su infectividad durante un tiempo relativamente largo. En pacientes inmunocompetentes la infección es usualmente autolimitada, pero en el paciente inmunocomprometido, la infección a menudo se prolonga, provocando debilitamiento y ocasionalmente, diarreas fatales (Pettoello-Mantovani *et al.*, 1995).

La enfermedad se registra, principalmente, como una parasitosis gastrointestinal, cuya principal vía de contagio es la fecal-oral, siendo el agua un importante agente para su diseminación, aunque también utiliza otras vías de contagio, persona-persona y/o animal-persona. Se estima que es posible encontrar ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en, aproximadamente, el 90,00% de las muestras de aguas residuales, en el 75,00% de las aguas fluviales y en el 28,00% del agua potable (Arcay y Bruzual, 1993; Ronald, 2004).

Cryptosporidium sp. es monoxeno (completa su ciclo en un solo hospedero). El período de prepatencia (tiempo entre la infección y la eliminación de ooquistes), varía de 2 a 14 días, en la mayoría de los animales domésticos, mientras que el período de patencia (duración de la excreción de ooquistes), es variable dentro de las diferentes especies de hospederos, desde varios días a varios meses. En los pacientes con SIDA, la eliminación de ooquistes puede ser indefinida (Clavel, 1996).

La persona o animal parasitado expulsa los ooquistes (forma infectante del parásito) al exterior mediante las heces fecales. La ingestión de los ooquistes por algún hospedero potencial, da origen a la infección. Después de la ingestión, cuando los ooquistes llegan al tracto gastrointestinal, se produce la desenquistación, se liberan esporozoítos que parasitan las células epiteliales, y el desarrollo de los diferentes estadios del parásito ocurren intracelularmente. A partir de los esporozoítos se diferencian los trofozoítos, que se multiplican asexualmente hasta merontes tipo I (6-8 núcleos) y merontes tipo II (4 núcleos). Los primeros producen de 6 a 8 merozoítos que generan autoinfección y los otros, sólo 4 merozoítos, que invaden nuevas células epiteliales y se transforman en microgametos y macrogametos. Los gametos se fusionan y crean un cigoto, que se desarrolla por esporulación en el hospedero infectado, en él se producen esporozoítos potencialmente infectivos para constituir nuevos ooquistes; alrededor del 80,00% de estos ooquistes forman una pared gruesa, dura y resistente con dos capas, son liberados al medio ambiente donde diseminan la infección. Estudios experimentales realizados con ratones infectados, han demostrado que el 20,00% restante desarrolla una pared delgada, con una sola unidad de membrana, la cual se rompe tan pronto los ooquistes salen de los enterocitos. Cada generación de parásitos se desarrolla y madura en un período de 12 a 24 horas (Dupont *et al.*, 1995; Brasil *et al.*, 2000; Ronald, 2004).

La dosis infectiva de *Cryptosporidium* sp. en humanos, es aproximadamente de 132 ooquistes, aunque un voluntario fue infectado con tan sólo 30. Parece que, tanto el hombre como los animales tienen distintos grados de susceptibilidad a este parásito y el inóculo probablemente, puede variar de un individuo a otro (Dupont *et al.*, 1995).

Aún no se comprende a la perfección el mecanismo por el que *Cryptosporidium* sp. produce diarrea en el humano. La arquitectura de las vellosidades de la mucosa intestinal usualmente permanece normal, pero pueden ocurrir alteraciones histológicas inespecíficas. Se ha observado atrofia leve o moderada de las vellosidades, aumento de tamaño de las criptas e infiltrado inflamatorio de la lámina propia, con polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas. En infecciones

severas pueden observarse anomalías morfológicas duodenales intensas, con aplastamiento de las vellosidades (Anderson *et al.*, 1982; Chacín, 1995; Clark y Sears, 1996).

El parásito se sitúa preferiblemente sobre las microvellosidades y criptas del intestino delgado dentro de las membranas del exterior, en este sitio la mucosa demuestra alteraciones e infiltrado celular en la lámina propia, causando mala absorción, diarrea secretora e hiperplasia celular (Genta *et al.*, 1993).

Tras un período de incubación que oscila entre 5 y 28 días, el síntoma más frecuente es la diarrea acuosa profusa, que puede ser de tipo colérico y en algunos casos hay presencia de moco en las heces. Otros síntomas son dolor abdominal, náuseas, fiebre ligera, y astenia. Las manifestaciones clínicas de la cryptosporidiosis intestinal están directamente relacionadas con el estado inmunológico del hospedero. Así, en el individuo inmunocompetente se presenta como una diarrea autolimitada, que en algunos casos puede ser de gran intensidad y durar de una a dos semanas, pero que se resuelve sin tratamiento específico. Todo lo contrario ocurre en el sujeto inmunosuprimido, quien desarrolla una diarrea crónica acuosa que pone en peligro su vida, observándose más de 70 evacuaciones por día y perdiendo hasta 17 litros de líquido intestinal diarios. Por ello, la forma más efectiva de combatirla es mediante tratamiento sintomático, rehidratando al paciente y aumentando sus defensas, ya que no hay medicina específica ni vacuna para su curación, siendo el diagnóstico efectivo la principal herramienta para restablecer la salud en el paciente (Clark y Sears, 1996; Stuart, 2000).

En los casos de inmunosupresión grave, el microorganismo invade el conducto biliar y produce fiebre, ictericia, dolor en hipocondrio derecho y vómito. En casos poco frecuentes, los pacientes con SIDA padecen cryptosporidiosis pulmonar, colecistitis alitiásica e incluso pancreatitis (Antunes, 1993; Kim, 1994).

La creciente amenaza de *Cryptosporidium* sp., como agente causal de afecciones intestinales, se debe a varios factores; los ooquistes miden de 4 - 6 μm de diámetro,

demasiado pequeños como para ser eliminados por los filtros de arena que se emplean en las plantas de tratamiento de agua. Además, *Cryptosporidium* sp. es extremadamente resistente a desinfectantes como el hipoclorito de sodio (cloro doméstico) (Ronald, 2004). El problema se agudiza aún más por la baja dosis infectante requerida y por el hecho de que, en un ambiente húmedo los ooquistes pueden mantenerse viables durante 2 a 6 meses (Casemore, 1990). Sin embargo, la supervivencia de los ooquistes disminuye con las temperaturas extremas y con la desecación. La congelación a -20°C durante 72 horas, o mediante calentamiento entre 45-55°C, durante 20 minutos reducen considerablemente la infectividad. La desecación a temperatura ambiente de una suspensión acuosa de ooquistes durante 4 horas elimina la viabilidad y se ha demostrado que la mayoría de los desinfectantes de uso doméstico en otros ambientes, como el hospitalario y en guarderías infantiles, tienen poco efecto sobre los ooquistes de *Cryptosporidium* sp. (Harp, 1996; Prescott *et al.*, 2000).

Muchas investigaciones coinciden en señalar que la cryptosporidiosis es una parasitosis de amplia distribución geográfica existente en todos los continentes, en países industrializados y tercermundistas, pero es más frecuente en países en vías de desarrollo. En países industrializados parece ser que la infección humana es más frecuente en el medio rural, mientras que en los países subdesarrollados es más común en el medio urbano, que tiene una mayor concentración demográfica; sin embargo, su epidemiología en muchos aspectos no ha sido aclarada totalmente (Collier *et al.*, 1984; Current y García, 1991).

En un estudio realizado por Hart *et al.* (1984) en Australia, con 1 967 niños menores de diez años, se encontró que 27 de los casos (1,40%) fueron positivos para el coccidio y las características macroscópicas de las heces eran predominantemente de color verde y consistencia acuosa.

En el laboratorio de microbiología del hospital general penitenciario en Madrid, Alonso *et al.* (1995) llevó a cabo una investigación para determinar la prevalencia y las características clínicas de las parasitosis intestinales más frecuentes. Se estudiaron

un total de 131 pacientes con diarrea, los parásitos encontrados con mayor frecuencia fueron: Uncinarias (23,00%), *Giardia* sp. (21,00%) y *Cryptosporidium* sp. (20,00%).

En Estados Unidos, se han realizado varios estudios sobre *Cryptosporidium* sp. En 1984, en el estado de Texas, se registró la primera epidemia por *C. parvum*, causada por la contaminación del agua de pozo que generó 2 006 enfermos; en 1987 se presentó la primera epidemia asociada al agua de río, en Carrollton, Georgia, con 12 960 enfermos. Un estudio epidemiológico de la cryptosporidiosis durante 10 años en una población con SIDA del condado de Los Ángeles, California, que abarcó casi 17 000 sujetos, reportó una incidencia global de 3,80%. En 1993, ocurrió una epidemia de cryptosporidiosis en Milwaukee, Wisconsin, que afectó a 403 000 personas y provocó la muerte de más de 100 personas. Ese mismo año, se asentaron dos casos importantes, el primero en Maine, donde se investigó una epidemia por contaminación de sidra fresca de manzana, con 150 casos reportados y el segundo fue en las Vegas, Nevada, donde la epidemia surgió en una población con las instalaciones más modernas de agua potable en el mundo, con 106 casos de cryptosporidiosis (Sorvillo *et al.*, 1994; Morse, 1995; Garza y Morales, 2002).

En México se analizaron 67 muestras de pacientes inmunocomprometidos de las cuales 35 presentaron *Cryptosporidium* sp.; en esta investigación la prevalencia (52,27%) del coccidio fue alta (Elser *et al.*, 1986).

Martins y Guerrant (1995) llevaron a cabo un estudio parasitológico en Brasil. Durante la investigación se analizaron un total de 58 muestras, provenientes de pacientes con síndrome diarreico, de los cuales 19 casos resultaron positivos para el coccidio.

Siuffi *et al.* (2006) al estudiar la relación entre los niveles de carga viral y los niveles de linfocitos CD4 en el diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. en heces de niños de la Clínica Pediátrica de VIH/SIDA del Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia, encontraron que la prevalencia para *Cryptosporidium* sp. fue 51,40%, con

factores de riesgo/edad >2 años, sin diferencias significativas en peso, carga viral y/o niveles de CD4.

En Venezuela, estimaron una prevalencia de *Cryptosporidium* sp. a nivel nacional de 3,4% (Báez *et al.*, 1987). Estudios realizados en diferentes estados del país demuestran un rango amplio de prevalencias. Así, en Maracaibo, estado Zulia, Díaz *et al.* (1996) investigaron la prevalencia de *Cryptosporidium* sp. en 54 niños asintomáticos menores de 6 años pertenecientes a hogares de cuidado diario en dos sectores (marginal y urbano). Se recolectaron tres muestras fecales con un intervalo de 20 días y se encontró que en el primer muestreo, el sector urbano presentó una prevalencia de 13,30% y el sector marginal 29,10%; durante el segundo muestreo 23,30% y 20,80% y en el tercer muestreo 6,60% y 4,10%, respectivamente. En Valencia, estado Carabobo, se analizaron 260 muestras fecales (frescas y preservadas) de niños aparentemente sanos. La prevalencia de *Cryptosporidium* sp. según la muestra, fue de 0,80% en muestras formadas-frescas, 8,00% en formadas-preservadas y 12,50% en líquidas-preservadas (Barrios *et al.*, 2004). En la ciudad de Cumaná, estado Sucre, Guzmán (1994) examinó 50 muestras de niños con diarrea, de los cuales 4 (8,00%) presentaron ooquistes de *Cryptosporidium* sp. y en Porlamar, estado Nueva Esparta, Alcántara (2000) realizó un estudio en 73 pacientes con síndrome diarreico que asistieron al servicio de emergencia pediátrica del hospital “Dr. Luís Ortega”, de los cuales el 12,13% fueron diagnosticados con *Cryptosporidium parvum*.

El diagnóstico clínico de la cryptosporidiosis intestinal es difícil porque existen pocas características diferenciales de otras patologías diarreicas, por lo que debe confrontarse con otras posibles etiologías de diarrea acuosa y, entre las más frecuentes a considerar están las producidas por *Giardia intestinalis*, *Isoospora belli*, *Cyclospora cayetanensis*, *Microsporidium*, Rotavirus, otros virus entéricos y *Escherichia coli* enterotoxigénica (Chacín, 1995).

La cryptosporidiosis se diagnostica al demostrar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. en muestras de heces diarreicas o no, o esquizontes y gametocitos en biopsias de tejido intestinal principalmente. Para la determinación de

Cryptosporidium sp. en el área clínica se utilizan métodos rutinarios como examen directo con solución salina fisiológica y lugol, pero, generalmente, los ooquistes del parásito no son observados mediante este examen, debido a la difícil diferenciación del parásito con las levaduras, por lo que se procesan con otros métodos, como la tinción de Ziehl Neelsen modificada. El examen directo con solución salina fisiológica y lugol ha demostrado ser menos efectivo que el método de Ziehl Neelsen modificado en el procesamiento de las muestras clínicas e identificación de coccidios en las mismas (Pumarola *et al.*, 1991; García y Shimizu, 1998).

El método de preferencia para el diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. consiste en concentrar los microorganismos en muestras de heces por técnicas de flotación y después identificarlos por microscopía de contraste de fase o métodos de tinción. Las tinciones estándar para protozoarios intestinales no tiñen al *Cryptosporidium* sp. de manera adecuada, por lo cual las muestras se tratan con tinción ácida o tinción de auramina-rhodamina. Se ha desarrollado un método para diagnóstico inmunológico empleando la técnica de inmunofluorescencia indirecta, que utiliza anticuerpos específicos monoclonales y policlonales marcados con fluoresceína, siendo de mucha utilidad, pues permiten un diagnóstico en poco tiempo. Esta técnica es sensible y específica, pero con el inconveniente de ser muy costosa, por lo tanto, es usada en laboratorios de investigación de alta tecnología y tiene su uso limitado en estudios epidemiológicos de infecciones asintomáticas (Arrowood y Sterling, 1989; Esteban *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 1998).

Además, existen pruebas de ELISA comerciales para la detección de antígenos de *Cryptosporidium* sp., en muestras de heces fecales, que podrían ofrecer un resultado más confiable que el método de Ziehl Neelsen modificado. Este procedimiento de ELISA se caracteriza por ser versátil, simple en su realización y emplear reactivos económicos (Anusz, 1990; Ungar, 1990).

En la ciudad de Cumaná, estado Sucre, son comunes los casos de pacientes inmunosuprimidos que presentan diarreas sin causa conocida, y en muchos casos se obvia la búsqueda de *Cryptosporidium* sp. como posible agente causal de las mismas,

debido a que en la mayoría de los laboratorios clínicos de rutina se utiliza básicamente el examen directo con solución salina fisiológica al 0,85% y lugol, que no permiten la identificación efectiva del parásito (Chacón, 1999).

Ante estas evidencias, el presente trabajo estuvo dirigido a la evaluación de técnicas diagnósticas para la detección de *Cryptosporidium* sp. en muestras fecales obtenidas de pacientes inmunosuprimidos provenientes de la Unidad de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

METODOLOGÍA

Muestra poblacional

La población estudiada estuvo conformada por 35 pacientes inmunosuprimidos adultos de ambos géneros, con cuadro diarreico y que no estuvieran recibiendo tratamiento antiparasitario, provenientes de la Unidad de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, durante los meses mayo-noviembre de 2010.

Obtención de la muestra

Las muestras fecales de los pacientes se recolectaron 3 veces por semana, éstas se trasladaron al Laboratorio Clínico Jesús de Nazareth y al Laboratorio Clínico Universitario I, de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, para su almacenamiento y procesamiento. En este estudio se siguieron los lineamientos de ética, establecidos en la declaración de Helsinki (OPS, 2000), entre los cuales destacan que, este trabajo de investigación estuvo sólo a cargo de personas con la debida preparación científica y bajo la vigilancia de un profesional de la salud, por otra parte, a cada individuo se le solicitó un consentimiento válido y se entregaron las condiciones y aspectos referidos a la investigación (Anexo 1).

Procedimiento técnico

Para la determinación de *Cryptosporidium* sp. en las muestras de heces recolectadas se realizó el análisis coproparasitológico, comenzando con un examen directo con solución salina fisiológica al 0,85% y lugol (Chester *et al.*, 1992), y se utilizaron otras técnicas parasitológicas y de captura de coproantígenos de *Cryptosporidium* sp. descritas a continuación:

Método de Sheather modificado, basado en el hecho de que cuando se mezclan las heces fecales con una solución de elevado peso específico, los ooquistes de los parásitos presentes flotan en la superficie, pudiéndose observar. Para esta técnica se utilizó una solución de sacarosa con una densidad de 1 300. Se mezclaron en proporciones, una parte de materia fecal más nueve partes de la solución azucarada, se filtró a través de una gasa y se centrifugó 5 minutos a 1 500 rpm. El material se tomó de la superficie (sobrenadante) con una micropipeta, y se observó al microscopio con el objetivo de 40X (Basso *et al.*, 1998).

Ziehl Neelsen modificado, basado en la demostración de las características de ácido alcohol resistencia del parásito en frío. Para la detección de *Cryptosporidium* sp. por esta técnica, se realizaron frotis finos de las heces en un portaobjeto previamente desgrasado. Al secarse los frotis se cubrieron con metanol para fijarlos, luego con carbol fucsina durante 10 minutos sin dejarlos secar, se decoloraron con ácido sulfúrico al 10,00%, durante el mismo tiempo, hasta que las láminas quedaron libres de colorantes. Se lavaron con agua destilada por 10 segundos y posteriormente, se contratiñeron con azul de metileno al 3,00% durante 30 segundos. Finalmente, se lavaron con agua destilada por 10 segundos, se dejaron secar y se observaron al microscopio con el objetivo de inmersión.

Análisis inmunoenzimático o ELISA (Diagnostic Automation, Inc.) basado en el uso de anticuerpos marcados con una enzima, que al unirse con los antígenos presentes en las muestras fecales, forman un complejo con actividad enzimática que se revela mediante la adición de un sustrato específico, produciendo una reacción de color que se evidencia y cuantifica mediante el uso de un lector de ELISA Stat Fax 302/pluss.

Para la detección de *Cryptosporidium* sp. en heces por el método de ELISA se procedió a diluir la muestra en una proporción 1:4, con el diluyente de muestra provisto por el estuche comercial. El pozo 1 se utilizó para el blanco de muestra, se agregaron 100µl del control negativo en el pozo 2 y 100µl del control positivo en el pozo 3. Se añadieron 100µl del sobrenadante de cada solución de heces en los pozos restantes correspondientes a las muestras de los pacientes. Se incubaron por 30

minutos a una temperatura de 15 - 25 °C (temperatura ambiente). Se lavaron vigorosamente 3 veces cada pozo con solución de lavado diluida (provista por el estuche comercial). Se adicionaron a cada pozo 100µl del conjugado. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego fueron lavados vigorosamente 3 veces cada pozo con solución de lavado diluida. Se agregaron a cada pozo 100µl del sustrato. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó vigorosamente 3 veces cada pozo con solución de lavado diluida. Posteriormente, se añadieron 100µl del cromógeno (tetrametilbenzidina) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 100µl de solución de parada (ácido fosfórico 1M) para terminar la reacción. Los resultados se leyeron en un lector Stat Fax 302/pluss. a una longitud de onda 630 nm, utilizando un blanco.

Interpretación de resultados

Reactivo: Cuando la absorbancia obtenida fue mayor o igual a 0,15 unidades de densidad óptica (DO). Indicó que la muestra analizada contenía antígenos de *Cryptosporidium* sp.

No reactivo: Cuando la absorbancia obtenida fue menor a 0,15 unidades DO. Indicó que la muestra no contenía niveles detectables de antígenos de *Cryptosporidium* sp.

Análisis de datos

Para la determinación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, se calculó el número de verdaderos positivos (VP), número de verdaderos negativos (VN), número de falsos positivos (FP) y números de falsos negativos (FN) (Pita y Pértegas, 2003).

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FN}} \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El propósito de esta investigación consistió en la evaluación de técnicas diagnósticas para la detección de *Cryptosporidium* sp. en muestras fecales obtenidas de pacientes inmunosuprimidos provenientes de la Unidad de Medicina del SAHUAPA, de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, utilizándose una muestra constituida por 35 pacientes inmunosuprimidos adultos, de ambos géneros, con cuadro diarreico; los resultados obtenidos se expresan a continuación en tablas y figuras.

En la tabla 1 se observa que de los 35 muestras fecales evaluadas a través de los métodos coproparasitológicos (examen directo, Ziehl Neelsen modificado y Sheather modificado), 5 fueron positivas por el método de Ziehl Neelsen modificado; mientras que con el examen directo y el método de Sheather modificado no se observaron ooquistes del parásito. La visualización de ooquistes como pequeños corpúsculos redondeados u ovals de aproximadamente 4-6 μm de diámetro, de color fucsia contrastando con el fondo azul, indicó la presencia de *Cryptosporidium* sp. (Figura 1).

Tabla 1. *Cryptosporidium* sp. diagnosticado parasitológicamente en las muestras fecales de pacientes inmunosuprimidos de la Unidad de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

Método	<i>Cryptosporidium</i> sp.			
	Positivo		Negativo	
	n	%	n	%
Examen directo	0	0	35	100
Sheather modificado	0	0	35	100
Ziehl Neelsen modificado	5	14,29	30	85,71

n: número de muestras; %: porcentaje de las muestras.

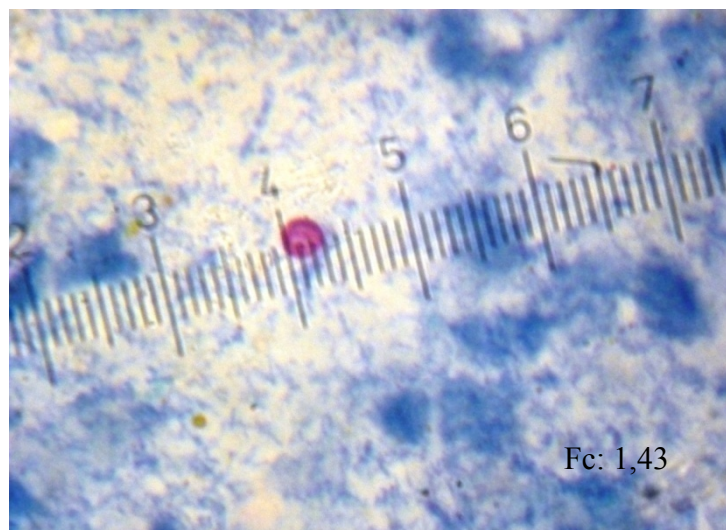


Figura 1. Fotomicrografía de ooquiste de *Cryptosporidium* sp. teñido con el método de Ziehl Neelsen modificado (1 000X), observado en las muestras fecales de pacientes inmunosuprimidos de la Unidad de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

Con la utilización del examen directo, no se evidenció presencia de ooquistes del parásito, concordando con Kang *et al.* (1998), quienes señalaron que en el examen directo no se realiza la observación del ooquiste o es muy difícil la misma; y con Chacón *et al.* (2009), quienes indican que se deben realizar exámenes coproparasitológicos adicionales, para la búsqueda de coccidios en pacientes con síntomas gastrointestinales crónicos/eosinofilia, aún en ausencia de diarrea, ya que los métodos de rutina son de poca utilidad para el diagnóstico.

Adicionalmente, se realizó el método de flotación Sheather modificado; en este caso, tampoco se evidenció la presencia de ooquistes del parásito. Por tanto, es posible que las muestras de heces analizadas en este estudio tuvieran pocos ooquistes de *Cryptosporidium* sp. que aunado a la alta exigencia que requiere el procesamiento de las muestras por este método, pudieron influir en el hecho de que no se encontraran ooquistes en las mismas. En este sentido, Chacón (1999), comparó el método de Ziehl Neelsen modificado con dos métodos de concentración incluyendo el Sheather modificado, en muestras contaminadas experimentalmente, concluyendo que el método de Sheather modificado no detectó ooquistes cuando habían concentraciones

muy pequeñas (1/10) de los mismos en las heces fecales. MacPherson y McQueen (1993) llegaron a conclusiones similares, señalando que el método de Sheather modificado es muy exigente, debido a que la solución de azúcar debe tener una gravedad específica correcta, por lo que no se ajusta bien al flujo de trabajo en el laboratorio.

En contraste, Koneman *et al.* (1992) señalaron que en infecciones leves se recomienda el uso del método de flotación de Sheather modificado, mientras que Suresh y Jerold (1996), afirmaron que el método de Sheather modificado es efectivo, pues permite concentrar una gran cantidad de ooquistes viables.

Es importante señalar que en el presente estudio, al utilizarse el método de Ziehl Neelsen modificado, se evidenció la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* sp. resultando 5 casos positivos. Varios autores han realizado diferentes trabajos comparando tinciones y métodos de concentración para la identificación del protozooario, Ziehl Neelsen modificado ocupó el segundo lugar, antecedido por el método de auramina; también se ha señalado al método de Ziehl Neelsen modificado como el más sensible (100%) (Casemore *et al.*, 1985; MacPherson y McQueen, 1993; Calvo *et al.*, 1995; Mago *et al.*, 1995; Chacón, 1999; De La Ossa *et al.*, 2007; Chávez, 2008).

Cabe destacar que la capacidad del método de Ziehl Neelsen modificado para detectar los ooquistes, depende de la buena ejecución del mismo y de la experiencia del analista. También juega un papel importante el curso de la enfermedad, debido a que algunos pacientes pudieran excretar ooquistes del parásito cuando se hacen asintomáticos, así como también pacientes sintomáticos no pudieran presentar ooquistes (Chacón, 1999).

Las dificultades y lo laborioso del diagnóstico coproparasitológico de *Cryptosporidium* sp. ha propiciado el desarrollo de estuches comerciales basados en la captura de antígenos fecales. En el presente estudio, al procesar las muestras con el estuche comercial ELISA, se obtuvo un mayor número de resultados positivos que

los observados con la técnica de Ziehl Neelsen modificada, como se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Resumen estadístico de las densidades ópticas del estuche comercial ELISA (Diagnostic Automation, Inc.) utilizado para la detección de antígenos de *Cryptosporidium* sp. en las muestras fecales de pacientes inmunosuprimidos de la Unidad de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

ELISA	n	\bar{x}	DS	Rango
Positivos	7	0,44	0,40	0,21-1,16
Negativos	28	0,07	0,03	0,01-0,12
Total	35	0,14	0,24	0,01-1,16

n: número de muestras; \bar{x} : media aritmética; DS: desviación estándar.

En términos generales, el promedio de los resultados positivos y negativos fue de 0,44 y 0,07 densidad óptica (DO), respectivamente; considerando que para la interpretación de un resultado positivo (reactivo) en esta técnica la lectura de la absorbancia debe ser $\geq 0,15$ DO y menor en el caso de las muestras negativas (no reactivas); claramente se observa la positividad o negatividad de las muestras problemas.

Anderson *et al.* (1982) señalaron que el método de elección para la búsqueda de *Cryptosporidium* sp. es el diagnóstico por inmunofluorescencia y ELISA. En la investigación de Ungar (1990), de 62 muestras de heces de pacientes con Cryptosporidiosis, detectadas por dos métodos de diagnóstico microscópico (flotación y Ziehl Neelsen modificado), 51 fueron positivas por el ELISA, y de un total de 182 muestras de pacientes sin infección, 176 casos fueron negativos por la misma y 6 casos positivos; 3 de las muestras positivas por ELISA provenían de pacientes con un diagnóstico temprano de Cryptosporidiosis.

Kelh *et al.* (1995) afirman que existen métodos de detección de antígenos en heces por inmunofluorescencia, hemaglutinación y ELISA que presentan buenos resultados, incluso superiores a los métodos tradicionales como el examen directo, métodos de flotación, Ziehl Neelsen modificado, entre otros.

Dagan *et al.* (1995) encontraron en su investigación que de 139 muestras negativas por Ziehl Neelsen modificado, 13 (9,30%) fueron positivas por el ELISA. Concluyendo que el ELISA es una herramienta importante para la identificación de *Cryptosporidium* sp. en muestras de materia fecal en estudios de campo, ya que es sensible, específico, fácil de usar, y no es afectado por la presencia de un conservante. De acuerdo con Acuña *et al.* (2009) la técnica de ELISA aporta una herramienta más para el diagnóstico de la cryptosporidiosis intestinal, siendo fundamental, como en todos los casos, una buena interrelación entre el clínico y el laboratorio para un correcto diagnóstico del paciente.

Al respecto, Doing *et al.* (1999) encontraron discordancia con estos resultados, pues obtuvieron 62 falsos positivos con el ensayo inmunoenzimático comercial (Alexon Prospect) que ya habían sido corroborados con extensas exámenes microscópicos.

En la presente investigación se comparó la sensibilidad y especificidad diagnóstica del estuche comercial ELISA con los resultados coproparasitológicos de tinción con Ziehl Neelsen modificado. A partir de los datos mostrados en la tabla 3 se obtuvo para la técnica de ELISA una sensibilidad de 100% (5/5), especificidad de 93,33% (28/30), un valor predictivo positivo (VPP) de 71,43% (5/7) y un valor predictivo negativo (VPN) de 100% (28/28).

De las 7 muestras que presentaron antígenos de *Cryptosporidium* sp., 5 estaban positivas con el método de Ziehl Neelsen modificado, por lo que se encontró un índice de concordancia Kappa entre el estuche comercial ELISA y el método parasitológico de Ziehl Neelsen modificado de 0,80; lo que significa que la fuerza de concordancia entre los dos métodos es buena, la consistencia entre estos métodos es de 80,00%; indicando que puede utilizarse uno u otro método, pero al observar la sensibilidad (100%) y especificidad (93,00%), se deduce que el estuche comercial ELISA permitió reconocer más muestras con *Cryptosporidium* sp. que el Ziehl Neelsen modificado.

Tabla 3. Tabla de contingencia de casos de *Cryptosporidium* sp. detectados por el método de Ziehl Neelsen modificado y el estuche comercial ELISA (Diagnostic Automation, Inc.), en las muestras fecales de pacientes inmunosuprimidos de la Unidad de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (SAHUAPA), de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.

Ziehl Neelsen modificado	ELISA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	5	0	5
Negativo	2	28	30
Total	7	28	35

En este estudio, de las 7 muestras positivas para *Cryptosporidium* sp. por el estuche comercial ELISA, 5 eran líquidas y 2 formadas, relacionándose con las características descritas por Barrios *et al.* (2004), en cuya investigación demostraron que la captura de antígenos fecales mostró, respecto al coprodiagnóstico, mayor especificidad y sensibilidad en muestras líquidas que en heces formadas.

Trabajos realizados por otros investigadores utilizando también técnicas de captura de coproantígenos han revelado sensibilidades desde 53,30% hasta 98,00% y especificidades que oscilan entre 89,30% y 98,00% (Dagan *et al.*, 1995; Barrios *et al.*, 2004; Chalmers *et al.*, 2011). La sensibilidad de 100% obtenida con el estuche comercial ELISA, utilizado en este estudio, es superior a las encontradas por los investigadores ya citados, mientras que la especificidad 93,33% está cerca del rango superior de los resultados hallados por los mismos. El valor predictivo positivo calculado en este estudio 71,43%, es menor al de Acuña *et al.* (2009) y Ungar, (1990), quienes obtuvieron valores de 78,00% y 89,50%, respectivamente; a diferencia del valor predictivo negativo 100% que fue superior a los expresados por los mismos 97,00% y 94,20%, respectivamente.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la técnica de ELISA (Diagnostic Automation, Inc) es más sensible que la tinción de Ziehl Neelsen modificada, dado que con el ELISA se pudo obtener mayor número de resultados positivos. Sin embargo, la determinación del índice de concordancia Kappa indicó que para la determinación de *Cryptosporidium* sp. en muestras fecales se puede usar,

tanto el método de ELISA, como el método de tinción de Ziehl Neelsen modificado indistintamente. El examen directo con solución salina fisiológica al 0,85% y lugol, además del método de flotación de Sheather modificado, no fueron de gran ayuda en este estudio.

CONCLUSIONES

El método parasitológico de tinción Ziehl Neelsen modificado permitió detectar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* sp, mientras el examen directo con solución salina fisiológica y lugol y el método de Sheather modificado no detectaron ooquistes del mismo.

De los métodos utilizados en este estudio para la determinación de *Cryptosporidium* sp. la técnica de ELISA resultó más sensible y específica, usando como referencia el método de Ziehl Neelsen modificado.

RECOMENDACIONES

Realizar charlas de educación sanitaria a los pacientes inmunosuprimidos que acuden al servicio de medicina del SAHUAPA; dictadas por personal capacitado, procurando en la medida de lo posible que apliquen las mismas.

Entregar a los pacientes folletos donde se explique clara y detalladamente, las medidas preventivas que deben seguir para evitar el contagio con este tipo de parásitos que ponen en riesgo aún más su vida.

Promover la utilización de pruebas cuantitativas de coprocaptura de antígenos en instituciones públicas de salud, para la detección de *Cryptosporidium* sp.

BIBLIOGRAFÍA

Acuña, M.; González, M.; Cabrera, M.; González, M. y Fernández, A. 2009. *Aportes al diagnóstico de Cryptosporidium sp. en heces*. Trabajo presentado en el primer congreso uruguayo de infectología. Montevideo, Uruguay.

Alcántara, R. 2000. Diagnóstico de blastocystosis y cryptosporidiosis en pacientes con cuadros diarreicos que acuden al servicio de pediatría del hospital “Dr. Luís ortega” de Porlamar. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.

Alonso, M.; Chaves, F.; Drona, F.; Catalan, S. y López, A. 1995. Parasitosis intestinal en la población penitenciaria en Madrid. *Enfer. Infec. Microbiol. Clin.*, 13(2): 90-95.

Anderson, B.; Donnelinger, R.; Wilkins, R. y Smith, J. 1982. Criptosporidiosis in a veterinary student. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 180: 406-409.

Antunes, F. 1993. Parasitic diseases and AIDS. Monografía. Instituto de Higiene y Medicina Tropical. Facultad de Medicina de Lisboa. Lisboa, Portugal.

Anusz, K. 1990. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in bovine feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2770-2774.

Arcay, L. y Bruzual, E. 1993. *Cryptosporidium* en ríos de Venezuela. Encuesta epidemiológica de una población humana y fauna en convivencia. *Parasitol. Día*, 17:11-18.

Arrowood, M. y Sterling, C. 1989. Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody methods for *Cryptosporidium* oocyst. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 1490-1495.

Báez, E.; Darricarrere, T. y Mejías, A. 1987. Criptosporidiosis en Venezuela. *Arch. Hosp. Vargas*, 29(1): 19-26.

Barrios, E.; Delgado, V.; Araque, W.; Chiang, M.; Martínez, L.; Materán, G.; López, Y. y Peralta, J. 2004. *Cryptosporidium*: diagnóstico y prevalencia en niños sanos del estado Carabobo, Venezuela. *Salus Online*, 8(2): 45-52.

Basso, W.; Venturini, L. y Risso, M. 1998. Comparison of parasitological techniques for the examination of dog feces. *Parasitol. Día*, 22:1-2.

- Brasil, P.; De Lima, D.; De Paiva, D.; De Castro, M.; Campos, F.; Pereira, S.; Villela, S.; Jurado, E.; Peralta, J.; Morgado, M. y Moura, H. 2000. Clinical and diagnostic aspects of intestinal microsporidiosis in HIV- infected patients with chronic diarrhea in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 42(6): 299-304.
- Calvo, E.; Casemore, D. y Saud, R. 1995. Cryptosporidiosis. *J. Clin. Pathol.*, 38: 1337-1339.
- Casemore, D.; Amstrong, M. y Sanos, R. 1985. Laboratory and diagnosis of cryptosporidiosis. *J. Clin. Pathol.*, 38: 1337-1341.
- Casemore, P. 1990. Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis. *Epidemiol. Infect.*, 104: 1-28.
- Chacín, L. 1995. Criptosporidiosis en humanos. *Invest. Clin.*, 36(4): 207-250.
- Chacón, I. 1999. Comparación de métodos para el diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. en muestras fecales contaminadas experimentalmente. Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.
- Chacón, N.; Salinas, R.; Kuo, E.; Durán, C.; Márquez, W. y Contreras, R. 2009. Ocurrencia de *Isoospora belli*, *Cryptosporidium* spp. y *Cyclospora cayentanensis* en pacientes urbanos evaluados por síntomas gastrointestinales con o sin inmunosupresión. *Revista de la Facultad de Medicina*, 32(2): 124-131.
- Chalmers, R.; Campbell, B.; Crouch, B.; Charlett, A. y Davies, A. 2011. Comparison of the diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the United Kingdom. *J. Med. Microbiol.*, 1(1):1.
- Chávez, E. 2008. Diagnostic of intestinal parasite in children. *Rev. Soc. Bol. Ped.*, 47(3): 169-177.
- Chester, P.; Clifton, R. y Wayne, E. 1992. *Parasitología clínica*. Segunda edición. Editorial Salvat. México.
- Clark, D. y Sears, C. 1996. The pathogenesis of cryptosporidiosis. *Parasitol. Today*, 12(6): 221-225.
- Clavel, A. 1996. Criptosporidiosis: curso zoonosis emergentes, mesa redonda. Décima segunda edición, Universidad de Verano de Teruel. España.
- Collier, A.; Millar, R. y Meyeras, J. 1984. Cryptosporidiosis alter marrow transplantation: person to person transmission and treatment with spiramycin. *Amer. Int. Med.*, 101(2): 204-205.
- Current, W. y García, S. 1991. Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4: 325-328.

- Dagan, R.; Fraser, D.; El-El, J.; Kassis, I.; Deckelbaum, R. y Turner, S. 1995. Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens from infants and young children in field studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 52(2): 134-138.
- De La Ossa, N.; Falconar, A.; Llinás, H. y Romero, C. 2007. Manifestaciones clínicas y factores de riesgo asociados a la infección por *Cryptosporidium* spp. en pacientes de Barranquilla y tres municipios del Atlántico (Colombia). *Salud Uninorte*, 23 (1): 19-31.
- Díaz, O.; Calvo, B. y Calchi, M. 1996. Prevalencia de *Cryptosporidium* sp. en niños menores de 6 años y su relación con los factores de riesgo. *Kasmera*, 24(2): 93-116.
- Doing, K.; Hamm, J.; Jellison, J.; Marquis, J. y Kingsbury, C. 1999. False-positive results obtained with the alexon prospect *Cryptosporidium* enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.*, 37(5): 1582-1583.
- Dupont, H.; Chappel, C.; Sterling, C.; Okhuysen, P.; Rose, J. y Jakubowski, W. 1995. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.*, 332: 855-859.
- Elser, K.; Moricz, M. y Proctor, E. 1986. *Cryptosporidium* infections a laboratory survey. *C. M. A. J.*, 135: 211-213.
- Esteban, J.; Aguirre, C.; Flores, A.; Strauss, W. y Angles, R. 1998. High *Cryptosporidium* prevalences in healthy aymara children from northern bolivian altiplano. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58(1): 50-55.
- García, L. y Shimisu, R. 1998. Evaluation of intestinal protozoan morphology in human fecal specimens preserved in ecofix: comparison of wheatley trichrome stain and ecofix. *J. Clin. Microbiol.*, 36(7): 1974-1976.
- Garza, V. y Morales, M. 2002. Agua y salud: *Cryptosporidium parvum* agente causal de una nueva enfermedad relacionada con el agua. *S. Pública y Nutr.*, 3: 16-18.
- Genta, R.; Chappell, C.; White, A.; Kimball, K. y Goodgame, R. 1993. Duodenal morphology and intensity of infection in AIDS-related intestinal cryptosporidiosis. *Gastroenterol.*, 105: 1769-1775.
- Guzmán, M. 1994. Detección de *Cryptosporidium* sp. en niños con diarrea en el Ambulatorio "Brasil". Trabajo de Pregrado. Departamento de Bioanálisis. Universidad de Oriente. Cumaná.
- Harp, J. 1996. Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocyst in water or milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2866-2868.
- Hart, C.; Baxby, D. y Blondell, N. 1984. Gastroenteritis due to *Cryptosporidium* a

- prospective survey in a childrens hospital. *J. Infect.*, 9: 264-270.
- Henriksen, S. y Pohlenzj, J. 1981. Staining of *Cryptosporidium* by a modified Ziehl-neelsen technique. *Act. Vet. Scand.*, 22: 594-596.
- Juranek, D. 1995. Cryptosporidiosis: Sources of infection and guidelines for prevention. *Clin. Infect. Dis.*, 21(1): 57-61.
- Kang, G.; Mathew, M.; Prasanna, D.; Daniel, J.; Mathan, V. y Muligil, J. 1998. Prevalence of intestinal parasites in rural southern Indians. *Trop. Med. Intem. Heal.*, 3(81): 70-75.
- Kelh, K.; Cicirello, H. y Havens, P. 1995. Comparisson of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 416-418.
- Kim, W. 1994. Laboratory animal models for experimental cryptosporidiosis: a mini-review. Research and Reviews in Parasitology. *Parasitol.*, 54(1): 13-28.
- Koneman, A.; Dowel, J. y Sommers, W. 1992. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Interamericana. España.
- MacPherson, D. y McQueen, R. 1993. Multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *J. Clin. Microbiol.*, 31(2): 198-202.
- Mago, H.; Vivas, S.; Benítez, E.; Cortez, K. y Stella, M. 1995. Criptosporidiosis intestinal: Detección de casos en un ambulatorio de referencia a nivel privado. *Antib. E. Inf.* 3(1): 594-596.
- Martins, C. y Guerrant, R. 1995. *Cryptosporidium* and criptosporidiosis. *Parasitol. Today*, 11(11): 434-436.
- Morse, S. 1995. Factor in the emergent old infectious diseases. *Perspectives*, 1(1):1.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2000. Bioética. Principios éticos para los investigadores en los seres humanos. Publicación Científica. OMS-OPS.
- Pettoello-Mantovani.; Di Martino, L.; Dettori, G.; Vajro, P.; Scotti, S.; Ditullio, M. y Guandalini, S. 1995. Asymptomatic carriage of intestinal *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunodeficient children: a prospective study. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 14(12): 1042-1047.
- Pita, S. y Pértegas, S. 2003. Pruebas diagnósticas. *Cad. Aten. Primaria*, 10: 120-124.
- Prescott, L.; Harley, J. y Klein, D. 2000. *Microbiología*. Cuarta Edición. McGraw-Hill Interamericana. Madrid.
- Pumarola, A.; Rodríguez, A.; García, A. y Piedrola, G. 1991. *Microbiología y parasitología médica*. Segunda Edición. Masson-Salvat. Barcelona, España.

Ronald, F. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitol.*, 126: 37-56.

Siuffi, M.; Angulo, M.; Velasco, A.; López, P.; Dueñas, V. y Rojas, C. 2006. Relación entre los niveles de carga viral y los niveles de linfocitos CD4 en el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. en heces de niños de la Clínica Pediátrica de VIH/SIDA del Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia. *Colomb. Med.*, 37:15-20.

Sorvillo, F.; Lieb, L.; Kerndt, P. y Ash, L. 1994. Epidemiology of cryptosporidiosis among persons with acquired immunodeficiency syndrome in Los Angeles Country. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 51(3): 326-331.

Stuart, W. 2000. *Microbiología*. Primera Edición. McGraw-Hill Interamericana. México.

Suresh, P. y Jerold, E. 1996. Comparative evaluation of several techniques for purification of *Cryptosporidium parvum* oocysts from rates feces. *J. Clin. Microbiol.*, 34(1): 38-40.

Ungar, B. 1990. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2491-2495.

Velasco, C. y García, J. 2002. Cryptosporidiosis en pediatría: etiología, epidemiología cinética de la infección y clínica. *Rev. Med. UIS.*, 16: 20-29.

ANEXOS

Anexo 1

CONSENTIMIENTO VÁLIDO

Bajo la coordinación de la profesora Del Valle Guilarte, se está realizando el proyecto de investigación titulado: “DETECCIÓN DE *Cryptosporidium* sp. POR DIFERENTES TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS EN PACIENTES INMUNOSUPRIMIDOS. SAHUAPA, CUMANÁ, ESTADO SUCRE”.

YO: _____
C.I: _____ NACIONALIDAD: _____
ESTADO CIVIL: _____ DOMICILIADO EN: _____
_____.

Siendo mayor de 18 años, en uso pleno de mis facultades mentales sin que medie coacción ni violencia alguna, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio indicado, declaro mediante el presente:

1. Haber sido informado (a) de manera clara y sencilla por parte del grupo de investigadores de este proyecto, de todos los aspectos relacionados con el proyecto de investigación titulado “DETECCIÓN DE *Cryptosporidium* sp. POR DIFERENTES TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS EN PACIENTES INMUNOSUPRIMIDOS. SAHUAPA, CUMANÁ, ESTADO SUCRE”.
2. Tener conocimiento claro que el objetivo del trabajo es: Evaluar técnicas diagnósticas para *Cryptosporidium* sp. en muestras fecales obtenidas de pacientes inmunosuprimidos provenientes de la Unidad de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (SAHUAPA), de la ciudad de Cumaná, estado Sucre.
3. Conocer bien el protocolo experimental expuesto por el investigador, en el cual se establece que mi participación en el trabajo consiste en: donar de manera voluntaria una muestra de heces para ser entregada al investigador del proyecto.

4. Que las muestras de heces que acepto donar serán utilizadas única y exclusivamente para demostrar la presencia o no de *Cryptosporidium* sp.
5. Que el equipo de personas que realizan esta investigación coordinada por la profesora Del Valle Guilarte, me han garantizado confidencialidad relacionada tanto con mi identidad como a cualquier otra información relativa a mi persona a la que tenga acceso por concepto de mi participación en el proyecto antes mencionado.
6. Que bajo ningún concepto podré restringir el uso para fines académicos de los resultados obtenidos en el presente estudio.
7. Que mi participación en dicho estudio no implica riesgo o inconveniente alguno para mi salud.
8. Que cualquier pregunta que tenga relación con este estudio me será respondida oportunamente por parte del equipo antes mencionado, con quienes me puedo comunicar por los teléfonos: 0416-0817209.
9. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico producto de hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO

Luego de haber leído, comprendido y aclaradas mis interrogantes con respecto a este formato de consentimiento y por cuanto mi participación es totalmente voluntaria, acuerdo:

1. Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez autorizar al equipo de investigadores a realizar el referido estudio en las muestras de heces que acepto donar para los fines indicados anteriormente.
2. Reservarme el derecho de revocar esta autorización y donación en cualquier momento sin que ello conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

Firma del Voluntario: _____

Nombre y Apellido: _____

C.I: _____

Lugar y Fecha: _____

Firma del Testigo: _____

Nombre y Apellido: _____

C.I: _____

Lugar y Fecha: _____

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR

Luego de haber explicado detalladamente al voluntario la naturaleza del protocolo mencionado, certifico mediante el presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento, comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en este estudio. Ningún problema de índole médico, de idioma o de instrucción ha impedido al sujeto tener una clara comprensión de su compromiso con este estudio.

DETECCIÓN DE *Cryptosporidium* sp. POR DIFERENTES TÉCNICAS
DIAGNÓSTICAS EN PACIENTES INMUNOSUPRIMIDOS. SAHUAPA,
CUMANÁ, ESTADO SUCRE

Firma del Investigador: _____

Nombre y Apellido: _____

C.I: _____

Lugar y Fecha: _____

APÉNDICES

Apéndice I

Cálculo de la sensibilidad y de la especificidad del estuche comercial ELISA (Diagnostic Automation, Inc).

Verdaderos positivos= 5 pacientes

Verdaderos negativos= 28 pacientes

Falsos positivos= 0 pacientes

Falsos negativos= 2 pacientes

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100 = \frac{5}{(5 + 0)} \times 100 = 100,00 \%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \times 100 = \frac{28}{(28 + 2)} \times 100 = 93,33\%$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}} \times 100 = \frac{5}{(5 + 2)} \times 100 = 71,43\%$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{\text{VN}}{\text{FN} + \text{VN}} \times 100 = \frac{28}{(28 + 0)} \times 100 = 100,00\%$$

Índice de kappa = 0,80 grado de acuerdo muy bueno.

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	DETECCIÓN DE <i>Cryptosporidium</i> sp. POR DIFERENTES TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS EN PACIENTES INMUNOSUPRIMIDOS. SAHUAPA, CUMANÁ, ESTADO SUCRE
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Goitía Moreno, Niruska del Valle	CVLAC	15743599
	e-mail	<u>nairuskagoiti7@gmail.com</u>
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Cryptosporidiosis, <i>Cryptosporidium</i> sp., prevalencia, estado Sucre.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

En el presente estudio se compararon métodos diagnósticos para la detección de *Cryptosporidium* sp. Se evaluaron 35 muestras fecales de pacientes adultos inmunosuprimidos, provenientes de la Unidad de Medicina del Servicio Autónomo Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (SAHUAPA), de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Las muestras se analizaron parasitológicamente con examen directo con solución salina fisiológica al 0,85% y lugol, método de Sheather modificado y tinción de Ziehl Neelsen modificado; para detectar coproantígenos de *Cryptosporidium* sp. se usó el estuche comercial ELISA (Diagnostic Automation, Inc.). Este procedimiento de ELISA detectó la mayor cantidad de muestras positivas 20,00% seguido de Ziehl Neelsen modificado 14,29%, el examen directo y el método de Sheather modificado no detectaron ooquistes del parásito. Se encontró que la técnica de ELISA reflejó una sensibilidad de 100%, especificidad de 93,33%, un valor predictivo positivo de 71,43% y un valor predictivo negativo de 100%. El índice de concordancia kappa entre el estuche comercial ELISA y el método parasitológico de Ziehl Neelsen modificado fue de 0,80, lo que significa que para el diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. puede utilizarse uno u otro método, aunque el ELISA resultó ser más sensible para la identificación de *Cryptosporidium* sp. especialmente, cuando se requieren resultados rápidos, confiables y masivos.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Profa. Guilarte, Del Valle	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input checked="" type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	9306352
	e-mail	<u>delguifa67@gmail.com</u>
	e-mail	
Profa. Gómez, Erika	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	13539455
	e-mail	<u>eri1578@hotmail.com</u>
	e-mail	
Profa. Mora, Leonor	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	9.273.164
	e-mail	<u>moralobianco@yahoo.com</u>
	e-mail	
	ROL	C <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> T <input type="checkbox"/> J <input checked="" type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/> U <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2013	05	13
------	----	----

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-Goitían.doc	Application/word

Alcance:

Espacial: Internacional

Temporal: Temporal

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciado (a) en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado (a)

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CU N° 0975

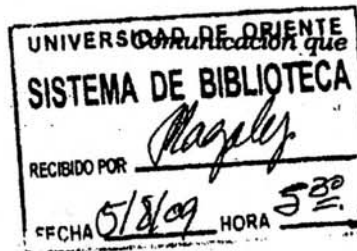
Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda ***SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009***.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNVELO
Secretario



C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Tel: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.

Br. Goitía, Nairuska

Autor (a)

Profa. Guilarte, Del Valle

Asesor (a)