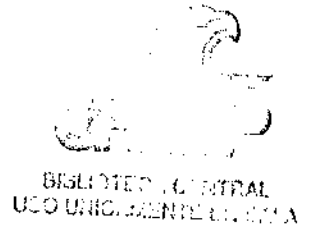


**UNIVERSIDAD POPULAR AUTONOMA DEL ESTADO DE
PUEBLA**

**FACULTAD DE MEDICINA
LABORATORIOS CLINICOS DE PUEBLA**



**FRECUENCIA DE *Cryptosporidium* sp. EN EVACUACIONES DIARREICAS
EN UN LABORATORIO PRIVADO DE LA CIUDAD DE PUEBLA.**

TESIS:

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

ESPECIALISTA EN PATOLOGIA CLINICA

PRESENTA:

DR. JORGE SANCHEZ LOPEZ

TE 616.07 #64085
SAN 1996
SANCHEZ LOPEZ, JORGE
FRECUENCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SP. EN EVACUACIONES DIARREICAS

DR. GUILLERMO RUIZ REYES

MARZO DE 1996



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN.

Entre 1983 y 1984 se incrementaron las publicaciones relativas a un protozooario parásito, un coccidio, *Cryptosporidium*, como resultado del interés de veterinarios, y por el papel del parásito en el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Estos informes son el resultado de la colaboración de médicos, microbiólogos, histopatólogos, veterinarios y personal al cuidado de la salud.

Cryptosporidium fue descrito en ratones en 1907 y posteriormente en otras especies, hasta que en 1976 se describió por primera vez en seres humanos. Los estudios experimentales y clínicos han incrementado nuestros conocimientos acerca de la biología del organismo. El parásito realiza su ciclo vital completo dentro del intestino, aunque ocasionalmente puede llevarse a cabo en otros órganos. El síntoma principal es la diarrea, de consistencia líquida y explosiva. En pacientes inmunodeficientes y en niños de los países tercermundistas, puede poner en peligro sus vidas. Aún en pacientes inmunocompetentes, este síntoma es habitualmente prolongado. Los intentos por encontrar agentes quimioterápicos efectivos en el tratamiento de esta parasitosis no han sido satisfactorios.

Epidemiológicamente, la infección tiene un origen zoonótico, pero se ha incrementado la evidencia de transmisión de persona a persona. El diagnóstico ha dependido de observaciones histológicas, pero se han diseñado métodos de detección hasta llegar a la utilización de la inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales, lo que ha aumentado considerablemente la capacidad de identificar al microorganismo.

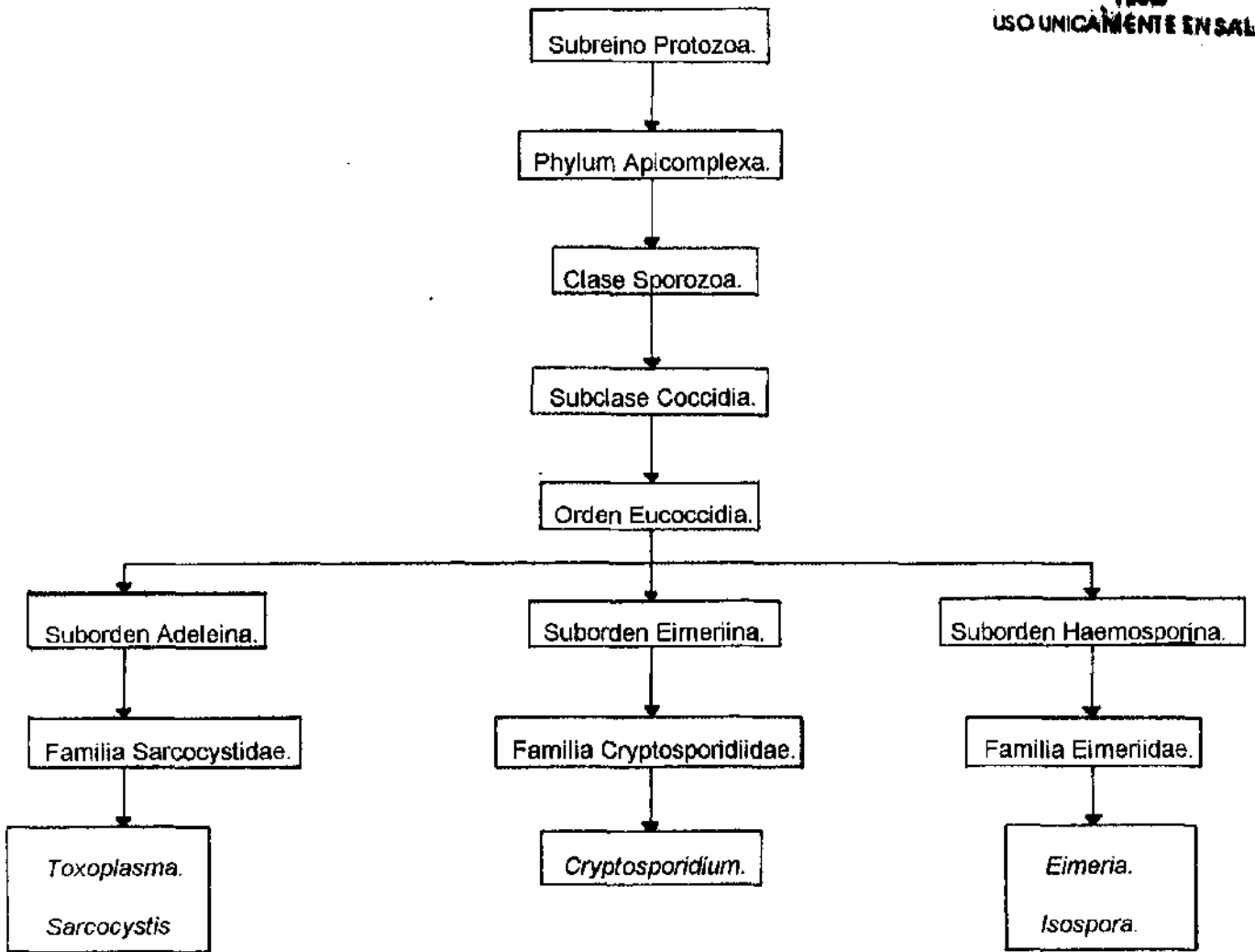
El parásito que se encuentra con mayor frecuencia en niños, ocurre aproximadamente en el 2% de las muestras fecales examinadas, (2,4,5,10,11,12,13,14)

INTRODUCCION.

Cryptosporidium sp. fue descrito por primera vez en 1907 por E.E. Tyzzer (1), denominándolo *Cryptosporidium muris*. Posteriormente, el mismo Tyzzer demostró diversas fases del desarrollo sexual y asexual del parásito, y sugirió que los esporozoitos son liberados en las glándulas gástricas produciéndose nuevas fuentes de autoinfección. En 1912, Tyzzer identificó y nombró una segunda especie: *Cryptosporidium parvum*. Durante las siguientes décadas, la criptosporidiosis se consideró como una enfermedad de los animales, (1,4)

Actualmente *Cryptosporidium sp.* está ubicado taxonómicamente en el *Phylum Apicomplexa* por presentar en alguna de sus fases de desarrollo un complejo apical, constituido por elementos visibles a la microscopía electrónica. La mayoría de los Apicomplexa que son parásitos del hombre pertenecen a la Clase *Sporozoa*, cuyo ciclo vital se caracteriza por una alternancia de generaciones, una sexual y otra asexual. La locomoción de los organismos maduros es por flexiones del cuerpo por deslizamiento o por ondulación de sus pliegues longitudinales. De manera característica, el ciclo de vida pasa por las tres etapas del ciclo general de los esporozoos (merogonia, gametogonia y esporogonia), por lo cual pertenecen a la Subclase *Coccidia*. Debido a que la merogonia se presenta en vertebrados pertenece al orden *Eucoccidiida*. Típicamente los microgametos se caracterizan por la ausencia de flagelos por lo cual pertenecen a la Familia *Cryptosporidiidae*, (4), (ver cuadro).

El ciclo de vida de *Cryptosporidium sp.* se asemeja al de otros coccidios como los géneros *Isospora*, *Eimeria*, *Sarcocystis* y *Toxoplasma*, pero a diferencia de estos, es monoxeno, es decir, solo necesita de un hospedero para desarrollar todo su ciclo. Los oocistos que se expulsan con las heces contienen los cuatro esporozoitos potencialmente infectantes. Los esporozoitos contenidos en el oocisto se liberan por mecanismos desconocidos, pero se cree que el desenquistamiento se realiza por digestión de la pared quística en el tubo digestivo del nuevo hospedero. Luego de penetrar en las células del hospedero, el esporozoito evoluciona a trofozoito, adquiriendo una forma esférica. Esta estructura ya no presenta los organelos de la región apical y se puede observar un núcleo alargado en la parte central del cuerpo. El trofozoito se encuentra firmemente adherido por medio de una unión electrodensa y envuelto en una serie de membranas. Tal es la relación entre el parásito y las membranas que se ha concluido que la localización del parásito es intracelular



TAXONOMIA DE *Cryptosporidium* sp.

extracitoplasmática. Posteriormente se realizan tres divisiones nucleares para formar el esquizonte de la primera generación que contiene ocho merozoitos (merogonia). Al madurar los merozoitos se liberan e infectan otras células, en donde sufren dos divisiones nucleares más, para dar lugar a la estructura denominada esquizonte de la segunda generación, que contiene cuatro merozoitos de la segunda generación, estos al liberarse infectan otras células epiteliales. Estas etapas pueden repetirse o seguir adelante para sufrir diferenciación sexual y formar microgametocitos o macrogametocitos y estos, a su vez, dar origen a los microgametos o macrogametos respectivamente (gametogonia), de cada microgametocito se forman hasta dieciseis microgametos,(4)

La criptosporidiosis es una parasitosis observada en diversas partes del mundo, que afecta la mucosa gástrica y la respiratoria de varios animales tales como: ratas, pollos, conejos, corderos, gatos, pavos, serpientes y peces. Se ha encontrado en la tráquea, cloaca, bursa de Fabricio y conjuntivas de aves; en el estómago e intestino de roedores y en los conductos biliares de monos. En todos estos animales, las lesiones macroscópicas se encontraron en el intestino. Al examen microscópico se observó que las vellosidades se encontraban moderadamente atróficas, las criptas hipertróficas y la lámina propia infiltrada con gran número de linfocitos y células plasmáticas, (2,4)

El primer caso de criptosporidiosis en humanos se informó en 1976 en una niña de 3 años de edad, originaria de Nashville, EUA, quien presentó vómito, diarrea y dolor abdominal. Vivía en una granja, y había gozado de buena salud y tenido un desarrollo normal. Una biopsia de recto demostró infección por *Cryptosporidium*. Se recuperó completamente con rehidratación. Una revisión de tres casos entre 1976 y 1979 llamó la atención en las infecciones oportunistas por *Cryptosporidium* en pacientes inmunocomprometidos que habían presentado fiebre, diarrea crónica, que variaba de 10 días a 3 años de duración. En un paciente la deshidratación fue tan grave que durante 10 días se le administraron 60 litros de líquidos parenterales. En todos estos casos, el examen histológico de las biopsias de yeyuno mostró la presencia de *Cryptosporidium*, ya sea como el único parásito sospechoso o asociado a *Giardia lamblia*, (2,4,8)

Se informaron anomalías de la arquitectura de las vellosidades, desde moderadas a graves con discreta inflamación crónica de la lámina propia y escaso incremento del número de células plasmáticas, polimorfonucleares y linfocitos. Entre 1980 y 1983, más de 80 casos de gastroenteritis por *Cryptosporidium* fueron informados como gastroenteritis autolimitadas en pacientes inmunocompetentes; y con síntomas graves en pacientes inmunodeprimidos, especialmente en los afectados por el SIDA, (2,8)

Algunos informes señalan que la infestación por *Cryptosporidium* en individuos inmunocompetentes se presenta desde los 2 meses hasta los 60 años de edad con frecuencia pico durante la infancia (menos de 1 año a 10 años), y en adultos entre los 21 y 30 años. Es un poco más frecuente en hombres que en mujeres. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea abundante, fiebre, calambres y náuseas. La diarrea con una frecuencia de 2 a 10 evacuaciones líquidas al día, se inicia a menudo entre el primer y el segundo días de la enfermedad. Las evacuaciones diarreicas por lo general son fétidas, acompañadas de pérdida de peso considerable (10% del peso corporal), y en algunos casos postración. El dolor abdominal tiende a presentarse en el cuadrante superior derecho. El periodo de incubación cuya duración es por lo general entre 5 días y 2 semanas después del contacto inicial con el parásito, induce síntomas que pueden durar de 5 a 14 días, cede de manera autolimitada y en algunos individuos es asintomática, (2,4,8,15)

Contrastando con la diarrea de los pacientes inmunocompetentes, en los inmunocomprometidos *Cryptosporidium* puede causar diarrea grave, prolongada y con mala respuesta al tratamiento. La mayoría de los casos informados ocurren en individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), pero también se han informado casos en pacientes con diagnóstico de hipogamaglobulinemia, con leucemias, en los que sufren diabetes mellitus y también en pacientes que reciben tratamientos inmunosupresores. La infección en estos casos se debe a la deficiente protección inmunológica, por lo que se considera oportunista este parásito. La distribución por edades tiene un incremento entre los 31 y los 40 años de edad. La transmisión de la enfermedad puede ser por animales infectados en contacto con el paciente; por la ingestión de agua o alimentos contaminados y también de persona a persona como en el caso de los homosexuales. La duración de la diarrea en los pacientes de SIDA es variable, desde una hasta 78 semanas, con promedio de 20.6

semanas. La pérdida de líquidos oscila entre 1 y 12 litros diarios. Se puede observar una dramática pérdida de peso (hasta de 50%) y acompañarse de un síndrome de mala absorción intestinal. Las biopsias realizadas en estos pacientes han revelado la presencia de atrofia de las vellosidades intestinales, infiltración de neutrófilos en la lámina propia y dilatación e hipertrofia de las criptas en el ciego y colon, (2,4,8,14,15)

En cuanto al mecanismo fisiopatológico de la diarrea, cabe señalar que se produce cuando el parásito se adhiere a la superficie de la mucosa intestinal. No se sabe de algún factor de colonización, sin embargo, se ha sugerido reconocimiento entre las superficies de las membranas por atracción eléctrica o por atracción entre azúcares de glucoproteínas de membrana (lectinas). Posteriormente se produce una invaginación en las microvellosidades de la célula epitelial alterando con ello la arquitectura normal de la célula y produciéndose así el evento diarreico. (2,4,15)

Al principio, la búsqueda de *Cryptosporidium sp.* en animales y en el hombre se realizaba por biopsia del intestino mediante las técnicas de tinción con hematoxilina-eosina y con azul de toluidina. Posteriormente, con el objeto de reducir el costo y el tiempo se probaron diversas técnicas de tinción para extendidos fecales frescos. Así mismo, se diseñaron técnicas coproparasitológicas de concentración. Entre las técnicas de tinción más importantes están la de Ziehl-Neelsen modificada; la de Safranina-Azul de Metileno; la técnica con dimetil-sulfóxido carbol-fucsina, y la de auramina-O para microscopía de fluorescencia. Las técnicas de concentración que se han utilizado són: la de azúcar de Sheather y la de formol-éter o de Ritchie. Utilizando gradientes de azúcar, ha sido posible detectar atipias características en los oocistos. La confirmación del diagnóstico se realiza mediante la infección experimental en animales de laboratorio, buscando oocistos en las heces de dichos animales, así como en las biopsias del tubo digestivo. Actualmente se han diseñado métodos inmunológicos usando anticuerpos monoclonales los cuales han probado ser altamente sensibles y eliminan la posibilidad de resultados falsos positivos y falsos negativos que tienen la mayoría de las técnicas antes utilizadas. (4,6,7,10,11,12,13)

En el tratamiento de la criptosporidiosis, tanto en animales como en el hombre, se han probado alrededor de 40 agentes antimicrobianos, incluyendo coccidiostáticos, antiesporozoarios, antihelmínticos y antibióticos de amplio espectro y ninguno ha sido realmente efectivo. Algunos estudios señalan que el uso de la espiramicina dá buenos resultados. Sin embargo, en los pacientes inmunodeficientes no se ha logrado erradicar al parásito por completo, (4,15,17)

OBJETIVO.

Conocer la incidencia de *Cryptosporidium sp.* en las evacuaciones de enfermos con diarrea que acuden a los Laboratorios Clínicos de Puebla (LCP), utilizando los métodos de tinción de Ziehl-Neelsen modificada y la inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales (Merifluor), con el objeto de comparar los métodos y estandarizar la técnica de búsqueda de *Cryptosporidium* mediante inmunofluorescencia.

MATERIAL.

Se estudiaron 53 muestras que llegaron al departamento de parasitología de LCP. Las muestras incluidas en el protocolo necesariamente tenían que ser de consistencia líquida o semilíquida, con o sin moco y sangre. Fueron incluidas también 9 muestras remitidas para investigar el parásito específicamente, aunque ellas no cumplieran con los requisitos indicados.

Del total, 33 muestras (62.26%) correspondieron a pacientes de sexo masculino, y las otras 20 (37.74%) a pacientes de sexo femenino. El intervalo de edad fue desde 2 meses hasta los 81 años para los varones (media de 40.5 años), y de 1 año 11 meses a 53 años en las mujeres (media de 34.4 años). Más del 50% de las muestras fueron procesadas en los meses de invierno.

METODO.

Se tomaron alícuotas de 1.5 ml. de cada muestra con pipeta Pasteur y se colocaron en un tubo de ensaye de 15 x 98 mm, con 1.5 ml. de formol al 10%, dejando reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos, por lo menos, para permitir la fijación. De esta muestra, y empleando el "transfer" proporcionado por el equipo Merifluor se colocó una alícuota sobre una laminilla, cuidando de no raspar la superficie y haciéndolo por duplicado (1 laminilla del equipo Merifluor y una laminilla de vidrio limpia para tinción ácida), dejándolas secar a temperatura ambiente y conservándose así hasta el proceso de detección.

I. TINCION DE ZIEHL-NEELSEN MODIFICADA.

PROCEDIMIENTO:

1. La laminilla previamente preparada, se cubre con carbol-fucsina por 20 a 30 minutos.
2. Se lava con agua de la llave y se resbala sobre el extendido alcohol etílico al 99%.
3. Se cubre el extendido con azul de metileno al 0.3% por 1-2 minutos.
4. Se lava y se deja secar a la temperatura ambiente.
5. Observación al microscopio (40X e inmersión).

II. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (MERIFLUOR).

PROCEDIMIENTO:

* Colocar el equipo a temperatura ambiente (TA) antes de usarlo.

1. Se agrega a la laminilla preparada (con 3 pozos), en un nuevo pozo, 10 ul del control positivo y se deja secar 30 minutos por lo menos.
2. Se colocan 20 ul de reactivo de detección en cada pozo.
3. Se agregan 10 ul de reactivo de contratinción en cada pozo; se mezclan suavemente ambos reactivos con un aplicador, sin raspar, cubriendo toda la superficie del pocillo.
4. Se incuban 30 minutos en cámara húmeda protegiendo de la luz y a TA.
5. Se lava la laminilla con un chorro suave de solución de lavado 1X, pozo por pozo, evitando contaminaciones cruzadas.
6. Se quita el exceso de solución de lavado mediante un golpe en el borde de la laminilla (a su largo), sobre un papel limpio y seco, sin dejar secar la laminilla.
7. Se agregan 10 ul del medio de montaje a cada pozo y se coloca un cubre-objetos largo.
8. Se observa cuidadosamente todo el pozo en microscopio de fluorescencia (con 100X y 200X)

RESULTADOS.

En el grupo de evacuaciones líquidas hubo 4 casos positivos. Uno correspondió a un paciente del sexo femenino de 13 años de edad, originario de Tehuacán, Pue. Los otros 3 casos, fueron pacientes adultos VIH positivos, de los que uno era del sexo femenino, originario de Puebla, y los dos restantes de sexo masculino radican en Chiapas.

Del segundo grupo, 3 muestras fueron positivas, correspondiendo a pacientes adultos de sexo masculino, positivos para el VIH y procedentes del Estado de Puebla.

Cabe señalar que la positividad de tales muestras fueron hechas con el equipo Merifluor, y que a su vez, se encontraron negativas por la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen modificada, con lo que se evitó el informe de resultados falsos negativos, apreciando entonces una sensibilidad y especificidad del 100% empleando el equipo Merifluor.

DISCUSION.

Cryptosporidium es un organismo poco infrecuente en el intestino humano. La diarrea crónica que ocasiona debe obligar al clínico a investigar si existe deficiencia inmunológica asociada. Se ha encontrado frecuentemente en pacientes afectados de SIDA (4), y también en enfermos con hipogamaglobulinemia congénita; en receptores de trasplante renal sometidos a terapia inmunosupresora; en deficiencias adquiridas de IgA (4,15) y, recientemente, se ha encontrado el parásito en las evacuaciones de pacientes con diabetes mellitus afectados de diarrea crónica, (15)

Las manifestaciones clínicas de la infección por *Cryptosporidium sp.* tanto en pacientes inmunocompetentes como en pacientes con deficiencias inmunológicas, fueron descritos por Current y cols. en 1983 (2). Encontraron que en el adulto inmunocompetente la diarrea se autolimita, mientras que en el inmunodeficiente evoluciona hacia la cronicidad, (2,4). Los síntomas primarios incluyen diarrea (de consistencia líquida), explosiva, que por lo general se acompaña de vómito, cólico y fiebre, que duran entre 2 y 14 días. En los pacientes inmunodeprimidos los síntomas son más graves y persistentes, pudiendo ocasionar la muerte, (2,4). Los pacientes inmunocompetentes expulsan quistes infectantes en las evacuaciones durante varias semanas, aún cuando se encuentren asintomáticos, (17)

La criptosporidiosis pulmonar o respiratoria, es una rara complicación de la infección intestinal, en pacientes con SIDA se han informado menos de 30 casos desde 1984,(16). La patogenia de la infección pulmonar no es clara. La infección puede resultar de la inhalación de los quistes después del vómito o por diseminación hematogena. Aunque la criptosporidiosis intestinal por lo general no es invasiva, los quistes han sido encontrados dentro de los macrófagos, los cuales pueden presentar un defecto en su capacidad fagocítica. En efecto, los microorganismos pueden multiplicarse en macrófagos *in vitro*, lo que sugiere que la infección extraintestinal puede diseminarse por vía circulatoria a través de los fagocitos, (3)

La transmisión del parásito ocurre frecuentemente por la ingestión de los quistes que han sido excretados por animales o personas infectadas. Así, una persona puede infectarse si ingiere agua o consume alimentos

contaminados, (17). La transmisión de persona a persona por lo general es por contaminación ano-mano-boca, principalmente cuando se tienen malos hábitos higiénicos (4,17), pero también puede presentarse en el caso de los homosexuales masculinos o femeninos (8, 14) por las peculiares prácticas sexuales entre ellos.

Recientemente se han presentado brotes epidémicos de criptosporidiosis debido a la contaminación del agua. De esta forma, la infección puede adquirirse por ingestión de agua de un pozo contaminado, por aguas no tratadas e incluso de aguas tratadas (17). Tal es el caso del brote ocurrido en Milwaukee en Abril de 1993 (9), donde se estima que 403,000 personas presentaron diarrea por haber bebido agua contaminada proveniente de una planta tratadora. A partir de entonces, se hicieron varios estudios en estas plantas tratadoras de agua, y se encontró que el parásito sobrevive en el 27 y hasta el 54% de las muestras que fueron sometidas a nuevos tratamientos. La desinfección, efectiva para matar *Giardia* y otros organismos, no es efectiva para erradicar *Cryptosporidium* (9,17)

El diagnóstico de esta infección requiere de la identificación morfológica de los quistes de *Cryptosporidium* en heces o en biopsias de intestino (4). La sensibilidad de la tinción rutinaria de las muestras puede estar limitada por el bajo número de microorganismos. García y cols. (6), informan su experiencia con un equipo comercial altamente específico que emplea anticuerpos monoclonales, el cual demostró gran sensibilidad al compararlo con las tinciones rutinarias de las muestras seleccionadas, por su gran capacidad de detectar un reducido número de microorganismos. De esta manera, disminuyó la cantidad de resultados falsos negativos, observando posteriormente en otros estudios, que se tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98.5% cuando se le compara con métodos rutinarios (6,10,11)

Mientras que las muestras teñidas con métodos convencionales, como la tinción de Ziehl-Neelsen modificada, requieren de una gran experiencia y de un tiempo de escrutinio prolongado, la inmunofluorescencia directa es más rápida y más sensible. Sin embargo, requiere también de personal capacitado. Su única limitante es que requiere de un microscopio de fluorescencia no siempre al alcance de muchos laboratorios (8,7,11,13)

CONCLUSION.

Se concluye que estos hallazgos són semejantes a los obtenidos en informes previos donde tambien se han utilizado anticuerpos monoclonales e inmunofluorescencia directa. Se ratifica que el método tiene capacidad de detección mayor que la tinción de Ziehl-Neelsen modificada, y, como consecuencia que disminuye el número de resultados falsos negativos, lo que lo hace áltamente recomendable en la búsqueda rutinaria de *Cryptosporidium*.

BIBLIOGRAFIA.

1. TYZZER E.E. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proc Soc Exp Biol Med 1907; 5: 12-13.
2. WILLIAM L. CURRENT, NORMAN C. REESE, et al. Human Cryptosporidiosis in Immunocompetent and Immunodeficient persons. N Engl Med 1983; 308: 1252-7.
3. EILEEN M. BRADY, MITCHELL L. MARGOLIS and OKSANA M. KORZENIOWSKI. Pulmonary Cryptosporidiosis in Acquired Immune Deficiency Syndrome. JAMA 1984; 252: 89-90.
4. D.P. CASEMORE, R.L. SANDS and A. CURRY. *Cryptosporidium species* a "new" human pathogen. J Clin Pathol 1985; 38: 1321-36.
5. D' ANTONIO R.G., WINN R.E. TAYLOR J.P. et. al. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal host. Ann Intern Med 1985; 103: 886-88.
6. LYNNE S. GARCIA, ARCHIE C. SHUM and DAVID A. BRUCKNER. Evaluation of a New Monoclonal Antibody Combination Reagent for Direct Fluorescence Detection of *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts in Human Fecal Specimens. J Clin Microbiol, Dec. 1992; 30: 3255-57.
7. LIHUA XIAO and R.P. HERD. Quantitation of *Giardia* Cyst and *Cryptosporidium* Oocyst in Fecal Samples by Direct Immunofluorescence Assay. J Clin Microbiol, Nov. 1993; 31: 2944-46
8. DAVID M MARKOVITZ. Infection with the Human Immunodeficiency Virus Type 2. Ann Intern Med 1993; 118: 211-18.
9. WILLIAM R., MAC KENZIE, et. al. A Massive Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* Infection Transmitted Through the Public Water Supply. N Engl Med 1994; 331: 181-7.
10. KAREN SUE C. KEHL, HELEN CICIRELLO and PETER L. HAVENS. Comparison of Four Different Methods for Detection of *Cryptosporidium species*. J Clin Microbiol, Feb. 1995; 33: 416-18.
11. AJIT J. ALLES, MARY ANN WALDRON and ANTHONY R. MATTIA. Prospective Comparison of Direct Immunofluorescence and Conventional Staining Methods for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* spp. in Human Fecal Specimens. J Clin Microbiol, June 1995: 1632-34.
12. SARAH K. ZIMMERMAN and CYNTHIA A. NEEDHAM. Comparison of Conventional Stool Concentration and Preserved Smear Methods with Merifluor *Cryptosporidium* / *Giardia* Direct Immunofluorescence



- Assay and ProSpecT *Giardia* EZ Microplate Assay for Detection of *Giardia lamblia*. J Clin Microbiol, July 1995; 33: 1942-43.
13. MARY T. PARISI and PHILLIP M. TIERNO, JR. Evaluation of New Rapid Commercial Enzyme Immunoassay for Detection of *Cryptosporidium* Oocyst in Untreated Stool Specimens. J Clin Microbiol, July 1995; 33: 1963-65.
14. ALCIDES R. TRONCOSO, ADRIANA ROMANI y cols. Probable Transmisión de VIH por Contacto Homosexual Femenino. Medicina (Buenos Aires) 1995; 55: 334-36.
15. SANDRA TREVIÑO PEREZ, GERMAN LUNA CASTAÑOS y cols. Diarrea Crónica y *Cryptosporidium* en Pacientes Diabéticos con Subpoblación Linfocitaria Normal. Informe de dos casos. Gac Méd Mex 1995; 131: 219-22.
16. C. DUPONT, E. ROUVEIX and M. DORRA. Microbiological Findings about Pulmonary Cryptosporidiosis in Two AIDS Patients. J Clin Microbiol, Jan. 1996; 34: 227-29.
17. LAURA PELEHACH. When Drinking Water Becomes Hazardous to the Public's Health. Lab Med 1996; 27: 28-35.