

DIAGNÓSTICO DE CRYPTOSPORIDIUM

El objetivo de esta comunicación es mostrar algunos aspectos del diagnóstico histológico y coproparasitológico de *Cryptosporidium*, ya que este coccidio extracelular intestinal, está considerado actualmente como uno de los principales parásitos causantes de diarrea, cuya importancia ha sido reconocida sólo recientemente. Primero se le asoció con la etiología de la diarrea en bovinos, informándose del primer caso en 1971 (13); en hallazgos posteriores se confirmó su relevancia en la causalidad de la diarrea de bovinos (14) y otros animales (16, 17, 18). En humanos la asociación se hizo inicialmente en pacientes con problemas de inmunodeficiencia (3, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 19) y luego en individuos inmunológicamente normales, en los que se ha encontrado una prevalencia que oscila entre el 5 y el 10 por ciento (2, 6, 9).

El cuadro clínico inducido por *Cryptosporidium*, presenta un período de incubación de 4 a 14 días y síntomas como anorexia, náuseas, vómitos, fiebre moderada y diarrea acuosa. La diarrea es autolimitada con una evolución de una a dos semanas; sin embargo, en los pacientes inmunodeficientes, el cuadro tiende a la cronicidad (4, 6, 11, 15).

El parásito realiza su ciclo vital adosado al borde en cepillo del epitelio intestinal; que incluye un ciclo de división esquizogónica y otro gametogónico, para formar finalmente ooquistes que se desprenden y salen en las heces. En el esquema de la Figura 1 se muestra el posible ciclo de este coccidio, junto con la imagen de un intestino parasitado, para mostrar como los diferentes estadios se encuentran adosados a los enterocitos anidados entre las microvellosidades. Estas for-

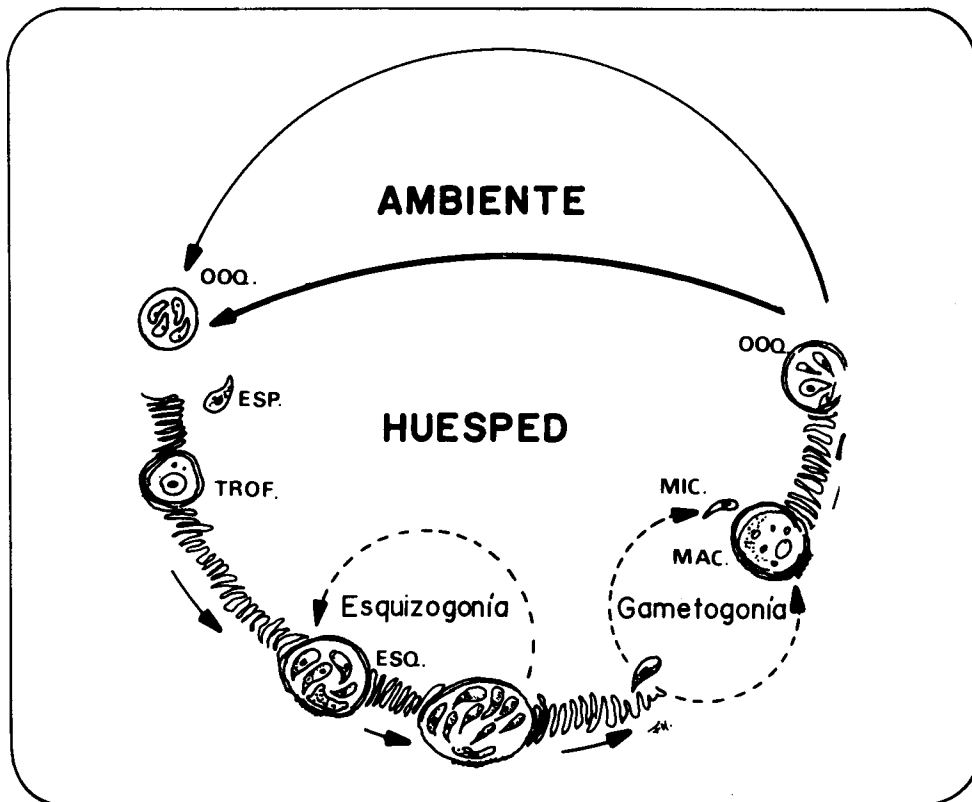


FIG. 1: Posible ciclo de vida de *Cryptosporidium*: ooquistes (ooq), esporozoitos (esp.), trofozoitos (trof.), esquizontes (esq.) de primera y segunda generación con merozoitos en su inferior), macrogametos (mac.) y microgametos (mic.)

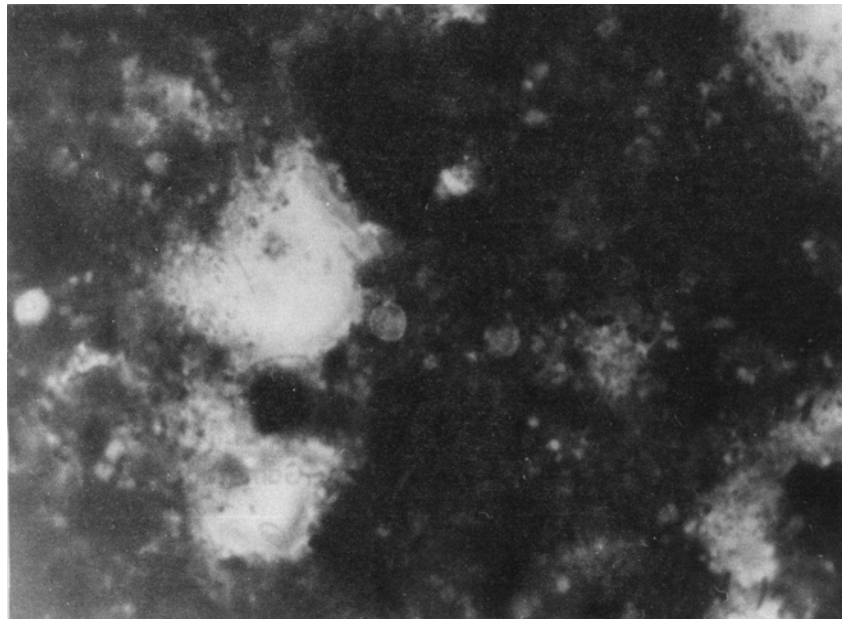
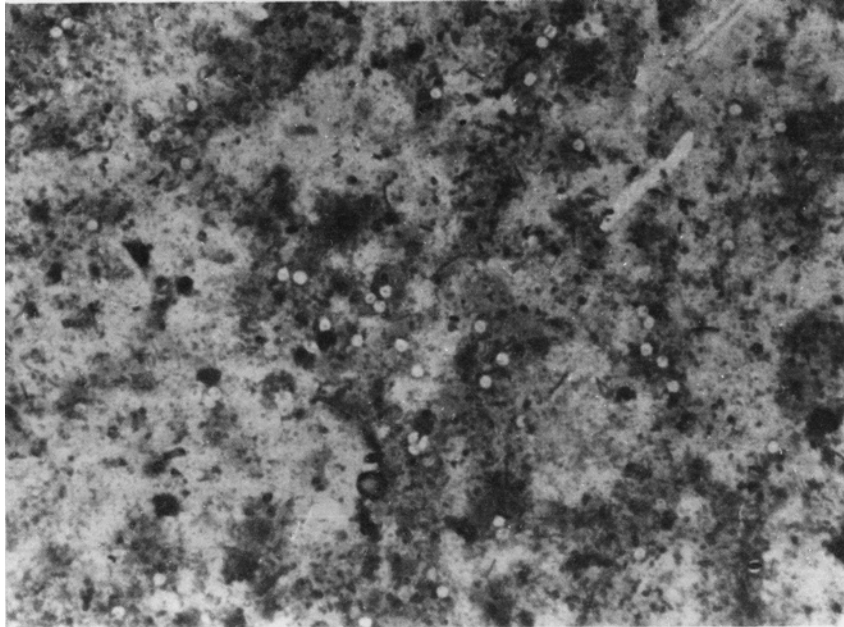


FIG. 1: Posible ciclo de vida del *Cryptosporidium*: ooquistes (ooq), esporozoitos (esp.), trofozoitos (trof.), esquizontes (esq.) de primera y segunda generación con merozoitos en su interior), macrogametos (mac.) y microgametos (mic.).

FIG. 2: Microfotografías de frotis fecales que muestran múltiples ooquistes a) Técnica de Giemsa 200X b) Técnica de fucsina básica 1000X).

mas son detectables al microscopio de luz, en cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina, en donde aparecen como corpúsculos esféricos, eosinofílicos, de 3 a 5 μ m de diámetro. Sin embargo, el diagnóstico más simple y práctico desde el punto de vista clínico suele hacerse mediante la identificación de los ooquistes en frotis de heces, teñidos con Giemsa (2), Ziehl Nielsen (5) o safranina (1) entre otros colorantes. De esta manera, el diagnóstico de *Cryptosporidium*, puede hacerse fácilmente, pudiendo incorporarse a la rutina de los análisis coproparasitológicos.

Para la observación de los ooquistes se hacen frotis delgados de heces en portaobjetos y se dejan secar al aire, luego se fijan con metanol absoluto durante tres minutos y de nuevo se dejan secar al aire. Estas preparaciones pueden teñirse con Giemsa o fucsina básica entre otros colorantes. En el primer caso, el colorante se diluye 1:10 con solución amortiguadora de fosfatos y con este colorante se cubre la laminilla durante 30 minutos, se lava con agua del tubo, se escurre y se deja secar al aire. Para la tinción con fucsina básica, ésta se usa diluida al 1 por ciento y se deja en contacto con la laminilla durante 20 a 30 segundos, se lava, escurre y se deja secar al aire.

En ambos casos las laminillas deben observarse bajo el objetivo de inmersión y los ooquistes se verán como corpúsculos esféricos de 3 a 5 μ m de diámetro, que en algunas ocasiones no toman el colorante, apareciendo como cuerpos claros, que dan la impresión de tratarse de agujeros, contrastados contra un fondo coloreado de violeta o púrpura, según el colorante que se haya utilizado. En los ooquistes teñidos, puede observarse los cuatro esporozoitos, que aparecen como estructuras más coloreadas en las que es posible apreciar el núcleo. En la Figura 2 se muestran algunas preparaciones fecales teñidas con los colorantes mencionados; como puede apreciarse en las muestras que presentan gran cantidad de ooquistes, el diagnóstico puede hacerse fácilmente y en corto tiempo; además, una vez que el analista se familiariza con el parásito, puede hacer el diagnóstico al microscopio empleando el objetivo de 40X.

Creemos que es necesario aumentar la investigación en esta parasitosis en Costa Rica, cuyo diagnóstico debería hacerse rutinariamente en los casos de diarrea, especialmente en niños, por lo que hacemos un llamado en tal sentido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Baxby, D. & Blundell, N. Sensitive, rapid, simple methods for detecting *Cryptosporidium* in faeces. *Lancet*. 1983;
2. Casemore, D.P. & Jackson, B. Sporadic cryptosporidiosis in children. *Lancet* 1983; 2:679.
3. Collier, A.C., Miller, R.A. & Meyer, J.D. Cryptosporidiosis after marrow transplantation: person to person transmission and treatment with spiramycin. *Ann. Int. Med.* 1984; 101:205-206.
4. Current, W.L., Reese, N.C., Ernst, J.V. & Bailey, W.S. Human cryptosporidiosis-Alabama. *M. M. W. R.* 1982; 252-254.
5. Henriksen, S.A., Pohlenz, J.F.L. Staining of cryptosporidia by a modified ziehl-Neelsen technique *Acta Vet. Scand.* 1981; 22:594-596.
6. Jokipii, L., Pohjola, S. & Jokipii, A. M. M. *Cryptosporidium*; a frequent finding in patients with gastro intestinal symptoms. *Lancet*, 1983; 2:348-361.
7. Jonas, C., Deprez, C., Maubeuge, J.D., Taelman, H., Panzer, J.M. & Deltenre, M. *Cryptosporidium* in patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Lancet*. 1983; 2:964.
8. Lasser, K.H., Lewin, K.T. & Rynning, F.W. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. *Hum. Pathol.* 1979; 10:234-340.
9. Mata, L., Bolaños, H., Pizarro, D. & Vives, M. Cryptosporidiasis en niños de Costa Rica: Estudio transversal y longitudinal. *Rev. Biol. Trop.* 1984; 32:129-135.
10. Meisel, J.L., Perera, D.R., Meligro, C. y Rubin, C.E. Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology*, 1976; 70:1156-1160.
11. Miller, R.A., Holmberg, R.E. & Clausen, C.R. Life threatening diarrhea caused by *Cryptosporidium* in a child undergoing therapy for acute lymphocytic leukemia. *J. Pediatr.* 1983; 103:256-259.
12. Nime, F.A., Burek, J.D., Page, D.L., Holscher, M.A. & Yardley, J.H. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan cryptosporidium. *Gastroenterology*. 1976; 70:592-598.
13. Panciera, R.J., Thomassen, R.W. & Garner, F.M. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol* 1971; 8:479-484.
14. Pohlenz, J., Moon, H.W., Cheville, N.F. & Bemrick, W.J. Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 1978; 172:452-457.
15. Tzipori, S., Angus, K.W., Gray, E. W. & Campbell, I. Vomiting and diarrhea associated with cryptosporidial infection. *N. Engl. J. Med.* 1980; 303:818-1980.
16. Tzipori, S., Agunsu, K.W., Campbell, I. & Sherwood, D. Diarrhea in young red deer associated with infection with *Cryptosporidium*. *J. Infect. Dis.* 1981; 144:170-174.

17. Tzipori, S. & Campbell, I. Prevalence of Cryptosporidium antibodies in 10 animal species. *J. Clin. Microbiol.* 1981; 14:455-456.
18. Tzipori, S., Sherwood, D., Angus, K.W., Campbell, I. & Gordon, M. Diarrhea in lambs: experimental infection with enterotoxigenic *Escherichia coli*, rotavirus and *Cryptosporidium* sp. *Am. J. Clin. Pathol.* 1979; 72:473-478.
19. Wiesburger, W.R., Hutchison, D.F., Yardley, J.H., Roche, J.C., Hillis, W.D. & Charade, P. Cryptosporidiosis in an immunosuppressed renal transplant recipient with Ig A deficiency. *Am. J. Clin. Pathol.* 1979; 72:473-478.

DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ
Unidad de Microscopía Electrónica
Universidad de Costa Rica

DR. GILBERTO VARGAS SOLANO
Servicio de Patología
Hospital Nacional de Niños

DR. MARCO TULLIO OVIEDO
Laboratorio de Salud Animal
Ministerio de Agricultura y Ganadería

**Señora
Dra. Jessie Orlich
Revista Costarricense de Ciencias Médicas
Centro de Investigación y Docencia
Hospital México
San José, Costa Rica**

Estimada Doctora Orlich:

La lectura de la nota de los doctores Mora y Esquivel publicada en el Vol. 7, No. 1, de la revista editada por Ud., nos motiva a dar una respuesta por extenso, en vista de la obvia insistencia de los susodichos especialistas en utilizar una falacia de autoridad para evitar una discusión de tondo. Creemos que es importante esta respuesta porque la supuesta motivación de las intervenciones de los doctores Mora y Esquivel fue "enmendar errores de concepto", pero pareciera que esta motivación nace de una crasa ignorancia de conceptos básicos de cinética enzimática y del tratamiento estadístico de datos experimentales.

Como profesores universitarios, María Espinosa y Rigoberto Blanco, nos preocupa que argumentos basados en conceptos elementales no sean discutidos ni refutados con otros argumentos, sino sencillamente ignorados y evadidos con frases nebulosas; y lo que es aún más preocupante, es que este tipo de actitudes provenga de personas que deben ser el ejemplo para los profesionales en formación.

Aunque de antemano sabemos que es tiempo perdido entrar en una discusión de fondo, es por respeto a los lectores de la revista que nos permitimos presentar la evidencia experimental que sustenta la validez de la suposición usada en nuestro trabajo.

Los doctores Mora y Esquivel hacen la afirmación de que es "fundamental para poder demostrar las bondades del cálculo del error sistemático total" el si la reacción es de orden cero o de orden uno. Sin embargo, ni es fundamental para la validez de nuestras conclusiones este requisito ni la reacción es, como afirman los especialistas, de orden uno, como demostramos a continuación.

1) - La cinética de la reacción catalizada por el enzima GTP es del tipo Michaelis-Menten (1-5). Esto significa, como lo sabe cualquier estudiante de Bioquímica, que la velocidad inicial de la reacción, y, está dada por:

$$v = V_{max} (S) (E) / [K_m + (S)] \quad (1)$$

en donde V_{max} es la velocidad máxima en condiciones de saturación de la enzima, (5) es la concentración de sustrato, (E) es la concentra-

ción de la enzima, y K_m es la constante de Michaelis-Menten. De aquí es obvio que el orden de reacción cero o uno con respecto al sustrato corresponde a condiciones límites. Esto es, cuando la concentración de sustrato tiende a cero, la cinética es de orden uno con respecto al sustrato:

$$si (S) entonces v \approx V_{max} (S) / K_m \quad (2)$$

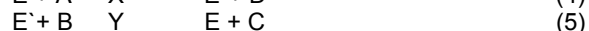
Cuando la concentración de sustrato tiende a valores grandes entonces:

$$(5) \gg K_m \text{ y } v \approx V_{max} \quad (3)$$

y la reacción es de orden cero.

Entre estos dos límites, la reacción no tiene un orden definido, la reacción no es de orden cero ni de orden uno. Precisamente la cinética tipo Michaelis - Menten es uno de los ejemplos escogidos por los textos para ilustrar que el orden de una reacción es un parámetro experimental cuyo valor depende de las condiciones experimentales (6,7), y que tiene sentido solo en cierto tipo de reacciones.

2) - Por otro lado, la enzima GTP es un enzima de cuatro sustratos, siendo su comportamiento Michaeliano con respecto a cada uno de ellos (1-5). La reacción puede ser representada con el mecanismo:



en donde A=L-alanina, B= α -cetoglutarato, C = L-glutarato, D = piruvato, E y E' son distintas formas del enzima (las formas piridoxal y piridoxamina, respectivamente).

Los valores de las diferentes constantes han sido reportados (3,5), y son los siguientes:

Sustrato	K_m/mM	V_{max} absoluta umoles/minutos
A	34	145
B	1.1	121
C	15	125
D	0.9	139

3) - Con la información anterior se puede estimar el error introducido cuando la cinética se simplifica suponiendo orden cero u orden uno. Las condiciones experimentales en las que se realiza la determinación de acuerdo con Reitmann y Frenkel son: concentración inicial de alanina igual a 167 mM, concentración inicial de α -cetoglutarato igual a 1,67 mM. Para la velocidad inicial las leyes cinéticas en las condiciones experimentales serían:

$$v(A) = .028 \times 167 / (22.6 + 167) \times (E) = 2.47E-2 \times (E) \quad (6)$$

$$v(B) = .0325 \times 1.67 / (.94 + 1.67) \times (E) = 2.07 E-2 \times (E) \quad (7)$$

Las velocidades iniciales suponiendo orden cero son:

$$v(A),0 = .028 \quad v(B),0 = .0325$$

y los porcentajes de error son:

$$\% \text{error } v(A) = 13\% \quad \% \text{error } v(B) = 57\%$$

Las velocidades iniciales suponiendo orden uno son:

$$v(A),1 = 0.207 \quad v(B),1 = 0.058$$

y los porcentajes de error son:

$$\% \text{error } v(A) = 738\% \quad \% \text{error } v(B) = 180\%$$

Es obvio que la suposición de pseudo orden cero implica un error menor en el cálculo de la velocidad inicial.

Pero la estimación del error puede hacerse también al tiempo en que se detiene la reacción, o sea a los treinta minutos. Para esto se puede utilizar la expresión integrada.

$$-K_m/V_{ma} \times \ln(C_i/C_o) - 1/V_{max} \times (C_i - C_o) = t / (E) \quad (9)$$

Que para los sustratos en cuestión se convierte en:

$$-22.6/.028 \times \ln CA/167 - 1/.028 (C_a - 167) = 30$$

$$-.94/.0325 \times \ln CB/1.67 - 1/0.0325 (CB - 1.67) = 30$$

utilizándose una concentración unitaria de enzima con el fin de facilitar los cálculos. Los valores de CA y CB pueden obtenerse por aproximaciones sucesivas y los resultados son:

$$CA = 116.75 \text{ y } CB = 1.46$$

Utilizando las expresiones integradas se obtienen los siguientes resultados:

$$\text{Orden cero} \quad CA,0 = 166.26$$

$$CB,0 = 1.095$$

$$\text{Orden uno} \quad CA,1 = 161.50$$

$$CB,1 = 0.72$$

De aquí se puede concluir que la aproximación de pseudo orden cero da resultados más cercanos a los de la expresión completa que la aproximación de pseudo primer orden, aunque con los dos se comete cierto error.

4) - Nos parece curioso que los doctores consideren la explicación de la cinética dada en nuestra carta anterior como "un análisis supuestamente científico, aunque un tanto oscuro" ... "construido para probar su acertijo". Pero este es el modelo presentado anteriormente, aceptado y probado para la reacción de transaminación por la alanina transferasa. Conociendo la literatura como dicen conocerla, no entendemos como no reconocieron información tan conocida, que se encuentra en cualquier texto moderno de Bioquímica (4,8,9).

De todas maneras, es obvio de las ecuaciones 4 y 5 que la reacción 4 es la determinante de

la velocidad de reacción, porque inicialmente la enzima está en su forma piridoxal, E, y la concentración de la piridoxamina, forma E, es cero o cercana a cero. Es importante notar, que en las condiciones en las que se realiza la reacción, la aproximación de pseudo orden cero es capaz de representar la velocidad con un error del 13%. 5) - Este no es el lugar para discutir los detalles del trabajo de Purdue y colaboradores (10), citado en nuestro artículo como referencia 10, y vuelto a citar en nuestra anterior respuesta. Pero dicho artículo es crucial en la interpretación de los resultados y por eso llamamos la atención hacia el mismo. En la página 1034, ecuaciones 11-a y 11-b, se demuestra que al expresar el error en forma de error relativo, la expresión obtenida es la misma, independientemente de si la reacción es de pseudo orden cero o pseudo orden uno.

$$\text{ecuación 11-a, ref. 10 } C_o = 1/K_oabx\Delta A/At$$

$$\text{ecuación 11-b, ref. 10 } C_i = 1/ab \times$$

$$\exp[-k_1t_1/(1-\exp(-k_1t_1))]x \Delta A$$

Nótese que ambas ecuaciones son de la forma:

$$C = K \times \Delta A$$

y en ambos casos el error relativo en la concentración estará dado por:

$$E_c/C = EA/\Delta A$$

Para ponerlo en palabras de los autores "In other words, the relative error in the measurement of the absorbance interval is equal to the relative concentration error. An identical results follows for pseudo-first-order reactions, and the conclusion applies for both systematic and random errors".

Esto significa que la validez de las conclusiones hubiera sido la misma si el análisis se hubiera realizado suponiendo pseudo orden uno.

En la oportunidad de nuestra reunión con el Dr. Esquivel insistimos en este punto, que posteriormente no fue considerado ni ha sido considerado por los críticos a pesar de que es un punto crucial en todo este asunto.

6)- El objetivo del trabajo era determinar el error sistemático total del procedimiento seguido normalmente en un laboratorio clínico. Esto no parece haber sido comprendido por los distinguidos enzimólogos cuando hablan en su nota sobre si construimos o no curvas de calibración. Por supuesto que si construimos curvas de calibración. Si no, ¿cómo hubiéramos hecho el trabajo? Lo que sí no comprendemos es su afirmación de que utilizando una curva de calibración nos hubiéramos evitado hacer suposiciones sobre el orden de la reacción. Después de la

discusión en los apartados anteriores sobre la cinética de esta reacción, debe ser obvio que una simple curva de calibración no va a definir el orden de la reacción.

Nuestro objetivo no era evaluar la cinética de la reacción, sino estudiar el efecto que sobre una medición tiene cada uno de los pasos del procedimiento seguido rutinariamente, utilizando procedimientos estadísticos bien establecidos.

7) - En conclusión, creemos que la evidencia presentada permite asegurar que:

- i. La reacción no tiene un orden definido con respecto al sustrato, éste sólo está definido en condiciones experimentales extremas.
- ii. La suposición hecha es razonable dentro de las condiciones experimentales en las que se realiza la reacción.
- iii. La validez de las conclusiones del artículo en cuestión no dependen de si el orden de la reacción es uno o cero. Esta suposición no es fundamental para la validez de las conclusiones. Agradeciéndole de antemano la publicación de esta respuesta, quedan a sus órdenes.

Lic. Rigoberto Blanco Dra. Gerarda Rodríguez

Barnett Institute of Chemical Analysis and Material Science
Northeastern University.
Boston, MA 02115
U.S.A.

Lic. Mario Espinosa
Chapman College
Food and Nutrition Science
Orange, CA 92667
U.S.A.

Dra. Flor Sandi
Laboratorio Clínico
Hospital San Rafael
Alajuela

BIBLIOGRAFÍA

1. Meister, A. The Enzymes, Vol. 6., Academic Press, N.Y. (1962) p-93
2. Gatehouse P.W., Hopper, S., Schatz, L. y Segal, H.L. J. Biol. Chem., 1967; 242:2319.
3. Barman, T.E. Enzyme Handbook, Vol. 1, Springer - Verlag, N.Y. (1969) p-356-357.
4. Walsh, C. Enzymatic Reaction Mechanisms, Freeman, San Francisco, (1979) p.781-797.
5. Hooper, S. y Segal H.L. J. Biol. Chem. 1962; 237:3189.
6. Atkins. P.W. Physical Chemistry, Freeman, San Francisco. (1978) p-872.
7. Amdur, I., Hammes, G.G. Chemical Kinetics: Principles and Selected Topics. Mc Graw-Hill, New York. (1966) p-165ss.
8. Stryer, L. Biochemistry, Freeman, San Francisco (1975) p-433.
9. Metzger, D.E. Biochemistry, Academic Press, Londres, (1977) p-449.
10. Purdue, H.L, Hewitt, T.E., y Milano, M.J. Clin. Chem. 1974; 20:1028.