

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*

MIREY SIUFFI, M.D.¹, MARIO ANGULO, M.D.¹, CARLOS ALBERTO VELASCO, M.D.^{2,5},
PÍO LÓPEZ, M.D.², VÍCTOR HUGO DUEÑAS, BACTERIOL.^{3,5}, CONSUELO ROJAS, BACTERIOL.^{4,5}

RESUMEN

Introducción: *Cryptosporidium* spp. (*C. spp.*) causa morbimortalidad en niños con SIDA.

Objetivo: Identificar la asociación entre carga viral, CD4 y *C. spp.* en heces de niños con SIDA.

Materiales y métodos: Estudio observacional en niños del Hospital Universitario del Valle de Cali. Se tomaron datos como edad, género, procedencia, consanguinidad, tratamiento, estadio, supervivencia materna y peso. Se analizaron las heces por la técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Se midieron carga viral y niveles de linfocitos ayudadores TCD4. La estadística incluyó análisis estratificado, modelos de regresión logística, pruebas t de Student, X², y prueba de Fisher, con p significativa <0.05.

Resultados: Ingresaron 72 niños entre 0 y 15 años, 52.7% masculinos, 50% consanguíneos y con madre viva, 54.2% del área urbana, 69.1% institucionalizados, 36.1% grado C de severidad, 73.6% con análogo nucleósido con inhibidor de proteasa, 55% con >100,000 copias de carga viral y >100,000 células CD4. La prevalencia de *C. spp.* fue 51.4%, siendo más afectados entre los 5-10 años; con mayor proporción de niños positivos para *C. spp.* con grado severo para SIDA (p = 0.03). Con intervalo de confianza de 95%, los >2 años tuvieron un riesgo 8 veces mayor de ser positivos en heces para *C. spp.* (1.6-40.1); para edad, género y procedencia rural, 7.7 (1.5-38.9); para madre viva y estar institucionalizado, 6.1 (1.1-32.7), y para severidad de la enfermedad y peso, 5.7 (1-32.3).

Conclusión: La prevalencia para *C. spp.* fue 51.4%, con factores de riesgo edad >2 años y grado de severidad C, sin diferencias significativas en peso, carga viral y niveles de CD4.

Palabras clave: *Cryptosporidium* spp. SIDA. Niños. Carga viral. Linfocitos CD4.

Relation between viral load and CD4 versus Cryptosporidium spp. in feces of children with AIDS

SUMMARY

Introduction: *Cryptosporidium* spp. (*C. spp.*) cause morbi-mortality in children with AIDS.

Objective: To identify the association between viral load, CD4 levels and *C. spp.*, presence in feces of children with AIDS.

Materials and methods: Observational study in children of the Hospital Universitario del Valle of Cali. Data like age, gender, origin, consanguinity, treatment, stage, maternal survival and weight, were taken. Feces were analyzed by the technique of Ziehl-Neelsen modified. Viral load and CD4 levels were measured. Statistic included stratified analysis, models of logistic regression, and tests, t Student, X², and Fisher's, being significant p <0.05.

Results: Were analyzed 72 children between 0 and 15 years, 52.7% masculine ones, 50% consanguinity and with alive mother, 54.2% of the urban area, 69.1% institutionalized ones, 36.1% severity degree C, 73.6% with analog nucleoside with protease inhibitor,

* Trabajo de Tesis de grado para optar al título de Especialista en Pediatría de los doctores Mirey Siuffi y Mario Angulo.

1. Residente, Departamento de Pediatría, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
e-mail: mireysiuffi@yahoo.com marioangulo@hotmail.com
2. Profesor Titular, Departamento de Pediatría, Escuela de Medicina, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
e-mail: cvelasco@univalle.edu.co
3. Profesor Asociado, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
e-mail: vhduenas@univalle.edu.co
4. Profesora Auxiliar, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
e-mail: crojasc@telesat.com.co
5. Grupo de Investigación en Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica GASTROHNUP. Cali, Colombia.
e-mail: gastrohnup@univalle.edu.co

Recibido para publicación diciembre 3, 2005 Aceptado para publicación enero 17, 2006

55% with >100,000 copies of viral load and >100,000 cells CD4. The prevalence of *C. spp.* was 51.4%, being more affected between 5 to 10 years; with a greater proportion of positive children for *C. spp.* with severe degree for AIDS ($p=0.03$). With interval of confidence of 95%, >2 years had a greater risk 8 times to be positive in feces for *C. spp.* (1.6-40.1); for age, gender and rural origin, 7.7 (1.5-38.9); alive mother and to be institutionalized, 6.1 (1.1-32.7), and for severity of the disease and weight, 5.7 (1-32.3).

Conclusion: The prevalence for *C. spp.* was 51.4%, with risk factors age >2 years and degree of severity C, without significant differences in weight, viral load and CD4 levels.

Key words: *Cryptosporidium spp.*; AIDS; Children; Viral load; CD4 levels.

Desde 1983, Schultz¹ llamó la atención sobre los parásitos emergentes y re-emergentes causantes de diversos cuadros clínicos; en efecto, varios años después un brote masivo de criptosporidiosis, ejemplo de estas infecciones, se consideró en Estados Unidos entre las catástrofes nacionales². En Colombia, por medio de modificaciones a la técnica de coloración de Ziehl-Neelsen, en heces de niños sanos de Piedecuesta, Santander, la prevalencia para *Cryptosporidium spp.*, fue 32.3%³; en los niños enfermos con cáncer en el Hospital Universitario «Ramón González Valencia» de Bucaramanga, Santander, la cifra fue 42%⁴; por la prueba ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) en niños sanos del Centro de Salud de Lourdes (Comuna 18) de Cali, Valle, hubo una prevalencia de 4%⁵ y de 5.8% también en niños sanos del Hospital Infantil «Club Noel» de Cali (Carvajal J. *Cryptosporidium spp.*, en el Hospital Infantil «Club Noel» de Cali, Colombia. Observaciones no publicadas). Chappell y Okhuysen⁶ discuten la importancia de *Cryptosporidium spp.*, en enfermos con VIH/SIDA. El *Cryptosporidium spp.*, causa diarrea y desnutrición en niños con VIH/SIDA⁷. La prevalencia para *Cryptosporidium spp.*, en enfermos con VIH en diferentes ciudades de diversos países^{8,9} varía entre 3% y 6%; sin embargo, en el medio de Cali no se conoce su frecuencia en niños con infección por VIH/SIDA.

En junio de 1988 en el Hospital Universitario del Valle (HUV) «Evaristo García» de Cali, Colombia, se dio comienzo a la Clínica Pediátrica de VIH/SIDA, donde se atiende a casi todos los niños del occidente y del eje cafetero de Colombia que sufren estos síndromes. La Clínica, recibe cada año un promedio de 18 casos nuevos de infección por VIH/SIDA. Desde su fundación, hasta la

fecha, se han atendido 332 niños en total; de ellos provienen de Cali y son menores de cinco años, 63%; se hallan en diversas instituciones, 11.5%; son huérfanos, 21% (pues falta por lo menos uno de los progenitores); y a los estratos socioeconómicos 1, 2 y 3 corresponden 97%. Además, se ha visto una transmisión vertical de 99.3%, con diarrea como segunda causa de hospitalización y una mortalidad por VIH/SIDA de 42% (López P. Clínica Pediátrica de VIH/SIDA del Hospital Universitario del Valle «Evaristo García» de Cali, Colombia. Observaciones no publicadas).

El objetivo del presente estudio es identificar la asociación entre los niveles de carga viral y los niveles de los linfocitos ayudadores T CD4 al diagnóstico de infección por VIH/SIDA, con la presencia de *Cryptosporidium spp.* en materia fecal por medio de la técnica de Ziehl-Neelsen modificada en los niños de la Clínica Pediátrica de VIH/SIDA del Hospital Universitario del Valle de Cali, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio observacional en una cohorte dinámica de menores de 16 años, referidos a la Clínica Pediátrica de VIH/SIDA del Hospital Universitario del Valle (HUV) «Evaristo García» de Cali, Colombia, entre julio de 1998 y enero de 2005, con diagnóstico de infección por VIH/SIDA, según la carga viral, sin otra inmunodeficiencia comprobada y sin entidades que pongan en riesgo su vida como sepsis, encefalopatía, estatus epiléptico, falla renal, falla cardíaca, falla hepática o falla orgánica multisistémica.

Se registraron datos como edad en el momento de la toma de la muestra de heces (0 a 2, 2.1 a 5, 5.1 a 10, 10.1 a 15 años cumplidos), género (masculino, femenino), procedencia (rural, urbana), institución de donde provenían («Fundamor»), consanguinidad de los sujetos incluidos en el estudio (hermanos que convivan con el paciente), tratamiento farmacológico para infección VIH/SIDA, estadio de la enfermedad según la clasificación de los CDC (Center for Disease Control) de los Estados Unidos (niños con SIDA leve, moderada o severamente sintomáticos), supervivencia de la madre y peso. Se consideró desnutrición global de acuerdo con las tablas del National Center for Health Statistics (NCHS) de los Estados Unidos, cuando el déficit era superior a 10% según el peso para la edad.

Se tomaron tres muestras de materia fecal, que se analizaron en fresco o para concentrar los ooquistes de *Cryptosporidium* spp., por medio de la técnica de Ziehl-Neelsen modificada. Si la deposición era líquida, se centrifugaba para analizar el sedimento, que se tomó con un asa, y se extendía sobre una lámina donde se mezcló con una gota de solución salina; cuando esta porción estuvo seca, se cubrió con metanol absoluto durante un minuto; luego el portaobjetos se inundó con carbolfucsina de Kinyoun por cinco minutos, se lavó después con alcohol ácido al 1% y se enjuagó inmediatamente con agua; luego se agregó el colorante de Loeffler con azul de metileno por un minuto para lavar otra vez con agua y una vez seco se llevó al microscopio para estudiar la lámina con objetivo de inmersión. Esta es la técnica modificada de Ziehl-Neelsen, sin calentar la placa que, cuando es positiva permite visualizar los ooquistes teñidos de rojo brillante y el resto del material con azul o rojo opaco. Se midieron los niveles de carga viral en copias/ml, y se tomó para el análisis como punto de corte <400 copias/ml y los niveles de CD4 en células/ml, con punto de corte <15%.

El tamaño de muestra fue de 70 niños de la Clínica Pediátrica de VIH/SIDA del HUV, con un error alfa de 0.05, un error beta de 20% y una razón de riesgos por lo menos de 2.5. Se compararon los promedios de las variables independientes por la presencia o no de los parásitos intestinales medidos en el estudio con la prueba t de Student y cuando las varianzas no eran normales u homogéneas, se aplicaron transformaciones o pruebas no paramétricas. Se realizaron tablas de contingencia de 2 x 2 y de n x n, mediante la prueba de χ^2 y por la prueba de probabilidad exacta de Fisher donde tiene significancia una $p < 0.05$. Se efectuó un análisis estratificado para ajustar los cálculos por las variables covariadas, y se construyeron modelos de regresión logística para determinar la independencia de las asociaciones.

Este trabajo lo aprobó el Comité de Ética de la Universidad del Valle y del HUV, y se clasificó como riesgo inferior al mínimo según la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud; además, se contó con el consentimiento informado de cada uno de los padres o tutores de los niños incluidos en el estudio.

RESULTADOS

Ingresaron al estudio, 72 niños de la Clínica Pediátrica de VIH/SIDA del HUV de Cali, Colombia, entre 0 y 15 años de edad (edad promedio 5.4 años), con una razón 1.1

hombre-mujer (52.7% masculinos), la mitad de ellos con consanguinidad y con madre viva; la mayoría proveniente del área urbana (54.2%) e institucionalizados («Fundamor») (68.1%), 36.1% de ellos con grado C de severidad de la enfermedad, 73.6% recibían análogo nucleósido con inhibidor de proteasa, algo más de la mitad con carga viral y de CD4 >100.000 copias (Cuadro 1).

La prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en materia fecal fue 51.4% (37/72), para el grupo de edad más afectado entre los 5.1 y los 10 años (48.6%), seguido de los grupos de edad entre los 2.1 y los 5 años (35.2%), entre los 10.1 y los 15 años (10.8%) y entre los 0 y 2 años (5.4%); con una mayor proporción de niños positivos para *Cryptosporidium* spp. con un grado severo de la infección por VIH/SIDA ($p = 0.03$) (Cuadro 2) y madre muerta ($p > 0.05$).

No hubo diferencias significativas en cuanto al género, consanguinidad, estar institucionalizado, tratamiento, procedencia, ni estado nutricional, al ser comparados; como tampoco en los niveles de carga viral ni de CD4 ($p > 0.05$) (Cuadro 3).

Al realizar el modelo de regresión logística, y con un intervalo de confianza de 95%, los niños mayores de dos años tuvieron un riesgo 8 veces mayor de ser positivos en

Cuadro 1
Descripción general de la población de estudio.
Clínica Pediátrica de VIH/SIDA, HUV, Cali 1998-2005
(n=72)

Característica	N	%
Edad (años)	13	18.1
0-2	24	33.3
2.1-5	26	36.1
5.1-10	7	9.7
10.1-15		
Severidad	25	34.7
A	21	29.1
B	26	36.1
C		
Tratamiento	15	20.8
1	53	73.6
2	4	5.5
Otro		
Nivel de carga viral (copias/ml)	4	5.5
<400	19	26.5
400-29,999	9	12.5
30,000-100,000	40	55.5
>100,000		
Niveles de CD4 (células/ml)	4	5.6
<400	20	27.7
400-29,999	8	11.1
30,000-100,000	40	55.6
>100,000		

Cuadro 2
***Cryptosporidium* spp., en materia fecal de niños de la Clínica Pediátrica de VIH/SIDA del HUV según grado de severidad**

Severidad	<i>Cryptosporidium</i> spp.			
	positivo		negativo	
	n	%	n	%
A	8	21.6	17	48.5
B	13	35.1	8	22.8
C*	16	43.2	10	28.5

* p = 0.03

Cuadro 3
***Cryptosporidium* spp., en materia fecal de niños de la Clínica Pediátrica de VIH/SIDA del HUV según niveles de carga viral, niveles de CD4 y estado nutricional**

	<i>Cryptosporidium</i> spp.			
	N=37 positivo		N=35 negativo	
	n	%	n	%
Niveles de carga viral (copias/ml)				
400-2,875	7	18.9	8	22.8
2,876-29,700	8	21.6	6	17.1
29,701-120,000	9	24.3	6	17.1
120,001-356,875	4	10.8	10	28.5
356,876-860,012	9	24.3	5	14.2
Niveles de CD4 (%)				
<15	7	18.9	15	42.8
15-24	5	13.5	6	17.2
>25	25	67.5	14	40.0
Estado nutricional según peso para la edad				
Eutrófico	11	29.8	8	22.9
DNT leve	11	29.8	12	34.3
DNT moderada	13	35.1	11	31.4
DNT severa	1	5.3	4	11.4

materia fecal para *Cryptosporidium* spp. (1.6-40.1); para las variables edad, género y procedencia rural, el riesgo fue 7.7 (1.5-38.9); para las variables madre viva y estar institucionalizado, el riesgo fue 6.1 (1.1-32.7), y para las variables severidad de la enfermedad y peso, el riesgo disminuyó a 5.7 y no fue significativo (1-32.3).

DISCUSIÓN

El *Cryptosporidium* spp., es uno de los gérmenes oportunistas emergentes que puede afectar a personas con cierto grado de compromiso inmunitario como desnutrición, cáncer y VIH/SIDA^{1,10}. Se ha visto que los viajes

a áreas endémicas son un riesgo para adquirir criptosporidiosis¹¹. Se sabe de epidemias producidas por *Cryptosporidium* en diversos centros de atención y cuidados para niños en Estados Unidos¹²⁻¹⁹, Australia^{20,21}, Francia²², Portugal²³, Chile²⁴, y África del Sur²⁵. Casi 32% de los pacientes con SIDA se sobreinfectan con *Cryptosporidium*²⁷. En una mayor frecuencia los individuos VIH positivos para *Cryptosporidium* se asocian con afecciones biliares, vómito y mayor riesgo de mortalidad, luego del primer año de infección^{4,26-29}.

La prevalencia del *Cryptosporidium* spp., de 51.4% en la población del presente estudio es elevada si se la compara con lo descrito en el artículo de Milwaukee² cuya tasa de infección en pacientes con SIDA para el *Cryptosporidium* spp., fue 32%; con lo que informan los CDC³⁰ de los Estados Unidos, 22% en inmunodeficientes; con la comunicación de Pettoello *et al.*¹⁰ de 6.4% en niños italianos inmunodeficientes y con los datos de Hernández *et al.*³¹ en pacientes VIH positivos, 4.8%; muy similar a lo visto en niños con cáncer del Hospital Universitario «Ramón González Valencia» de Bucaramanga, Colombia⁴, 42%; igualmente alta frente a niños sanos: 7% en niños inmunocompetentes según los CDC³⁰, 4% en menores de 5 años en África³², hasta 9.8% en niños de India³³, 5.9% en Liberia³⁴, hasta 11.6% en Guatemala^{26,35}, 5% en Asia³⁶ y 32.3% en niños de Piedecuesta, Colombia³ y 4% en niños del Centro de Salud Lourdes de Cali, Colombia⁵; y finalmente, lo mismo que en la población general, según lo descrito en Milwaukee³⁷, Brasil³⁸ y Colombia³⁹. La alta seroprevalencia de anticuerpos anti-*Cryptosporidium* spp., 83.3% en Colombia, indica que la criptosporidiosis es endémica y constituye un problema de salud pública en el país³⁹.

La prevalencia del *Cryptosporidium* spp., en las heces dependerá del método diagnóstico que se siga. En este estudio, al igual que en dos de los tres trabajos previos hechos por el Grupo de Investigación GASTROHNUP en niños sanos de Piedecuesta, Santander³ y en niños con cáncer del Hospital Universitario «Ramón González Valencia» de Bucaramanga⁴, fue la búsqueda de los ooquistes del parásito por visualización al microscopio³¹, que es el patrón de oro en individuos VIH positivos.

Los gérmenes oportunistas se multiplican y sobreviven en niños desnutridos y con funciones comprometidas en su inmunidad. Tampoco se encontró asociación entre los niveles de carga viral o de CD4 con la prevalencia de *Cryptosporidium* spp., en materia fecal. Si bien es cierto,

Hernández *et al.*³¹, describen que los pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), causado por los retrovirus de la inmunodeficiencia humana VIH1 y VIH2, agotan de manera selectiva y progresiva los linfocitos T CD4 ayudadores y que incluso cuando su nivel alcanza un punto crítico de 200 células/ml son más susceptibles a todo tipo de infecciones por agentes oportunistas, en los niños de Cali no se pudo demostrar esto estadísticamente, al igual que lo descrito en la epidemia de Milwaukee, donde no hubo correlación entre los niveles de CD4 y la prevalencia de *Cryptosporidium* spp., aunque sí se prolongó más el episodio diarreico y fue necesario más tiempo de hospitalización y de atención médica^{2,26,37}.

Aunque la criptosporidiosis no tiene una asociación clara y definida con el VIH, cuando existe, produce un empeoramiento de las condiciones clínica e inmunológica, y, en consecuencia, es posible afirmar que la criptosporidiosis entérica se convierte en un signo de la progresión del VIH⁷. En el presente trabajo, la única asociación significativamente estadística que se encontró fue una mayor proporción de niños positivos para *Cryptosporidium* spp., con un grado severo de la infección por VIH/SIDA.

Aunque en la actualidad no hay tratamiento efectivo contra el *Cryptosporidium*, para su manejo terapéutico se usan paramomicina y azitromicina con resultados no concluyentes, pues no es posible definir si la infección se ha resuelto por sí sola o por la acción de estos medicamentos^{2,6,10,40}. El estudio de las rutas de transmisión, a saber, animales, contaminación del agua, alimentos y hasta por la vía sexual, son importantes debido a la poca efectividad en los aspectos preventivos y en el tratamiento de la criptosporidiosis en pacientes con SIDA^{1,9,41}. En los últimos años con el uso de la terapia antirretroviral. HAART (highly active antirretroviral therapy) se ha visto una restauración de las funciones inmunes y se ha podido reducir la incidencia de los efectos de la criptosporidiosis y otras enfermedades oportunistas.

Como recomendación, y debido a que la búsqueda del parásito por microscopio se ha usado con liberalidad consume mucho tiempo, y requiere de una labor intensa y difícil que depende del entrenamiento del examinador y del conocimiento morfológico de las distintas coccidias y en ocasiones no es concluyente, en enfermos inmunodeprimidos se han propuesto otros métodos diagnósticos menos subjetivos con alta sensibilidad y especificidad que permiten analizar y tamizar un gran número de muestras en un tiempo corto, como ELISA⁴²⁻⁴⁵, reacciones de la

polimerasa en cadena (PCR)⁴⁶⁻⁵¹ y pruebas serológicas³⁹.

En conclusión, en este grupo de 72 niños de la Clínica Pediátrica de VIH/SIDA del Hospital Universitario del Valle de Cali, Colombia, la prevalencia para *Cryptosporidium* spp., en materia fecal por la técnica de Ziehl-Neelsen modificada fue 51.4%, con factores de riesgo la edad mayor a los 2 años y el grado de severidad C según la clasificación de los CDC de los Estados Unidos para la infección por VIH/SIDA, sin diferencias estadísticamente significantes en otros factores descritos en la literatura mundial como peso, niveles de carga viral y niveles de linfocitos ayudadores T CD4.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Oscar Ramírez pediatra oncohematólogo y epidemiólogo de la Fundación Clínica Valle del Lili, Cali, Colombia y Carlos Echandía, pediatra epidemiólogo, profesor de la Universidad del Valle, Cali, Colombia, por su desinteresado apoyo en la orientación metodológica y análisis estadístico del presente trabajo.

REFERENCIAS

1. Schultz MG. Emerging zoonoses (editorial). *N Engl J Med* 1983; 308: 1285-1286.
2. Cordell RL, Thor PM, Addiss DG, *et al.* Impact of a massive waterborne cryptosporidiosis outbreak on child care facilities in metropolitan Milwaukee, Wisconsin. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 639-644.
3. Velasco CA, Sarmiento IC, Calderón J, Fonseca RA, Castro P, Carreño M. Prevalence of criptosporidiosis in children younger than 13 years. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 35: 437.
4. Carreño M, Velasco CA, Rueda E. Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. en niños menores de 13 años con afecciones oncológicas. *Colomb Med* 2005; 36 (Supl 2): 6-9.
5. Velasco CA, Vélez D, Dueñas VH, López P, Caro T, Rojas C, Neuta P. Prevalence of *Cryptosporidium* spp. by ELISA test in healthy children from Cali, Colombia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41: 516.
6. Chappell CL, Okhuysen PC. Cryptosporidiosis. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15: 523-527.
7. Velasco CA, García JR. Cryptosporidiosis en pediatría: etiología, epidemiología, cinética de la infección y clínica. *Rev Med UIS* 2002; 16: 20-29.
8. Saavedra CH. Epidemiología de la infección por el VIH. In: *Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/SIDA). Solus Holos (edición especial)*. Bogotá; 2001. p. 8-58.
9. Glaser CA, Safrin S, Reingold A, Newman TB. Association between *Cryptosporidium* infection and animal exposure in HIV-infected individuals (Epidemiology). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 17: 79-82.
10. Pettoello M, Di Martino L, Dettori G, *et al.* Asymptomatic carriage

- of intestinal *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunodeficient children: a prospective study. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 1042-1047.
11. Ungar BLP, Mulligan M, Nutran TB. Serologic evidence of *Cryptosporidium* infection in US volunteers before and during Peace Corps service in Africa. *Arch Intern Med* 1989; 149: 894-897.
 12. Diers J, McCallister GL. Occurrence of *Cryptosporidium* in home day care centers in West Central Colorado. *J Parasitol* 1989; 75: 637-638.
 13. Combee CL, Collinge ML, Britt EM. Cryptosporidiosis in a hospital-associated day care center. *Pediatr Infect Dis* 1986; 5: 528-532.
 14. MMWR. Cryptosporidiosis among children attending day-care centers in Georgia, Pennsylvania, Michigan, California, New Mexico. *Morb Mortal Wkly Rep* 1984; 33: 599-601.
 15. Nwanyanwu OC, Baird JN, Reeve GR. Cryptosporidiosis in a day care center. *Tex Med* 1989; 85: 40-43.
 16. Skeel MR, Sokolow R, Hubbard CV, et al. *Cryptosporidium* infection in Oregon public health clinic patients 1985-1988. The value of a State-wide laboratory surveillance. *Am J Public Health* 1990; 80: 305-308.
 17. Stehr-Green JK, McCraig L, Ramsen HM. Shedding of oocysts in immunocompetent individuals infected with *Cryptosporidium*. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36: 338-342.
 18. Tangermann RH, Gordon S, Wiesner P, et al. An outbreak of cryptosporidiosis in a day-care center in Georgia. *Am J Epidemiol* 1991; 133: 471-476.
 19. Taylor JP, Perdue JL, Dingley D, et al. Cryptosporidiosis outbreak in a day care center. *Am J Dis Child* 1986; 139: 1023-1025.
 20. Cruickshank R, Ashdown L, Croese J. Human cryptosporidiosis in North Queensland. *Aust NZ J Med* 1988; 18: 582-586.
 21. Ferson MJ, Young LC. *Cryptosporidium* and Coxsackie virus B5 causing endemic diarrhoea in a child care center. *Med J Aust* 1992; 156: 813.
 22. Bretagne S, Jacovella J, Breuil J, et al. Cryptosporidiosis in children: outbreaks and sporadic cases. *Ann Pediatr* 1990 37: 381-386.
 23. Mello Cristino JAG, Carvalho MIP, Salgado MJ. An outbreak of cryptosporidiosis in a hospital day-care center. *Epidemiol Infect* 1988; 101: 355-359.
 24. Neira P, Tardio MT, Carabelli M, et al. Cryptosporidiosis in the V region of Chile. III. Study of malnourished patients. 1985-1987. *Bol Chil Parasitol* 1989; 44: 34-36.
 25. Walters IN, Miller NM, van den Ende J, et al. Outbreak of cryptosporidiosis among children attending a day-care center in Durban. *S Afr Med J* 1988; 74: 496-499.
 26. Cruz JR, Cano F, Cáceres P, et al. Infection and diarrhoea caused by *Cryptosporidium* spp. among Guatemalan infants. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 88-91.
 27. Soave R, Armstrong D. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 1012-1023.
 28. Garone MA, Winston BJ, Lewis JH. Cryptosporidiosis of the stomach. *Am J Gastroenterol* 1986; 81: 465-470.
 29. Moon AS. *Cryptosporidium*-induced gastric obstruction in a child with congenital HIV infection. Case report and review of the literature. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 108-111.
 30. Center for Disease Control. *Cryptosporidium*. Assessment of chemotherapy of males with acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR* 1982; 31: 589.
 31. Hernández L, Mora N, Porras A. Hallazgos de protozoarios en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). *Acta Med Costarr* 1999; 43: 1-8.
 32. Cegielski JP, Ortega YR, McKee S, et al. *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon*, and *Cyclospora* infections in pediatric and adult patients with diarrhea in Tanzania. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 314-321.
 33. Mathan M, Venkatesan S, George R, et al. *Cryptosporidium* and diarrhoea in southern Indian children. *Lancet* 1985; 2: 1172-1175.
 34. Hojlyng N, Molbak K, Jepsen S. *Cryptosporidium* spp., a frequent cause of diarrhea in Liberian children. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 1109-1113.
 35. Blanco RA, Samayoa JC. Diarrhoea and *Cryptosporidium* in Guatemala. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1988; 45: 139-143.
 36. Current WL, García LS. Cryptosporidiosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4: 325-358.
 37. Frisby HR, Addiss DG, Reiser WJ, et al. Clinical and epidemiologic features of a massive waterborne outbreak of cryptosporidiosis in persons with HIV infection (epidemiology). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 16: 367-373.
 38. Agnew DG, Lima AAM, Newman RD, et al. Cryptosporidiosis in Northeastern Brazilian children: association with increased diarrhea morbidity. *J Infect Dis* 1988; 177: 54-60.
 39. Vergara C, Santos S, Freire F, Ares E. La criptosporidiosis en la región andina de Colombia: seroprevalencia y reconocimiento de antígenos. *Pan J Public Health* 2000; 8: 373-379.
 40. Blackman E, Binder S. Cryptosporidiosis in HIV-infected patients: diagnostic sensitivity of stool examination based on number of specimens submitted. *J Gastroenterology* 1997; 92: 451-453.
 41. Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 1976; 70: 592-598.
 42. Newman RD, Jaeger KL, Wunib T, et al. Evaluation of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* oocysts. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2080-2084.
 43. Koontz F, Weinstock JV. The approach to stool examination for parasites. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25: 435-449.
 44. Michell MY, Khalifa AM, Ibrahim IR. Detection of *Cryptosporidium parvum* antigen by co-agglutination test and ELISA. *East Mediterr Health J* 2000; 6: 898-907.
 45. Siddons CA, Chapman PA, Rush BA. Evaluation of an enzyme immunoassay kit for detecting *Cryptosporidium* in feces and environmental samples. *J Clin Pathol* 1992; 45: 479-482.
 46. Keegan AR, Fanok S, Monis PT, Saint CP. Cell culture-TaqMan PCR assay for evaluation of *Cryptosporidium parvum* disinfection. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 2505-2511.
 47. Rochelle PA, Ferguson DM, Handojo TJ, De León R, Stewart MH, Wolfe RL. An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 2029-2037.
 48. Aboytes R, DiGiovanni GD, Abrams FA, et al. Detection of infectious *Cryptosporidium* in filtered drinking water. *J Am Water Works Assoc* 2004; 96: 88-98.
 49. Deng MQ, Cliver DO, Mariam TW. Immunomagnetic capture PCR to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3134-3138.
 50. Abu Al-Soud W, Radstrom P. Capacity of nine thermostable DNA polymerases to mediate DNA amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 3748-3753.
 51. Braid MD, Daniels LM, Kitts CL. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation. *J Microbiol Methods* 2003; 52: 389-393.