



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

CICLOSPOROSIS EN MORELIA

2015

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

PQFB. ANDREA HUANTE CAMPOS

BAJO LA ASESORÍA DE:

QUÍMICA FARMACOBIOLOGA GUADALUPE ERÉNDIRA OROZCO MOSQUEDA

MORELIA, MICHOACÁN, DICIEMBRE DEL 2015

DEDICATORIA:

*A Dios, por ser quien me ha guiado e iluminado
a lo largo de mi formación profesional.*

*A mis padres que sin esperar nada a cambio,
han sido pilares en mi camino.*

*A todas las personas que me han brindado
su apoyo incondicional a lo largo de mi etapa académica.*

Gracias a todos...

AGRADECIMIENTOS:

Mis agradecimientos se dirigen a quien ha forjado mi camino y me ha dirigido por el sendero correcto.

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, por haberme guiado y acompañado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi asesora de tesis la QFB. Guadalupe Eréndira Orozco Mosqueda, por todo el apoyo, dedicación, esfuerzo y compromiso brindado en la elaboración de este proyecto, por darme su confianza y transmitirme ese amor por el área, por ser una persona comprensible y muy respetable de la que he aprendido demasiado y le tengo mucha admiración.

A mis padres que me demostraron la importancia de la vida, educación y estudio, por ser la base que estructura mi vida.

A mí madre, que me ha enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada, por tus esfuerzos impresionantes, por su amor invaluable, por la comprensión y el apoyo incondicional, por la confianza que me ha brindado en cada momento de mi vida sobre todo en mis estudios universitarios corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos. Gracias por siempre creer en mí.

A mí padre, por el valor mostrado para salir adelante, por su sacrificio y esfuerzo, por sus enseñanzas que aplico día a día, por darme la oportunidad de tener una educación en el transcurso de mi vida y dejar que llegara a culminar mis estudios profesionales.

A mí hermano, que me apoyo a pesar de la distancia estuvo ahí dándome palabras de aliento cuando más las necesite.

A Manuel, por haberme tenido la paciencia necesaria, por motivarme a seguir a delante en los momentos de desesperación y no dejarme desvanecer, por siempre creer en mí, por brindarme tu apoyo y comprensión.

A mis amigos, quienes sin esperar nada a cambio me brindaron su apoyo incondicional, por estar a mi lado hombro a hombro, gracias por vivir esta etapa conmigo. A todas esas personas que durante estos cinco años estuvieron a mi lado apoyándome a que este sueño se hiciera realidad.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en la Facultad de Químico Farmacología por brindarme la confianza de poder entrar a las aulas para poder realizar mi formación profesional.

Al Hospital Infantil de Morelia, por permitir que se llevara a cabo el desarrollo de este proyecto y el apoyo brindado a que se cumpliera el objetivo.

A la empresa Merieux NutriSciences México, por el apoyo brindado en el desarrollo del proyecto y por abrirme sus puertas y de dejar que mi conocimiento se ampliara de manera importante

ÍNDICE

DEDICATORIA:	1
AGRADECIMIENTOS:.....	2
ÍNDICE	3
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
I. ANTECEDENTES.....	7
II. INTRODUCCIÓN:.....	7
A) <i>Cyclospora cayetanensis</i> :.....	9
MORFOLOGÍA	9
CICLO DE VIDA	10
PATOGENIA.....	12
MODO DE TRANSMISIÓN	12
CUADRO CLÍNICO.....	13
DIAGNÓSTICO.....	14
TRATAMIENTO	17
PROFILAXIS	17
B) Brotes asociados a <i>Cyclospora cayetanensis</i> en el mundo:.....	18
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. HIPOTESIS.....	21
V. OBJETIVOS.	21
VI. OBJETIVO GENERAL.	21
VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	21
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS.	21
VIII.1. UNIVERSO DE ESTUDIO Y MUESTRA.	21
VIII.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.	22
VIII.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.	22
VIII.4. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	22
VIII.3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	22
VIII.4. RECURSOS HUMANOS.....	22
VIII.5. PRESUPUESTO.....	23
IX. RESULTADOS.....	24
X. DISCUSIÓN.....	30
XI. CONCLUSIÓN.....	31
XII. RECOMENDACIONES.	31
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	32

XIV. ANEXOS.....	37
XIV.1. ANEXO 1.	37
INDICACIONES PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	37
A) PACIENTES FORÁNEOS.....	37
B) PACIENTES LOCALES.	37
XIV.2. ANEXO 2	37
TÉCNICAS COPROPARASITOSCÓPICAS.....	37
A) EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO EN FRESCO.	37
B) MÉTODO DE RITCHIE	38
C) TÉCNICA DE SHEATHER.	40
D) TINCIÓN DE KINYOUN.	42
E) MEDICIÓN MICROSCÓPICA DE PARÁSITOS Y SUS PRODUCTOS.	42
XIV.3. ANEXO 3	44
MÉTODO DE PRUEBA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP), DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALIS Y <i>Escherichia coli</i> Y LA NORMA “CCAYAC - M - 004 / 11”.....	44
XIV.4. ANEXO 4	45
PCR	45
A) PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	45
B) AMPLIFICACIÓN PRIMARIA	46
C) AMPLIFICACIÓN MULTIPLEX ANIDADA	47
XIV.5. ANEXO 5	49
TABLA DE DATOS.....	49

RESUMEN:

Antecedentes: La *Cyclospora cayetanensis* es un parásito emergente, responsable de brotes epidemiológicos que se presentan con marcada estacionalidad, asociados al consumo de frambuesas y lechugas en países desarrollados, donde la diarrea es el síntoma mayormente referido. El agua, el aire, los alimentos, los suelos, la mala higiene y una infraestructura sanitaria mínima se han asociado a la presencia del parásito en países en desarrollo, demostrado por la implementación de pruebas de Biología Molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). **Objetivo:** Describir la frecuencia, distribución por parasitosis única o mixta, grupos etarios, sexo, estacionalidad y sintomatología de los casos de *Cyclospora cayetanensis* en los niños que acuden al Hospital Infantil de Morelia, así como, analizar las fuentes de abastecimiento de agua y vegetales para la búsqueda del parásito asociando su presencia con los coliformes fecales. **Hipótesis:** la frecuencia de *Cyclospora cayetanensis* diagnosticada en el Hospital infantil de Morelia es similar a la reportada en la literatura. **Material Y Métodos:** Este es un estudio de tipo descriptivo, experimental, prospectivo, realizado en niños remitidos del servicio de consulta externa del Hospital Infantil de Morelia en el periodo comprendido entre Enero y Octubre del 2015, con síntomas gastrointestinales, a quienes se les realizó coproparasitoscópico (CPS) en serie de 3, proporcionando a los pacientes las indicaciones para coleccionar las muestras, las cuales fueron procesadas por examen directo en fresco, concentración por sedimentación y flotación, Tinción de Kinyoun y micrometría; aplicando un cuestionario para conocer los síntomas asociados. Por otra parte, se tomaron 19 muestras de agua y 6 de vegetales de los municipios de Tarimbaro, Charo y Copandaro de Galeana, las cuales fueron sometidas a una estimación de la densidad microbiana de coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y *Escherichia coli* (E.C) por la técnica del número más probable (NMP) y a una PCR en Tiempo Real (PCR-RT) para demostrar la presencia de *C.cayetanensis*. **Resultados:** Se analizaron muestras de 785 niños encontrando a *C. cayetanensis* en 12 (1.5%). El parásito fue más frecuente en edad escolar (41.6%) y no hubo diferencia en cuanto al sexo, la mayoría de los casos se presentaron en el mes de Junio (41.6%) y Julio (33.3%). El síntoma mayormente referido fue dolor abdominal (41.6%) seguido de distensión abdominal (36%) y diarrea (18.1%). En Álvaro Obregón se recolectaron 6 muestras de agua (31.5%) demostrando más de 8 MNP/100mL de CT, CF, CE y 2 de vegetales (cebolla, chile serrano, 33.3% de los especímenes recolectados) con menos 3 MNP/g o mL de CF, CE. En Copandaro se analizaron 5 muestras de agua (26.3%), en todas había más de 8 MNP/100 mL de CT, CF, CE; mientras que en Tarimbaro se estudiaron 8 muestras de agua (21%) encontrando más del 8 MNP/100mL de CT, CF, CE y 4 muestras de vegetales (brócoli, coliflor, lechuga orejona, lechuga sangría, 66.6% de los especímenes recolectados) con valores de menos de 3 MNP/g o mL de CF, CE. Sin embargo, a pesar de la presencia de materia fecal en estas muestras, en ninguna muestra de agua o vegetales se encontró a *C. cayetanensis* mediante la prueba de PCR-RT. **Conclusiones:** En nuestro medio *Cyclospora cayetanensis* tiene una frecuencia, distribución y estacionalidad similar a la reportada en la literatura, siendo el dolor abdominal el síntoma mayormente referido. Las fuentes de abastecimiento de agua y vegetales analizadas resultaron negativas para *Cyclospora cayetanensis*, a pesar de haber encontrado en las muestras de agua contaminación fecal.

Palabras clave: *C. cayetanensis*, Cyclosporiasis, PCR, estacionalidad, frecuencia.

Abstract:

Background: *Cyclospora cayetanensis* is responsible for disease outbreaks that occur with marked seasonality, emerging parasite associated with the consumption of raspberries and lettuce in developed countries where diarrhea is a symptom mostly referred. Water, air, food, soil, poor hygiene and minimal health infrastructure have been associated with the presence of the parasite in developing countries, as demonstrated by the implementation of molecular biology tests such as polymerase chain reaction (PCR). **Goals:** To describe the frequency, single or mixed racial parasitosis, age groups, sex, seasonality and symptoms of cases of *Cyclospora cayetanensis* in children attending the Children's Hospital of Morelia, as well as analyze the sources of water and vegetables Search for associating the presence of the parasite in fecal coliform. **Hypothesis:** The frequency of *Cyclospora cayetanensis* diagnosed at Children's Hospital of Morelia is similar to that reported in the literature. **Material and Methods:** This is a descriptive study, experimental, prospective, conducted in children referred from the outpatient services at Children's Hospital of Morelia in the period between January and October 2015, with gastrointestinal symptoms, who underwent coproparasitoscopic (CPS) in series 3, providing patients with instructions to collect the samples, which were processed by fresh direct examination, sedimentation and flotation concentration, and micrometry Kinyoun stain; applying a questionnaire to determine the associated symptoms. Moreover, 19 water samples and 6 plants in the municipalities of Tarimbaro, Charo and Copandaro de Galeana, which underwent an estimate of microbial density of total coliform (TC), fecal coliforms (FC) were taken and *Escherichia coli* (EC) by the technique of most probable number (MPN) and Real-Time PCR to demonstrate the presence of *C.cayetanensis*. **Results:** 785 samples were analyzed children finding *cayetanensis* C. in 12 (1.5%). The parasite was more common in school age (41.6%) and no difference in sex, most cases occurred in the month of June (41.6%) and July (33.3%). The mostly reported symptom was abdominal pain (41.6%) followed by abdominal distension (36%) and diarrhea (18.1%). Alvaro Obregon 6 samples of water (31.5%) were collected over 8 showing MNP / 100 mL of CT, CF, CE and 2 vegetables (onion, serrano chile, 33.3% of the collected specimens) with MNP least 3 / g or mL CF, CE. In Copandaro 5 samples of water (26.3%), in all there were more than 8 MNP / 100 mL of CT, CF, CE were analyzed; while Tarimbaro 8 samples of water (21%) were studied finding more than 8 MNP / 100 mL of CT, CF, CE and 4 samples of vegetables (broccoli, cauliflower, romaine lettuce bleeding, 66.6% of the collected specimens) with values less than 3 NPM / g or mL of CF, CE. However, despite the presence of fecal matter in these samples, in any sample of water or vegetable *cayetanensis* BC was found by RT-PCR test. **Conclusions:** In our *Cyclospora cayetanensis* has a frequency distribution similar to that reported in the literature seasonality, abdominal pain being the symptom mostly referred. The sources of water and vegetable analyzed were negative for *Cyclospora cayetanensis*, despite having found in water samples fecal contamination.

Keywords: *C. cayetanensis*, Cyclosporiasis, PCR, seasonality, frequency.

MARCO TEÓRICO

I. ANTECEDENTES.

La palabra parásito proviene de origen etimológico griego *para* que significa al lado y *sito* alimentarse; podemos que se le puede llamar “individuos que se alimentan junto a otros”. La Real Academia Española la palabra parásito lo define como “un organismo animal o vegetal: que vive a costa de otro de distinta especie, alimentándose de él y debilitándolo sin llegar a matarlo” ⁽¹⁾.

El parasitismo data de millones de años, se ha notificado la presencia de huevos de nematodos en las heces fósiles de reptiles procedentes del Mesozoico. Todas las evidencias hacen suponer que los parásitos fueron, originalmente, organismos de vida libre ⁽²⁾.

Las parasitosis intestinales son un problema mundial de Salud Pública que ha causado enfermedad humana desde tiempos inmemoriales ⁽³⁾.

Si hacemos un recorrido a lo largo de la historia, podremos ver que diversos personajes célebres sufrieron ataques causados por distintas parasitosis, que en muchas circunstancias los llevaron a la muerte. Tal es el caso de Wolfgang Amadeus Mozart, quien según pruebas presentadas por el Dr. Jan Hirschmann en Seattle (EE.UU.), podría haber muerto de triquinosis por consumo de carne de cerdo poco cocida infectada con larvas de *Trichinella spp* ⁽⁴⁾.

Entre otras parasitosis, la malaria afectó a distintas personalidades de la historia, entre ellas Cristóbal Colón, Alejandro Magno, Dante Alighieri y Abraham Lincoln. John F. Kennedy se enfermó de paludismo cuando fue destinado a las islas del Pacífico ⁽⁴⁾.

Gracias a todos los contextos encontrados en la evolución de la parasitosis, se dio el interés de estudiar el área a profundidad buscando solución a la enfermedad implementado técnicas de diagnóstico y prevención, así como, se ha corregido la educación sanitaria con la finalidad de reducir estas enfermedades ^{(4) (5)}.

En la actualidad las técnicas de diagnóstico que se han implementado son los métodos filogenéticos sobre las secuencias de genes y espaciadores de ADN, las cuales nos permiten la obtención de filogenias comparables de parásitos y hospedadores, también nos ayuda a comprender el comportamiento de los parásitos sobre los hospedadores (patología) y las reacciones de estos últimos para poder contrarrestar la acción nociva de los parásitos (respuesta inmune) todo a nivel molecular ⁽⁵⁾.

II. INTRODUCCIÓN:

Las infecciones parasitarias están distribuidas en todo el mundo, afectando a individuos de todas las edades y sexos, se estima que alrededor de 1500 millones de personas están infectadas con parásitos intestinales, siendo un problema de salud pública que afecta sobre todo a los países en desarrollo ⁽²⁾⁽³⁾. Las parasitosis intestinales causadas tanto por protozoarios como por helmintos representan un problema de salud pública, especialmente en países en vías de desarrollo que mantienen endemias altas debido a que carecen de servicios de agua potable y desagüe, casas con piso de tierra, falta de medidas higiénicas

de control y prevención adecuadas, tales como jugar con tierra o no lavarse las manos antes de comer o después de ir al baño, estos factores constituyen un riesgo que favorecen la persistencia de las parasitosis intestinales ^{(6) (7)}.

La escasez de recursos hídricos ha provocado la reutilización de aguas residuales de origen doméstico en todo el mundo y para ello se han creado diversas obras de ingeniería sanitaria a través de las cuales se aplican diversos grados de tratamiento, cuyos efluentes se utilizarán posteriormente con diferentes fines ⁽²⁾⁽³⁾.

Es importante destacar la importancia que tiene de la vigilancia sanitaria de los parásitos en la calidad del agua y alimentos de consumo humano, con la finalidad de reducir el índice de parasitosis, ya que este es uno de los principales factores de la diseminación parasitaria ⁽¹⁾⁽⁴⁾.

De las personas afectadas por estas infecciones 498 millones manifiestan enfermedad. Aunque están presentes en todos los grupos etarios, principalmente la población infantil en edad escolar son los que presentan mayor infección, perjudicada debido a su inmadurez inmunológica, la mal nutrición y al poco desarrollo de hábitos higiénicos, en especial en países con menor desarrollo o con altos índices de ruralidad de la población ^{(8) (9)}.

En el curso de los últimos años, las parasitosis han cambiado su curso clásico con el mejoramiento de las medidas sanitarias: los parásitos macroscópicos se han ido erradicando como causa de enfermedad intestinal y los protozoos han ido aumentando en número. Además, han aparecido otros elementos parasitarios denominados parásitos emergentes los que han producido un cambio conceptual de aplicación práctica en la epidemiología, patogenia y tratamiento de las enfermedades ^{(4) (8)}.

Estas infecciones son generalmente subestimadas por ser asintomáticas, pero representan un factor de morbilidad importante cuando se asocian a la desnutrición donde los principales mecanismos en la transmisión son la ingesta de agua contaminada, el contacto y la recontaminación del agua por una mala higiene doméstica ⁽¹⁰⁾. Las comunidades indígenas que viven en un estado de pobreza extrema y desnutrición, tienen poco acceso a la educación y no cuentan con una infraestructura sanitaria mínima, características que los convierten en lugares apropiados para el parasitismo intestinal ⁽⁶⁾.

La diarrea (sobre todo la persistente) es uno de los principales síntomas ocasionados por parásitos, afectando mayormente a viajeros internacionales que visitan áreas tropicales y subtropicales ⁽³⁾, entre los diferentes agentes causantes destacan bacterias, como *Escherichia coli*, *Campylobacter spp*, *Shigella spp*, *Salmonella spp* y ciertos virus entéricos (norovirus y rotavirus); Protozoos como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium spp* e *Cystoisospora spp*, los cuales no suponen una causa muy frecuente (5–10%), sin embargo su implicación es importante, porque algunos de ellos son causantes de cuadros diarreicos prolongados y crónicos ⁽⁷⁾.

La literatura describe que *Cryptosporidium spp*, *Cystoisospora belli* y *Cyclospora cayetanensis* son los parásitos más frecuentemente asociados con diarrea persistente y con pérdida de peso, en casos avanzados de pacientes con VIH/SIDA ⁽¹¹⁾.

La mortalidad por infecciones parasitarias es relativamente baja, las complicaciones son comunes, siendo responsables de, al menos, el 10% de las diarreas y en muchos casos llevan a la necesidad de cuidados hospitalarios ⁽¹²⁾.

A) *Cyclospora cayetanensis*:

Es un parásito patógeno emergente, perteneciente al subfilo Apicomplexa, está incluido entre las coccidias intestinales. En el año de 1990 en Papua Nueva Guinea fue descrito por primera vez esta especie por el parasitólogo inglés Ashford, él analizó una muestra diarreica humana, encontrando este microorganismo al cual llamó "*Cyanobacterium like body*" que se puede abreviar con letras mayúsculas (CLB) ^{(7) (13)}; Fue hasta el año de 1993 cuando se clasificó como una coccidia del género *Cyclospora* ⁽⁷⁾, esta clasificación fue realizada por la Doctora Ortega y sus colaboradores ⁽¹⁴⁾.

A partir de ese momento se empezaron a describir casos de ciclosporiasis en diversas partes del mundo, principalmente en pacientes originarios o con antecedentes de haber viajado a países en vías de desarrollo como México, Perú, Camboya, Pakistán, Marruecos, India, Guatemala, Nueva Guinea, Nepal, Haití, Indonesia e inclusive en países desarrollados como Estados Unidos de Norteamérica, Australia e Inglaterra ⁽¹⁵⁾.

De las 17 especies incluidas en este género, únicamente *Cyclospora cayetanensis* provoca infección en humanos y no se encuentra en otros huéspedes ⁽⁷⁾. Aunque otras especies de *Cyclospora* han sido encontradas en monos, roedores, reptiles e insectos, los ooquistes de estas especies son ovoides, de mayor tamaño que las identificadas en humanos y no se ha podido demostrar el potencial zoonótico de estos parásitos ⁽¹⁶⁾. La infección por *Cyclospora cayetanensis* se ha descrito en todo el mundo, pero predomina en las zonas tropicales y subtropicales, y en las zonas urbanas y rurales. Sin embargo, las tasas de prevalencia de *Cyclospora* son a menudo subestimados debido a la baja sensibilidad de los métodos de detección y la naturaleza intermitente de excreción de ooquistes ⁽¹⁷⁾.

La presencia de *Cyclospora cayetanensis* en diferentes áreas endémicas están asociadas a factores de riesgo donde están implicados los seres humanos, por ejemplo en Guatemala, Nepal y México donde el principal factor de riesgo es el consumo de agua no tratada; en el caso de Venezuela es la defecación en suelos debido a que los habitantes tienen que enfrentarse a la extrema pobreza en ciertas áreas de este país ⁽¹⁸⁾.

En los países desarrollados, la enfermedad es conocida como diarrea del viajero, ya que el parásito es comúnmente aislado en las personas que visitan América Latina, siendo esta una de las causas más comunes de problemas de salud ⁽¹⁵⁾⁽¹⁹⁾.

MORFOLOGÍA

Es un organismo cuyos ooquistes esporulados son esféricos y pequeños, con un diámetro de 7.7 a 9.9 μm ⁽²⁰⁾.

Tanto en los ooquistes inmaduros, no esporulados como en los ooquistes maduros, esporulados, podemos encontrar que ambas formas presentan una envoltura fibrilar de 63 nm de espesor aproximadamente, por debajo de esta envoltura se localiza una pared de 50 nm de espesor. En el interior de la forma inmadura, se podrán observar unos gránulos, mientras que la forma madura encontraremos que contiene dos esporoquistes de 3.3 a 4.4

$\mu\text{m} \times 5,5-7,1 \mu\text{m}$ con dos esporozoítos que miden aproximadamente 1.06 a $1.34 \mu\text{m} \times 8$ a $10 \mu\text{m}$ ambas formas contienen una área apical estructuralmente compleja, similar al conoide de los coccidios⁽²¹⁾. (Figura 1).

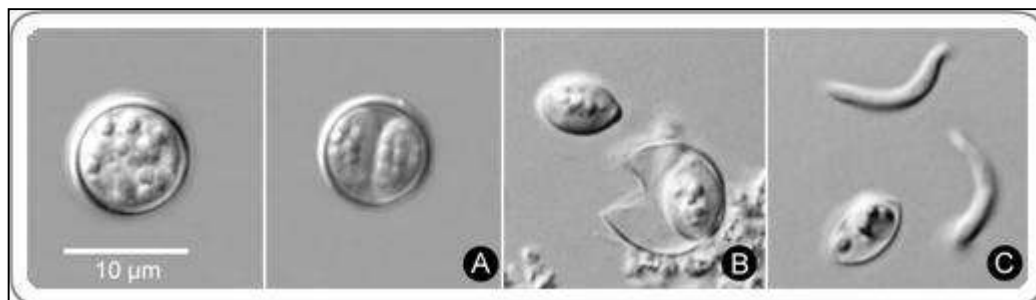


Fig.1 Ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*

- A) Ooquiste con sus dos esporoquistes
- B) Ooquiste lanzando uno de sus esporoquistes
- C) Esporoquistes liberando sus dos esporozoítos

Tomado de: <http://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis>

Con la tinción de ácido-alcohol resistencia, los ooquistes se tiñen en una forma variada. Algunos se pueden teñir de un color rojo intenso y tienen un número variable de cuerpos de inclusión oscuros, mientras que otros no se tiñen y aparecen como esferas transparentes.

En el microscopio de fluorescencia, presentan autofluorescencia azul o verde bajo un disco dicromático de 365 nm o 450-490 nm.

Al microscopio electrónico, el ooquiste esporulado posee una doble pared con 63nm y 50 nm de grosor rodeando dos esporoquistes⁽²⁰⁾.

Gracias a los estudios moleculares podemos sugerir dos grupos de *Cyclospora*:

1. Las especies que infectan insectívoros y roedores, estas producen ooquistes grandes y subesféricos.
2. Las especies que infectan a los primates, incluyendo los humanos, que producen ooquistes pequeños y esféricos, estas especies se describen como: *Cyclospora cercopithecii*, *Cyclospora colobi* y *Cyclospora papionis*⁽²⁰⁾.

CICLO DE VIDA

Actualmente no se tiene bien caracterizado el ciclo de vida de *Cyclospora cayetanensis*, pero se tiene referencia de que no hay transmisión inmediata de persona a persona, esto es debido a que el ooquiste expulsado mediante las heces fecales de los seres humanos requiere una maduración en el medio ambiente. Igual que las otras coccidias *Cyclospora cayetanensis*, tiene un ciclo de reproducción asexual en el mismo huésped y una reproducción sexual fuera de él⁽²⁰⁾.

El ciclo de reproducción asexual se inicia tras la ingestión de los ooquistes maduros, de forma fecal- oral donde surgen eventos como:

1. La exquistación de los ooquistes en el duodeno y dando lugar a la liberación de cuatro esporozoítos por ooquiste.
2. Hay fijación de los esporozoítos en la membrana de los enterocitos del intestino delgado.
3. Ocurre la división esquizogónica de los esporozoítos en el interior de las vacuolas parasitóforas localizadas en el polo luminal también ocurre la formación de merontes de tipo I que contienen de 8 a 12 merozoítos.
4. A continuación la liberación de los merozoítos, y así causar infección de nuevos enterocitos e inicio de nuevos ciclos esquizogónicos.

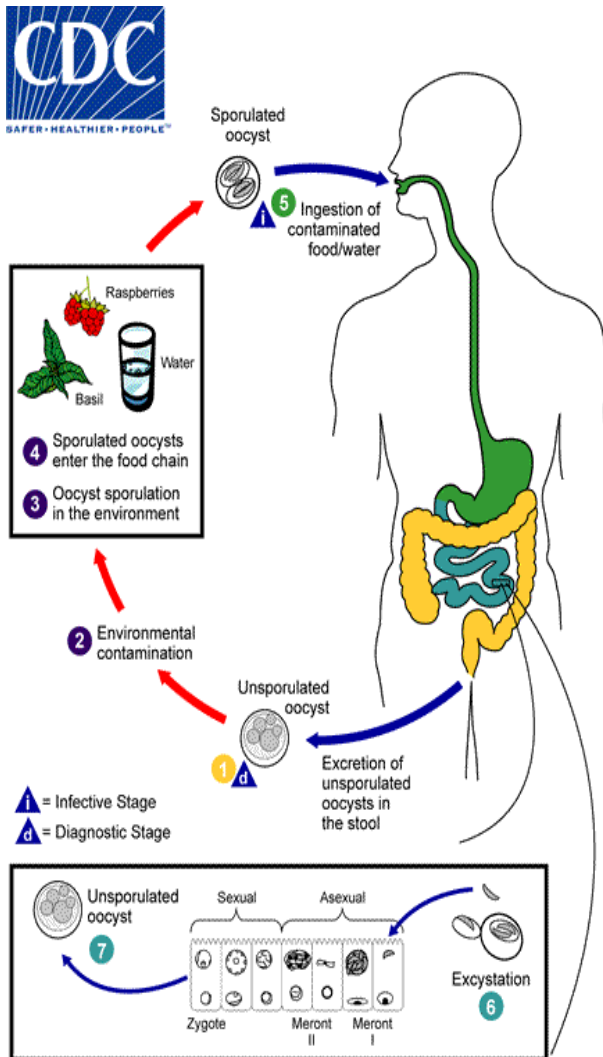


Fig.2 Ciclo de *Cyclospora cayentanensis*

Tomado de:

<http://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/biology.html>

5. En un momento determinado, la esquizogonia genera merontes tipo II, los cuales contienen 4 merozoítos gametes. El ciclo de reproducción sexual se iniciará con la liberación de los merozoítos gametes, y se caracteriza por:

1. La penetración de los merozoítos gametes en los enterocitos, y también por su diferenciación en gametos macho, o también llamados microgametos, y gametos hembra, o conocidos como macrogametos.
2. Ocurre maduración de los gametos en macro y microgametocitos, para su posterior fecundación.
3. A continuación ocurre la transformación de los macrogametocitos fecundados en ooquistes y se lleva a cabo su liberación a la luz intestinal.

Los ooquistes liberados son inmaduros, es decir, que contienen un esporoblasto, y la esporulación o maduración se realiza en el exterior del tubo digestivo ⁽²¹⁾, se produce después de días o semanas a temperaturas entre 22 ° C a 32 ° C, lo que resulta en la división del esperonte en dos esporoquistes, cada uno con dos esporozoítos alargados ⁽²²⁾.

Los productos frescos y el agua pueden servir como vehículos para la transmisión de *Cyclospora cayentanensis* ⁽²²⁾.

PATOGENIA

Después de la exquistación del ooquiste de *Cyclospora cayetanensis*, los esporozoítos invaden los enterocitos del intestino delgado (porción distal del duodeno y el yeyuno), dentro de los cuales se reproducen sexual y asexualmente. La presencia de diferentes estadios del parásito dentro del enterocito producirá anomalías histológicas ⁽²³⁾.

Gracias al estudio histopatológico de biopsias de intestino delgado procedentes de pacientes que han sufrido una ciclosporiasis ha permitido la observación de alteraciones de una gravedad variable como:

1. La presencia de una reacción inflamatoria difusa y crónica, acompañada de un infiltrado de polimorfonucleares (leucocitos neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas).
2. Así como el aplastamiento, atrofia parcial o pérdida de las vellosidades, e hiperplasia de las criptas ⁽²¹⁾, adquiriendo estas una forma columnar o cuboide ⁽²³⁾. De forma que la relación del número de vellosidades por cripta oscila entre 0.6 a 1.5 frente a la parasitación, siendo de 3 a 4 en condiciones normales.

El conjunto de estas evidencias, unidas a la ausencia de la invasión tisular, han sugerido que hay la posibilidad de que este proceso se vea mediado por una enterotoxina ⁽²¹⁾.

La virulencia de este agente infeccioso también dependerá de la sensibilidad del huésped y los factores de riesgo ⁽²⁰⁾.

MODO DE TRANSMISIÓN

Se tiene muy poca información recaudada sobre la distribución de *Cyclospora cayetanensis* ⁽²⁰⁾. Pero la creciente globalización en el comercio de alimentos frescos y los viajes internacionales, y la tendencia moderna a consumir comida rápida fuera del hogar, ha contribuido a la diseminación de *Cyclospora cayetanensis* de las áreas endémicas a las no endémicas ⁽¹⁸⁾.

La transmisión ambiental, es un parámetro de transmisión altamente efectivo para la diseminación de este parásito a una gran proporción de la población ⁽²⁴⁾.

El agua, el aire, los alimentos y los suelos pueden actuar como vehículos de transporte de este parásito y favorecer su modo de transmisión. *Cyclospora cayetanensis* se ha encontrado en frutas y alimentos frescos. El contacto con la tierra ha sido una importante fuente de infección por el hacinamiento, falta de saneamiento ambiental, disposición inadecuada de basuras y poca educación sanitaria de las poblaciones. Es muy importante mencionar otro factor que contribuye a la transmisión de *Cyclospora cayetanensis* donde es la distribución estacional en la mayoría de las naciones, la prevalencia de la infección se incrementa durante la estación lluviosa y caliente ⁽²⁰⁾.

Por otra parte, la acentuada presencia del parásito en las áreas endémicas, sugiere que los ooquistes pueden sobrevivir en el ambiente por largos períodos de tiempo pero no se conoce cómo sobrevive a dichas condiciones ⁽¹⁸⁾.

Se tiene descrito que los ooquistes son muy sensibles a la desecación, así que sus paredes se rompen a partir de los 15 minutos con exposición al medio ambiente pero a su vez son muy resistentes a los desinfectantes, incluyendo el cloro a las concentraciones usadas para

el tratamiento del agua y uso doméstico. Pueden llegar a sobrevivir en el agua a una temperatura de 4 °C por dos meses y a una temperatura de 37 °C por 7 días⁽²⁰⁾.

La dosis infecciosa de ooquistes de *C. cayetanensis* no se conoce, sin embargo, con base en los datos obtenidos de estudios de epidemias de la infección y a extrapolaciones a otros coccidios, se cree que es relativamente baja, que puede probablemente oscilar entre 10 y 100 ooquistes necesarios para causar la infección. El conocimiento que se tiene sobre la capacidad infecciosa ha sido limitado por el hecho de que el parásito no ha podido ser cultivado in-vitro ni se ha podido establecer en animales modelo o en humanos⁽²⁰⁾.

El papel que los animales puedan desempeñar como reservorios naturales del parásito permanece sin determinar^{(20) (25)}.

Otro de los factores que determina una mayor prevalencia de parasitosis intestinales es el incremento de la densidad poblacional en zonas rurales⁽²⁶⁾.

CUADRO CLÍNICO

El cuadro clínico varía desde la infección asintomática (portadores sanos, frecuentemente en la población de zonas endémicas), a infección sintomática en sujetos inmunocompetentes. En éstos, el período de incubación es de 1 a 7 días, y causa un cuadro de diarrea, generalmente autolimitado con dolor abdominal, náuseas, vómitos y ocasionalmente puede presentarse la fiebre, anorexia y fatiga, además, estos síntomas, en conjunto con la infección se autolimitan después de aproximadamente 50 días a pacientes inmunocompetentes observando recaídas en algunos de ellos^{(7) (13)}; sin embargo se puede destacar que la diarrea es el síntoma más frecuente teniendo un porcentaje de un 45.8%, seguido de dolor abdominal con 39.6% y finalmente vómitos en 18.8% de los pacientes que han sufrido ciclosporiasis⁽¹⁹⁾.

En cuanto a la caracterización de la diarrea, podemos definir qué encontramos la diarrea inicial la cual consta de 1 hasta 5 deposiciones y esta dura de tres a cuatro días aproximadamente, pero a los pocos días, y durante varias semanas, pueden aparecer episodios diarreicos intermitentes, de intensidad variable, que pueden determinar una pérdida de masa corporal del 5 al 10%. En cuanto a los periodos no diarreicos se mantienen la astenia y la anorexia. La duración de la diarrea es muy variable, oscilando entre 4 y 107 días, con una media de cuatro a nueve semanas⁽²⁷⁾.

La resolución de los síntomas se produce de forma abrupta y se asocia con la desaparición de los ooquistes fecales⁽²⁵⁾.

En pacientes inmunocomprometidos, la sintomatología puede ser más prolongada y severa produciéndose mala absorción y una significativa pérdida ponderal. Los cuadros diarreicos pueden extenderse por más de 4 meses⁽¹³⁾.

Aunque *Cyclospora cayetanensis* es un patógeno intestinal primario, también ha sido relacionado con la producción de colecistitis alitiásica en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana, y con los síndromes de Reiter y de Guillain-Barré. También se ha descrito una infección broncopulmonar en un paciente excretor fecal de ooquistes⁽²¹⁾.

DIAGNÓSTICO

El estadio diagnóstico es el ooquiste inmaduro, no esporulado que es eliminado con las heces. Se presenta como esferas con pequeños glóbulos refringentes en su interior.

Este debe ser diferenciado de los ooquistes de otros coccidios por ejemplo *Cryptosporidium spp* y *Cystoisospora belli* que fundamentalmente por su forma y tamaño, ya que comparten tonalidades semejantes siendo todos ácido-alcohol-resistentes.

Se pueden buscar los ooquistes, previo enriquecimiento, especialmente por flotación por el método de Sheather con solución saturada de sacarosa, donde se puede observar la pared gruesa (Fig.3).

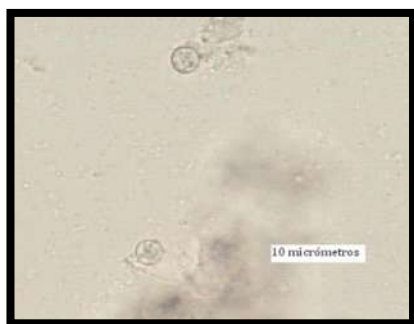


Fig.3. Ooquiste de *Cyclospora cayetanensis* en fresco

Tomado de:

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53525433012>



Fig.4. Ooquiste de *Cyclospora cayetanensis* en fresco

Foto cortesía de Andres Martínez. Hospital de la Luz

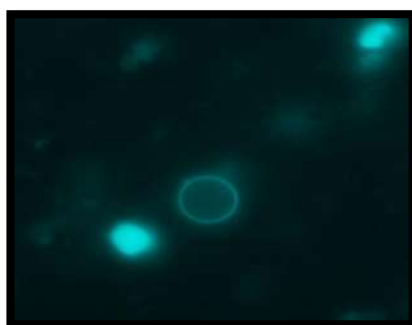


Fig.5. Ooquiste de *Cyclospora cayetanensis*

Foto cortesía de Miki Takayama

Son impermeables al Lugol, pero pueden efectuarse tinciones como la de Ziehl-Neelsen, Kinyoun u otras técnicas de fundamento similar donde en este caso aparecen como esferas ácido alcohol resistentes variables coloreadas desde rojo intenso a pálido e incluso sin colorear, con un aspecto “vidriado” (Fig.6).

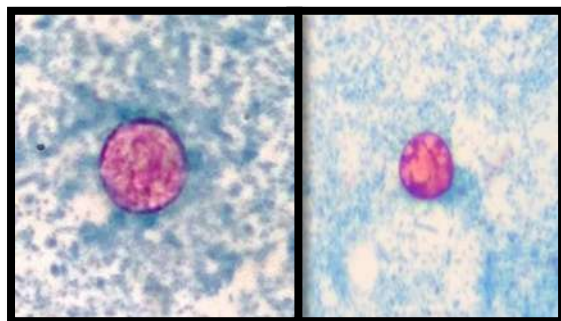


Fig.6. Ooquiste de *Cyclospora cayetanensis* teñido con Kinyoun

Foto cortesía de Andrés Martínez. Hospital de la Luz

Así mismo, puede emplearse safranina en caliente, lo que produce una coloración más intensa y uniforme de los ooquistes ⁽¹³⁾.

Otras coloraciones que pueden ser empleadas habitualmente para la tinción de protozoos como Giemsa, tricrómica, Gram cromotropo, no tiñen a los ooquistes de *Cyclospora Cayetanensis* ⁽¹³⁾.

La falta de capacidad tintorial de los ooquistes se ha observado principalmente en pacientes inmunocomprometidos con enfermedades como leucemias y SIDA; así mismo, disminuye durante el tratamiento de esta parasitosis (trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacina), a partir de las 24 horas se presentan cambios morfológicos en la estructura externa del ooquiste con presencia de adelgazamiento, distorsión de la pared externa y vacuolización de su contenido ⁽¹⁵⁾.

También se puede efectuar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *Cyclospora cayetanensis*, la cual ayuda a dilucidar la taxonomía de la especie de *Cyclospora* asociada a los humanos ya que en la actualidad, no se sabe si todos los aislamientos de *Cyclospora* de humanos pertenecen a la misma especie y si las especies descritas en primates inferiores infectan a los humanos ⁽²⁰⁾. Este método puede aplicarse tanto a muestras de materia fecal, como de aguas y alimentos contaminados con el parásito con una sensibilidad del orden de 100 ooquistes por cada 25 g de alimento ⁽¹³⁾.

La técnica de PCR es una técnica para la síntesis "in vitro" de secuencias específicas de ADN. Es una forma simple y muy rápida de multiplicar el ADN presente en diferentes muestras biológicas, obteniendo millones de copias de una determinada secuencia de ADN. Esta técnica fue desarrollada por Kary Mullis, la cual es muy funcional para los campos que estudian y manipulan los ácidos nucleicos; Mullis se basó en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la ADN polimerasa.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo conformado de 30 a 40 ciclos que incluyen tres etapas principales:

1° Activación inicial del ADN doble cadena.

2° Amplificación o Hibridación de los cebadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras.

3° Extensión del cebador por actuación de la ADN polimerasa.

Desglosando cada una de las etapas mencionadas anteriormente, comenzaremos a definir la primera la cual es conocida como **activación inicial**, esta etapa se caracteriza por la incubación y preparación de la muestra, es decir, es un pequeño y único ciclo de 15 minutos a una temperatura de 95°C en donde se activan todos los componentes de la mezcla (compuesta por la muestra y la mezcla de oligonucleótidos), al término de esta etapa el proceso pasa a la segunda etapa llamada **amplificación**, la cual está conformada por tres ciclos denominados:

1. Desnaturalización: este ciclo dura un tiempo de 15 minutos a una temperatura de 95°C.
2. Renaturalización: este ciclo dura un tiempo de 30 segundos a una temperatura de 53°C.
3. Extensión: este ciclo dura un tiempo de 90 segundos a una temperatura de 72°C.

El conjunto de estos ciclos, se repetirán consecutivamente hasta completar la cantidad de 35 ciclos, produciendo que la doble hélice del ADN se separa en dos hebras, proceso denominado **desnaturalización**. Posteriormente surge la **renaturalización**, la cual es producida cuando la temperatura de incubación disminuye. La **extensión** es cuando los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar.

En la tercera etapa conocida como **extensión**, se producirá la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'>3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde y finalmente poder obtener nuestra amplificación genética ^{(22) (28)}. (Fig.7)

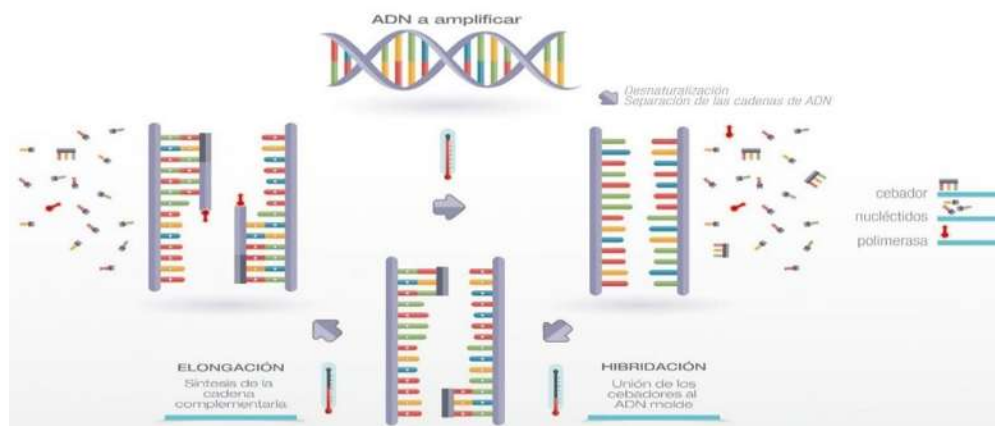


Fig.7. Pasos Básicos de la PCR

Tomado de:

[HTTPS://WWW.GOOGLE.COM.MX/SEARCH?Q=PASO+PARA+UNA+PCR&ESPV=2&](https://www.google.com.mx/search?q=paso+para+una+pcr&espv=2&)

En la Florida, se demostró la necesidad de entrenamientos para hacer el diagnóstico de *Cyclospora cayetanensis* así como para coccidias y microorganismos emergentes en las redes de laboratorios ⁽²⁹⁾.

En México, en la mayoría de los laboratorios dedicados al diagnóstico parasitológico, no se realiza la búsqueda intencionada de *C. cayetanensis* ni de otros parásitos emergentes tal como *Cryptosporidium parvum* de manera rutinaria, debido a la falta de preparación del personal de laboratorio para realizar el diagnóstico y al desconocimiento del médico de estos protozoos como causantes de diarrea ⁽¹⁵⁾.

TRATAMIENTO

El tratamiento de elección para *Cyclospora cayetanensis* es el Trimetoprim (160 mg) y sulfametoxazol (800 mg) (TMP-SMX), 2 veces al día por 7 a 10 días, donde se han logrado resultados efectivos en la mayoría de los casos para resolver la diarrea y lograr la erradicación de ooquistes los cuales disminuyen entre los 2 y 6 días de tratamiento, consiguiendo así la negativización de las muestras de heces. Además deben implementarse, en caso necesario, medidas de soporte para mantener el equilibrio hidroelectrolítico y reposo ^{(11) (13)}.

La ciprofloxacina es el tratamiento de segunda elección aunque es menos efectiva, resulta útil para aquellos pacientes que no toleran el TMP-SMX. Su administración consiste en dosis de 500 mg 2 veces al día durante 7 días como terapia y 3 veces a la semana por 10 semanas como profilaxis secundaria. Otros autores han propuesto el uso de la nitazoxanida como tratamiento de segunda elección ⁽²³⁾.

Para pacientes inmunodeprimidos podremos utilizar de igual manera Trimetoprim/Sulfametoxazol (160/800mg) 4 veces al día durante 10 días obteniendo resultados efectivos, seguido de la profilaxis secundaria con este medicamento 3 veces a la semana esto para prevenir las recurrencias ⁽²³⁾.

PROFILAXIS

Las medidas de prevención son muy similares a las aplicadas para otros parásitos intestinales y están enfocadas a las principales fuentes de infección: agua, alimentos y suelo contaminados ⁽¹³⁾. En casos de brotes epidémicos es recomendable hervir el agua de consumo esto con la finalidad de permitir la eliminación de los ooquistes del agua, en cambio se sabe que este microorganismo es resistente a la cloración. Se tiene reporte de los alimentos que se consumen crudos, por ejemplo frutas y verduras, en donde no es posible la eliminación completa de los ooquistes con el simple lavado ⁽²³⁾.

Los programas de educación y saneamiento ambiental en conjunto con la eliminación adecuada de excretas humanas, tratamiento de residuos cloacales y control de aguas de riego, bebidas y de lavado de hortalizas y frutas de consumo crudo, son de suma importancia para la prevenir infecciones asociadas con este parásito; cabe señalar que en individuos inmunocomprometidos, la prevención debe ser muy cuidadosa por la persistencia y severidad de los cuadros diarreicos que a su vez contribuyen a magnificar la diseminación parasitaria ⁽¹³⁾.

La detección y control de portadores es importante para ésta y para otras parasitosis de similar epidemiología ⁽¹³⁾.

Se recomienda a personas que viajan a países donde esta coccidia ha sido reportada que se tomen estos aspectos en consideración, especialmente a finales de la primavera e inicios del verano ⁽²³⁾.

B) Brotes asociados a *Cyclospora cayetanensis* en el mundo:

Entre 1996 y 1998 se presentó una serie de epidemias de diarrea causadas por *Cyclospora cayetanensis* en los Estados Unidos y Canadá. En ambos países se atribuyó como causa el consumo de frambuesas originarias de Guatemala ⁽¹¹⁾.

En 1986 se describió el caso de cuatro viajeros que regresaban de México y Haití con cuadros diarreicos ⁽¹¹⁾; mientras que para la década de los 90's la infección por *Cyclospora cayetanensis* tuvo un auge significativo ⁽¹⁸⁾, el más notable fue un brote de transmisión hídrica en Milwaukee (Wisconsin) en 1993, en donde se vieron afectados más de 400.000 personas ⁽²⁹⁾.

Se han descrito casos en Europa con antecedentes de viajes a México, donde los turistas llegan a contraer la parasitosis ⁽³⁰⁾.

En Medellín Colombia en el año del 2002 se presentó un número incierto de casos de diarrea, en su mayoría empleados de la Universidad de Antioquia. Se evaluaron a 56 pacientes, donde el 73.2% eran mujeres, 26.8% hombres que oscilaban entre las edades de 25 a 75 años, sin embargo, el mayor número de pacientes estuvo en el rango de edad entre 31 y 45 años. Del total de pacientes evaluados el 55,4% fueron positivos para *Cyclospora cayetanensis*, mientras que en el 44,6% no se observó este parásito, de las muestras positivas para *Cyclospora cayetanensis* el 77,4% pertenecían al sexo femenino con el 22,6% y el restante fue para los hombres ⁽¹⁶⁾⁽³¹⁾.

Se reportó en Mayo del año del 2006 un grupo de siete personas viajaron a Varadero, Cuba por cuestiones laborales, los síntomas que desarrollaron los pacientes fueron diarrea, pérdida de peso, anorexia y náuseas y en un paciente se presentó fiebre. Se demostró la presencia de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* en todos los pacientes ⁽¹⁴⁾.

Los resultados de las investigaciones indican que hubo más de un brote de ciclosporiasis durante Junio y Agosto de 2013 en los Estados Unidos, en restaurantes de una cadena en Iowa y Nebraska y estaban vinculados a la mezcla de ensalada procedente de Guanajuato, México ⁽³²⁾.

En el mismo año, se reportaron brotes del parásito asociado al consumo de cilantro procedente de México, siendo el estado de Texas el más afectado ^(22,33).

III. JUSTIFICACIÓN

Varios estudios de frecuencia de *Cyclospora cayetanensis* en diarreas del viajero se han realizado en diferentes países, reportando cifras de 1.1% en turistas alemanes a 4% en holandeses que regresaron del trópico ⁽³⁰⁾, mientras que en Java, Indonesia se analizaron a 558 extranjeros a los cuales se les dio seguimiento por tres años, y se observó que el 11,8% de las diarreas fueron causadas por *Cyclospora cayetanensis* ⁽³⁰⁾.

En Perú, se ha reportado que la prevalencia en niños ha alcanzado entre el 6 y 18% de *Cyclospora cayetanensis*, mientras que en los niños venezolanos de una zona rural se reportó que fue del 5.3%, en Cuba se aproximó a un valor del 4.4%, en Nepal se reporta el 4.8% y el 2.5% en Tanzania; en Sao Paulo, Brasil se han registrado resultados entre 0.3% y 0.7% de prevalencia, mientras que en Massachusetts (EE.UU.) se reporta el 0.28% y finalmente en Ontario, Canadá la prevalencia en niños obtiene un porcentaje menor, oscilando en un 0.05%, mientras que las prevalencias en pacientes con infección por VIH/ SIDA y diarrea crónica, varían de 1.1% a 22% ⁽¹³⁾.

De Agosto de 2007 a Enero de 2008 en México se realizó un estudio donde se evaluaron a 30 pacientes con diagnóstico de SIDA, el promedio de edad fue de 40 años. Los principales parásitos coccidios identificados correspondieron a *Cryptosporidium spp* (43.3%), y *Cyclospora cayetanensis* (56.7%) ⁽³⁴⁾.

Otro estudio realizado en Cuba en donde se examinaron a pacientes inmunodeprimidos por SIDA, arrojó que el 3% de los pacientes analizados estaban infectados por *Cyclospora cayetanensis* ⁽²³⁾.

También en Cuba, en el Hospital Pediátrico Universitario “William Soler” se analizaron 7956 muestras, donde se encontró que 20 muestras eran positivas a *Cyclospora cayetanensis* (0.2%). Con respecto a la distribución según la edad, se observaron 7 muestras positivas en los niños de 0 a 2 años (35 %), 45 % en los niños de 2 a 7 años, y finalmente 20% en el grupo de 8 a 15 años ⁽³⁵⁾.

Se estudió, el genoma de *C. cayetanensis*, concluyendo que los genomas mitocondriales *C. cayetanensis* son muy similares a los de *Eimeria spp*. En tamaño del genoma y el contenido de genes, con una sintonía completa en la organización del genoma ⁽³⁶⁾. Un estudio ha dado a conocer que el genoma mitocondrial completo de *Cyclospora cayetanensis* es 6184 pb de longitud con tres genes codificadores de proteínas (Cox1, cox3, CytB) y numerosos fragmentos lsrDNA y ssrDNA ⁽³⁷⁾.

Se ha probado y validado un nuevo diseño de la amplificación por PCR seguida de secuenciación de nucleótidos de los fragmentos amplificados por PCR HSP70 pertenecientes a *C. cayetanensis* aislados de 3 regiones endémicas diferentes que incluyen Nepal, México y Perú. El polimorfismo genético se observó entre las regiones caracterizadas del locus HSP70. Este estudio proporciona otro marcador genético útil para la detección rápida de *C. cayetanensis* en el futuro ⁽³⁸⁾.

Se realizaron muestreos de agua obtenida del grifo de los baños de un tren ferroviario nacional italiano, para comprobar la presencia de *Cyclospora cayetanensis* usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) junto con alta resolución de fusión (GRH) el análisis para la detección y cuantificación de ooquistes de protozoos. El estudio dio como resultado pruebas positivas a *C. cayetanensis*, con el número de ooquistes de 4, 5, y 11 por litro, respectivamente ⁽⁹⁾.

En México, en el estado de Veracruz, Méndez y colaboradores analizaron estadísticamente casos diarreicos presentados en el periodo del 2000-2003, encontrándose que la variabilidad de las frecuencias de la diarreas pueden ser asociadas con un 40% por la temperatura, deduciendo que en al inicio del verano (Mayo a Agosto) las diarreas se presentan con una alta incidencia ⁽³⁹⁾.

Por otra parte, en el caso de Honduras, Guatemala, Nepal e Indonesia se ha reportado que la prevalencia de la infección con *Cyclospora cayetanensis* se ve incrementada durante la temporada de lluvias y cuando la temperatura aumenta; de igual forma en Venezuela en el estado Falcón, se observó que hubo una mayor frecuencia de la infección durante la época de lluvias ⁽²⁰⁾.

En un estudio realizado en Brasil se demostró que en el 0.7% de los casos de diarrea se encuentra presente *Cyclospora cayetanensis* ⁽⁴⁰⁾. Es de importancia mencionar que en este mismo país, se identificó el parásito en dos perros, pero no se identificó en 140 perros de la misma región, se desconoce el significado de la presencia de este parásito en estos animales, si son diseminadores o verdaderos huéspedes naturales del coccidio ⁽²⁰⁾.

La creciente globalización de los productos alimenticios frescos y de los viajes internacionales, así como la tendencia a comer fuera del hogar, son factores que han contribuido a la diseminación del parásito de regiones endémicas a las no endémicas ⁽²⁰⁾.

En Egipto *Cyclospora cayetanensis* se logró aislar de lechugas y bivalvos obtenidos de mercados de Alejandría, así mismo, en Canadá y en los Estados Unidos, está reportado que casi todas las epidemias son causadas por consumo de alimentos, relacionados principalmente con frambuesas guatemaltecas y éstas han ocurrido durante las estaciones de primavera y los comienzos del verano, que es una temporada lluviosa y caliente ⁽²⁰⁾.

En los Estados Unidos, el 90 % de los casos de ciclosporiasis se han asociado con el consumo de alimentos como ⁽²⁰⁾, frambuesas frescas y congeladas a -3.3°C que son importadas de Guatemala ⁽⁴¹⁾.

En el mundo industrializado, se han reportado epidemias infecciosas causadas por *Cyclospora cayetanensis* presente en el agua, teniendo como dato que el 1.8% es positivo para este coccidio, que es equivalente a aproximadamente 6 casos de los 325 que fueron estudiados ⁽²⁰⁾.

Se investigó la presencia *Cyclospora cayetanensis* en áreas rurales de Guatemala, analizando varias fuentes de agua usadas para el consumo público, demostrando que tres de cinco muestras contenían al parásito, confirmando mediante PCR ⁽¹⁸⁾; así mismo, en Vietnam, se encontró *Cyclospora cayetanensis* en el 63.6% de muestras de agua de consumo público provenientes de ríos y lagos ⁽²⁰⁾.

Los brotes reportados en la actualidad sobre la transmisión de esta coccidia por alimentos resaltan la necesidad de fortalecer y verificar correctamente las medidas de control y de prevención para asegurar que los productos alimentarios que se consumen crudos por el ser humano estén libres de *Cyclospora cayetanensis*, además como la necesidad de continuar investigando sobre la biología y la epidemiología de esta coccidia ⁽⁴¹⁾.

Se pretende aportar datos que ayuden a comprender el mecanismo de transmisión y supervivencia del protozooario en el medio ambiente al correlacionar los casos humanos de Ciclosporiasis con los aislamientos ambientales provenientes de fuentes de agua.

Con los resultados obtenidos en este proyecto se pretende aportar conocimientos sobre la distribución del parásito en humanos, en el agua y en los vegetales en nuestro medio, y así poder prevenir la diseminación del mismo, sensibilizando al personal del área de la salud y a la población en general acerca de las medidas higiénicas preventivas para evitar la

infección con el parásito incluyendo la propuesta de la utilización de filtros en el sistema de agua potable. Esta investigación resulta factible ya que los recursos necesarios para su realización están gestionados en su totalidad.

IV. HIPOTESIS

La frecuencia de *Cyclospora cayetanensis* diagnosticada en el Hospital infantil de Morelia es similar a la reportada en la literatura.

V. OBJETIVOS.

VI. OBJETIVO GENERAL.

Describir la frecuencia, distribución por parasitosis única o mixta, grupos etarios, sexo, estacionalidad y sintomatología de los casos de *Cyclospora cayetanensis* en los niños que acuden al Hospital Infantil de Morelia, así como, analizar las fuentes de abastecimiento de agua y vegetales para la búsqueda del parásito asociando su presencia con los coliformes fecales.

VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Estimar la frecuencia y distribución por parasitosis única o mixta, grupos etarios, sexo de casos de *Cyclospora cayetanensis* en los niños que acuden al Hospital Infantil de Morelia.
2. Enlistar los síntomas asociados a la parasitosis.
3. Correlacionar la presencia de este parásito con la precipitación pluvial y la temperatura.
4. Analizar las fuentes de abastecimiento de agua y vegetales para la búsqueda del parásito asociando su presencia con los coliformes fecales.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS.

VIII.1. UNIVERSO DE ESTUDIO Y MUESTRA.

Este es un estudio de tipo descriptivo, experimental, prospectivo, abierto, realizado en niños de 1 a 15 años que acudieron al Hospital Infantil de Morelia con síntomas gastrointestinales, entre Enero y Octubre de 2015, remitidos del servicio de consulta externa, a quienes se les realizó un examen coproparasitológico (CPS) en serie de 3.

Para una adecuada recolección de muestras, a los pacientes se les proporcionó por escrito las indicaciones necesarias (Anexo 1). Las muestras fueron procesadas por las técnicas de examen directo en fresco, de concentración por sedimentación (Formol-Éter) y por flotación (Sacarosa), Tinción de Kinyoun y micrometría (Anexo 2).

Se tomaron 19 muestras de agua y 10 de vegetales de los municipios de Tarimbaro (8 muestras de agua y 4 muestras de vegetales: brócoli, coliflor, lechuga sangría, lechuga orejona), Álvaro Obregón (6 muestras de agua y 2 muestras de vegetales: cebolla y chile serrano) y Copandaro de Galeana (5 muestras de agua), las cuales fueron sometidas a una

estimación de la densidad microbiana de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica del número más probable (NMP) presentes en muestras de alimentos y agua de acuerdo a la CCAYAC - M - 004 / 11 (Anexo 3). De igual forma las muestras fueron sometidas a la extracción de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-RT) (Anexo 4).

En el presente proyecto nos enfrentamos con una limitante, ya que nuestra intención era analizar también las muestras de agua de las colonias de donde provenían los casos de *Cyclospora cayetanensis*, sin embargo éstas no fueron recolectadas debido al plan de muestreo realizado por el área responsable.

VIII.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Niños de 1 a 15 años de ambos sexos.
- Remitidos del servicio de consulta externa con síntomas gastrointestinales.
- Niños con la presencia del parásito del periodo entre Enero y Octubre.

VIII.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Niños con muestras incompletas o que hayan recibido un antiparasitario dos semanas antes del análisis de las mismas.

VIII.4. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

Niños con datos incompletos y aquellos que se negaron a participar de manera verbal.

VIII.3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó un formato de Excel para determinar las variables de estudio y poder establecer la frecuencia y distribución (Anexo 5).

VIII.4. RECURSOS HUMANOS.

El Personal del Hospital Infantil tuvo a su cargo el registro del protocolo de investigación en el hospital para ser considerado por la Comisión de Investigación, la colecta y procesamiento de muestras humanas de *Cyclospora cayetanensis*; sensibilización a los pacientes y la coordinación con el Laboratorio Estatal de Salud Pública, la Jurisdicción Sanitaria y Merieux NutriSciences.

- Químico Farmacobiólogo adscrito al Hospital: colecta y apoyo en el procesamiento de muestras, lectura e interpretación de resultados. Coordinación con las demás instituciones.
- Tesista: Registro del protocolo de investigación, colecta y apoyo en el procesamiento de muestras de materia fecal, de agua y vegetales, lectura e interpretación de resultados y recolección de datos.
- Pasantes de Servicio Social: Apoyo en el procesamiento de muestras.

Personal del Laboratorio Estatal de Salud Pública:

- Procesamiento de muestras de agua y vegetales para búsqueda de coliformes fecales.
- Contacto con Jurisdicción Sanitaria.
- Colaboración en la redacción del protocolo final.

Personal de la Jurisdicción Sanitaria:

- Toma de muestras de agua y vegetales de los municipios de Tarimbaro, Charo y Copandaro.
- Sensibilización a la población.
- Trámites requeridos para el caso.

Personal de Merieux NutriSciences México:

- Procesamiento de muestras de agua y vegetales para búsqueda de *Cyclospora cayetanensis* por PCR-RT.
- Colaboración en la redacción del protocolo final.

VIII.5. PRESUPUESTO.

La empresa de Merieux NutriSciences México corrió con los gastos de las pruebas de PCR, mientras que el procesamiento de muestras de heces, aguas y vegetales son parte de la rutina de trabajo en el Hospital Infantil de Morelia, en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán y la Jurisdicción Sanitaria No. 1.

IX. RESULTADOS.

En nuestro estudio se analizaron muestras de 785 niños encontrando a *C. cayetanensis* en 12 de ellos, lo cual corresponde al 1.5% (Fig.8).

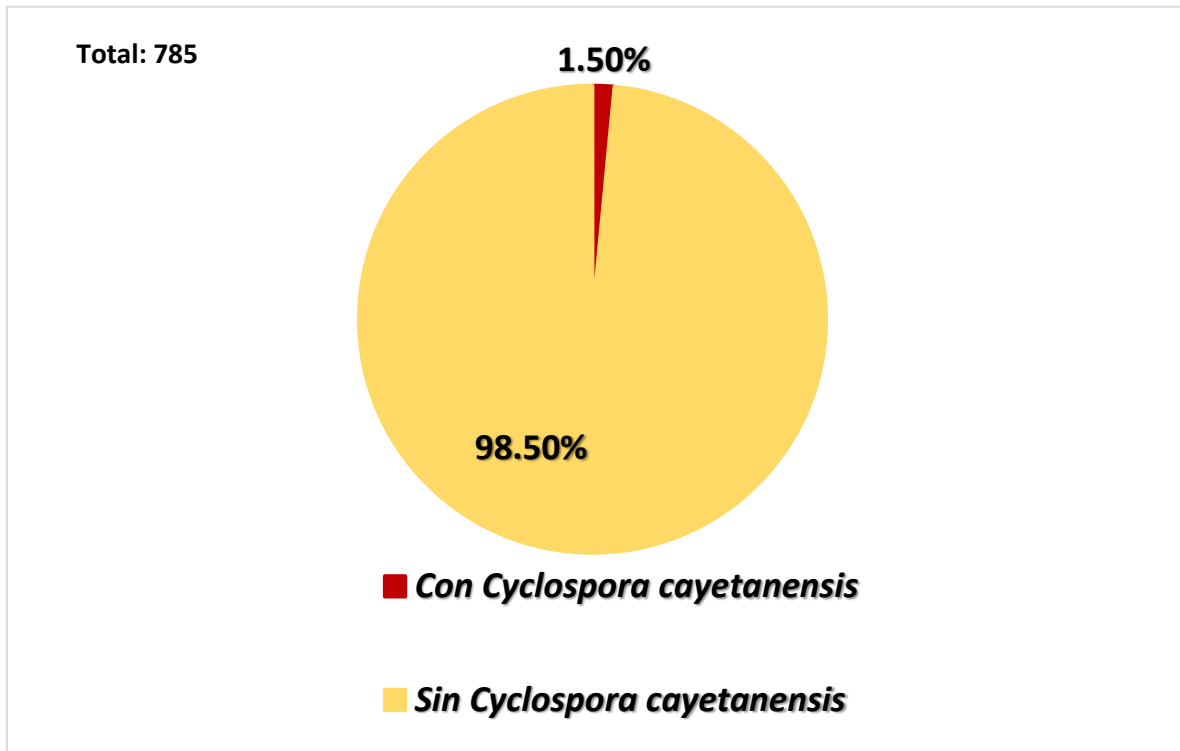


Fig.8. Frecuencia de *Cyclospora cayetanensis*

El microorganismo se encontró asociado con parásitos comensales en 8.3%, con patógenos en un 25% y en el 66.7% lo encontramos como una parasitosis única (Fig.9).

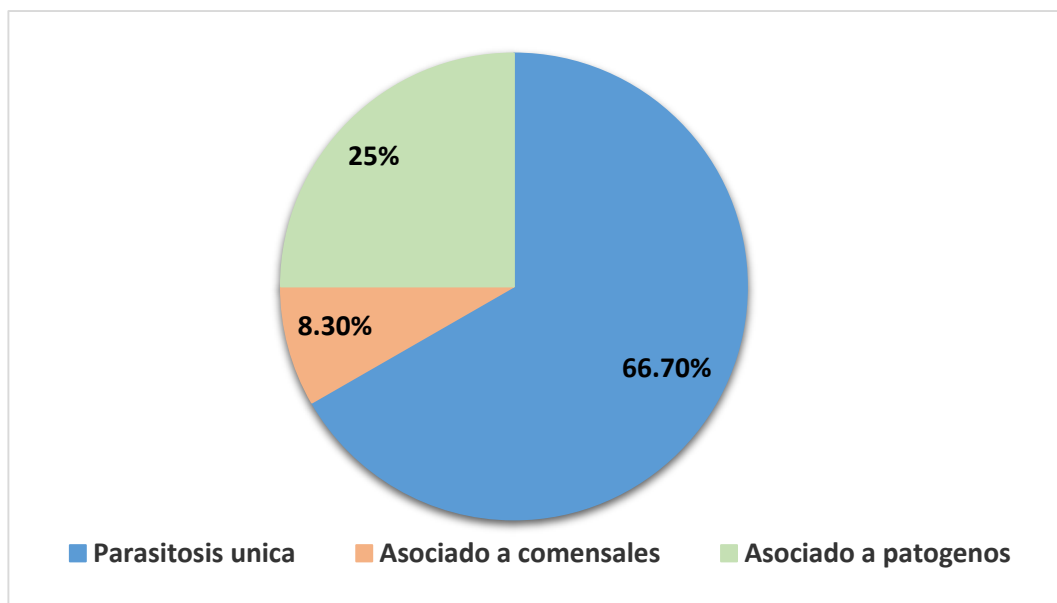


Fig.9. Asociación de *Cyclospora cayetanensis* con otros parásitos

El parásito mayormente asociado con *Cyclospora cayetanensis* fue *Blastocystis sp* en un 75% seguido de *Entamoeba hartmanni* con un 25% (Fig.10).

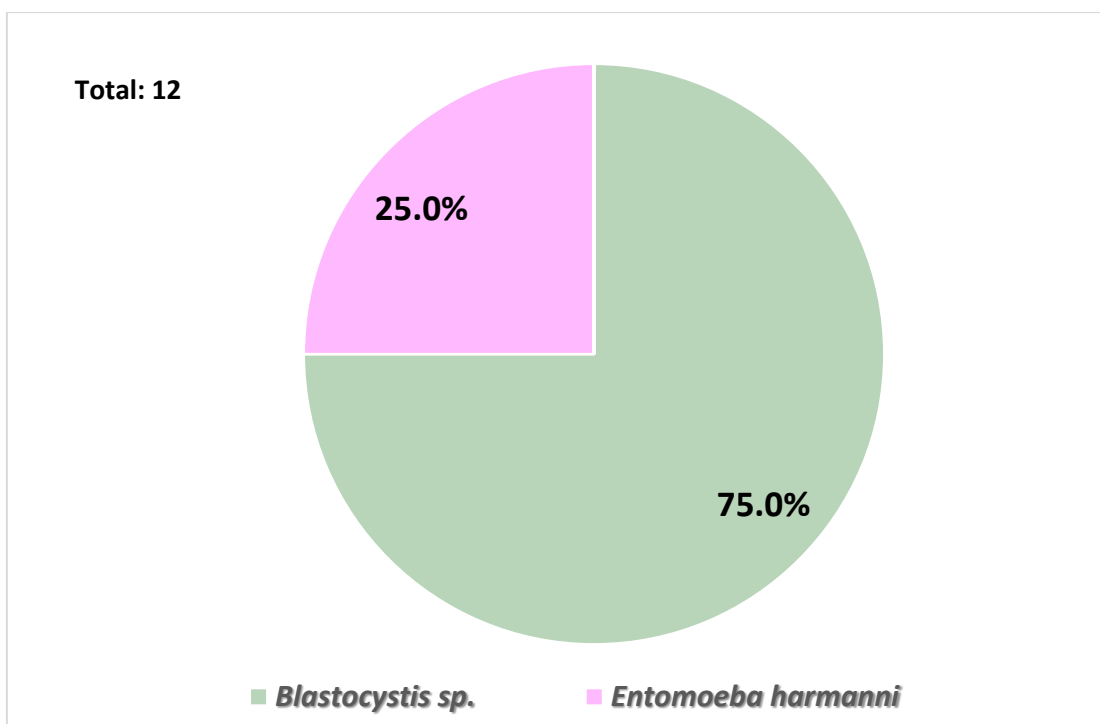


Fig.10. Asociación de *Cyclospora cayetanensis* con otros parásitos

Con respecto a la distribución por grupos etarios, el mayormente afectado fue el de los escolares (41.6%) seguido de los preescolares (33.3%) y los lactantes (25%) (Fig.11).

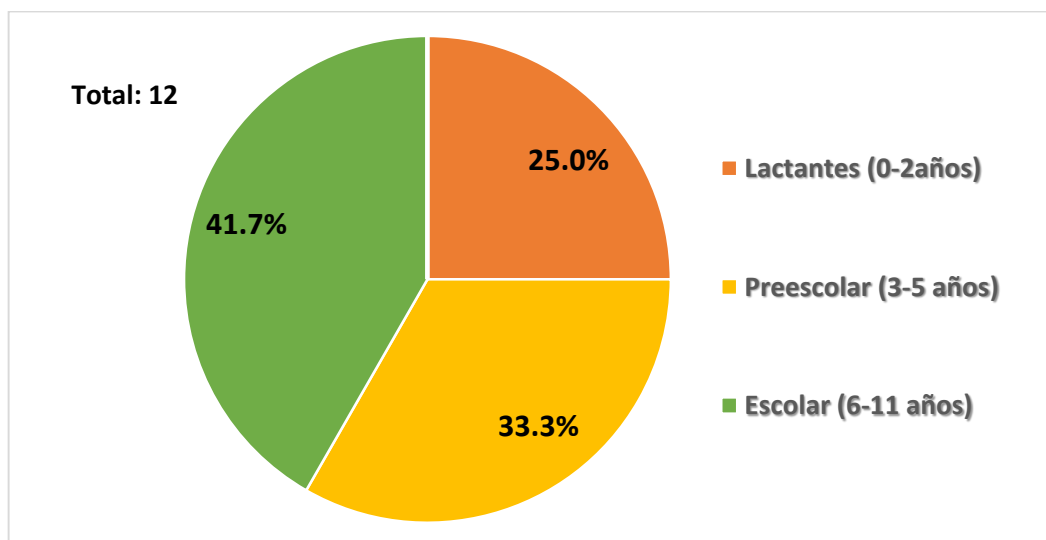


Fig.11. Frecuencia de *Cyclospora cayetanensis* por grupos etarios

En cuanto a la distribución por sexo, no hubo diferencia presentándose de igual manera en el sexo femenino y masculino (Fig.12).

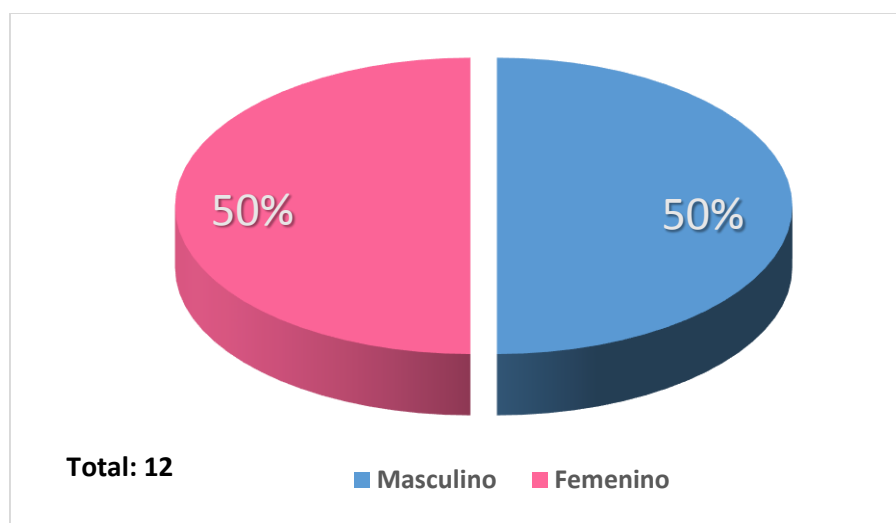


Fig.12. Frecuencia de *Cyclospora cayetanensis* por sexo

Aunque encontramos casos del protozoario en varios meses del año, la mayoría se presentaron en los meses de Junio (41.6%) y Julio (33.3%) (Fig.13).

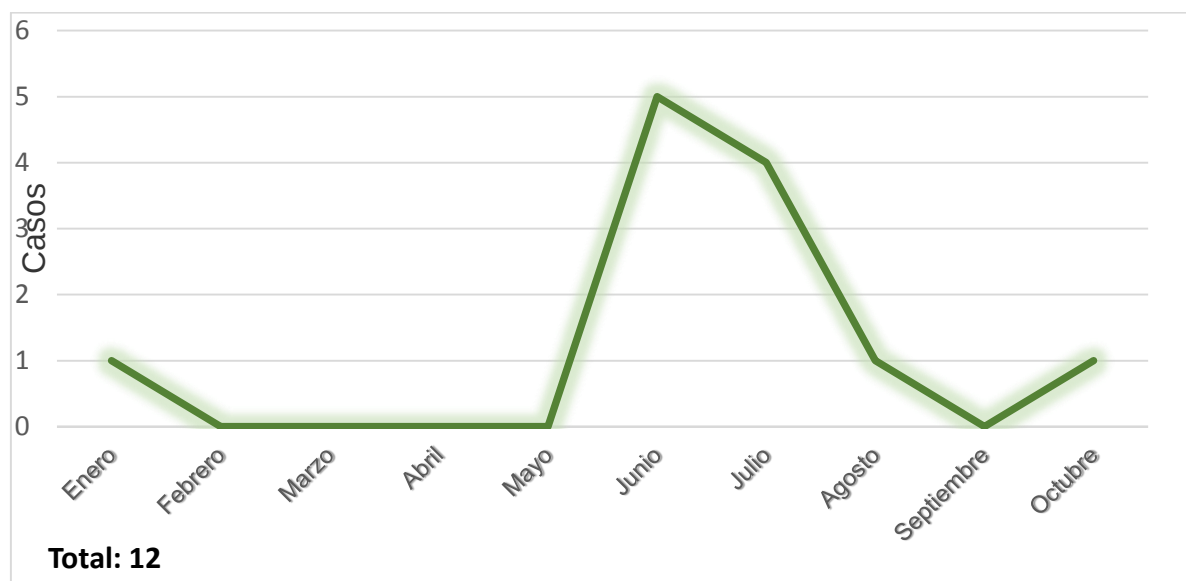


Fig.13. Estacionalidad de *Cyclospora cayetanensis*

El síntoma mayormente referido por los pacientes fue dolor abdominal (41.6%) seguido de distensión abdominal (36%) y diarrea (18.1%) (Fig.14).

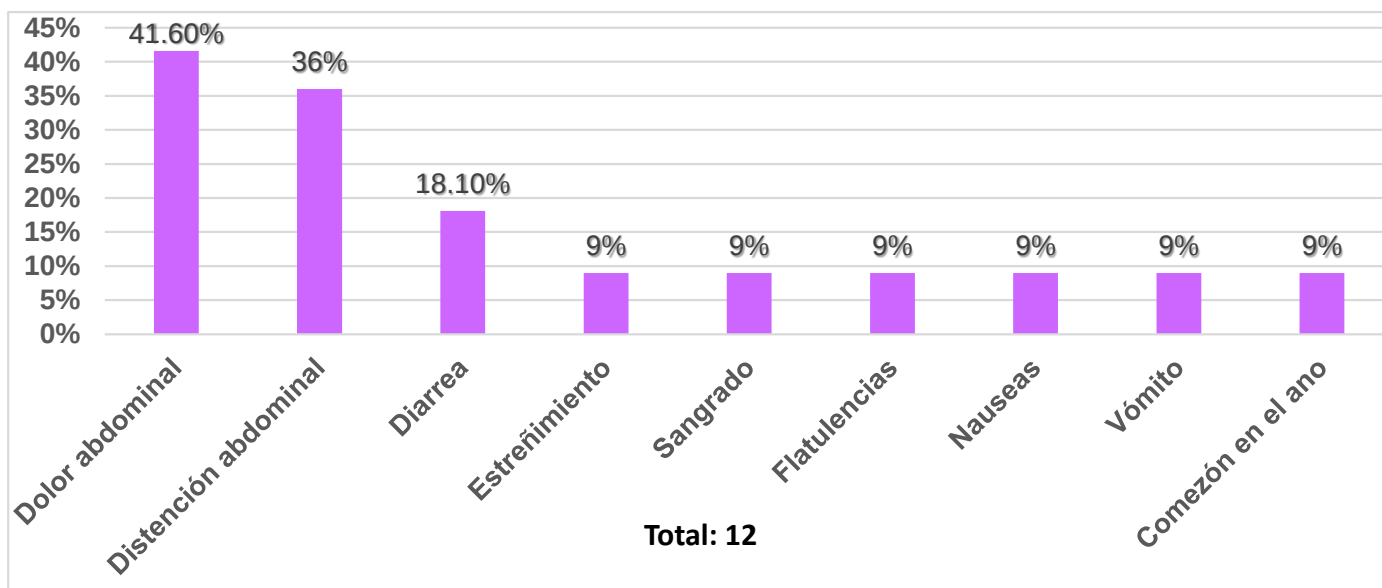


Fig.13. Sintomatología en pacientes con Ciclosporosis

En el presente estudio se encontró una asociación de la presencia del parásito con el aumento de la temperatura y precipitación, como lo refiere la literatura (Fig.15).

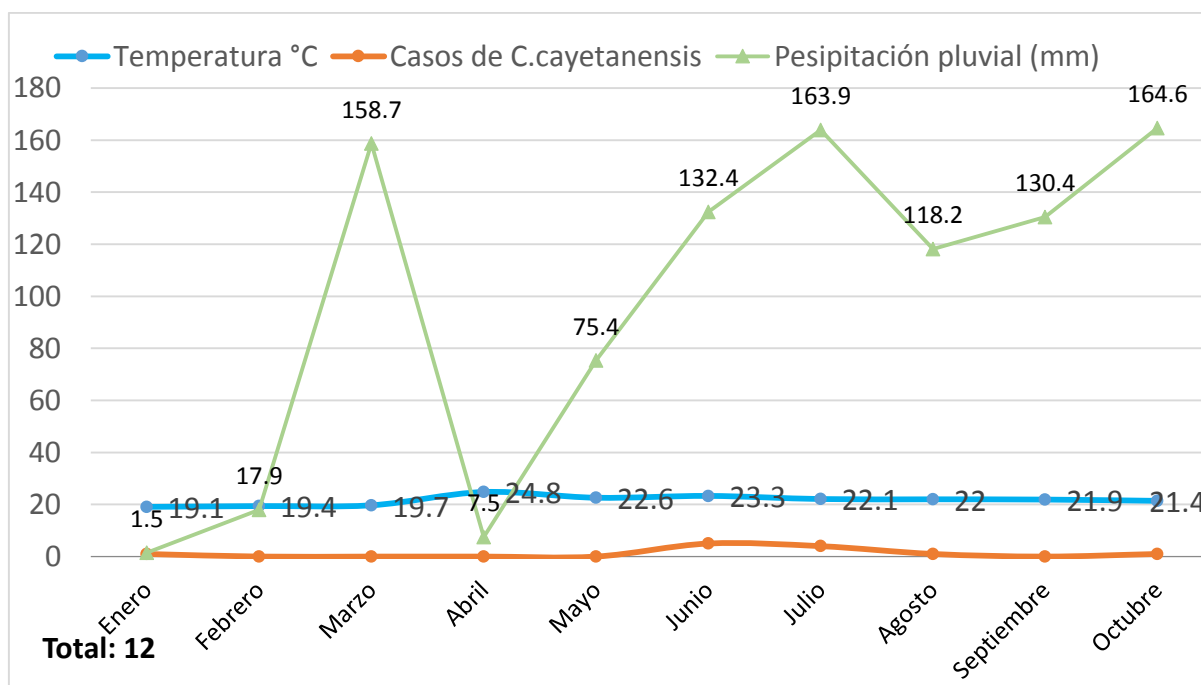


Fig.15. Relación de *Cyclospora cayetanensis* con Temperatura y Precipitación.

En Álvaro Obregón se recolectaron 6 muestras de agua (31.5%) demostrando más de 8 MNP/100mL de CT, CF, CE y 2 de vegetales (cebolla, chile serrano, 33.3% de los especímenes recolectados) con menos 3 MNP/g o mL de CF, CE (Tabla.1).

Álvaro Obregón				
Muestras	Coliformes Fecales	Coliformes Totales	Escherichia coli	<i>Cyclospora Cayetanensis</i> (PCR)
Agua de canal (#1)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua de canal (#2))	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua de canal (#3))	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua de canal (#4)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua de canal de riego (#1)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo

Tabla.1. Muestras de Álvaro Obregón

En Copandaro se analizaron 5 muestras de agua (26.3%), en todas había más de 8 MNP/100 mL de CT, CF, CE (Tabla.2).

Copandaro de Galeana				
Muestras	Coliformes Fecales	Coliformes Totales	Escherichia coli	<i>Cyclospora Cayetanensis</i> (PCR)
Agua de arroyo (#1)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua de arroyo (#2)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua de estanque (#1)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua de pozo (#1)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua de pozo (#2)	≥8 MNP/g o mL	4.6 MNP/g o mL	4.6 MNP/g o mL	Negativo

Tabla.2 . Muestras de Copandaro de Galeana

Mientras que en Tarimbaro se estudiaron 8 muestras de agua (21%) encontrando más del 8 MNP/100mL de CT, CF, CE y 4 muestras de vegetales (brócoli, coliflor, lechuga orejona, lechuga sangría, 66.6% de los especímenes recolectados) con valores de menos de 3 MNP/g o mL de CF, CE (Tabla.3).

Tarimbaro				
Muestras	Coliformes Fecales	Coliformes Totales	Escherichia coli	<i>Cyclospora Cayetanensis</i> (PCR)
Agua residual (#1)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua residual (#2)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua residual (#3)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua residual (#4)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua residual (#5)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua residual (#6)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua residual (#8)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Agua residual (#9)	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	≥8 MNP/g o mL	Negativo
Brócoli	≤ 3 MNP/g o mL	X	≤ 3 MNP/g o mL	Negativo
Coliflor	≤ 3 MNP/g o mL	X	≤ 3 MNP/g o mL	Negativo
Lechuga orejona	≤ 3 MNP/g o mL	X	≤ 3 MNP/g o mL	Negativo
Lechuga sangría	≤ 3 MNP/g o mL	X	≤ 3 MNP/g o mL	Negativo

Tabla.3. Muestras de Tarimbaro

Sin embargo, a pesar de la presencia de materia fecal en estas muestras, en ninguna muestra de agua o vegetales se encontró a *C. cayetanensis* mediante la prueba de PCR-RT.

X. DISCUSIÓN.

Este estudio identificó a *Cyclospora cayetanensis* en 1.5% de los 785 niños que buscaron asistencia médica en el Hospital Infantil de Morelia debido a síntomas gastrointestinales, en un estudio publicado el año pasado de pacientes provenientes de este mismo hospital, que incluyó 10 años se encontró un 0.67% de frecuencia, por lo que demostramos un aumento de la misma.

En Perú, reportaron menos del 1% de frecuencia del parásito en 381 muestras de pacientes pediátricos que presentaron síntomas como diarrea moderada y deshidratación severa ⁽¹⁹⁾. En Cuba Cifras superiores se encontraron entre niños ingresados en un hospital pediátrico, donde el 3,7% de los ingresados en los servicios de atención a pacientes con diarrea estaban infectados por este protozoo ⁽⁴¹⁾. Mientras que en niños venezolanos de zonas rurales corresponde al 5.3%, en Nepal 4.8% y de 2.5% en Tanzania ⁽¹³⁾, teniendo en cuenta que estas cifras son significativas en pacientes pediátricos. Estudios realizados en pacientes con síntomas gastrointestinales presentaron una frecuencia de *C. cayetanensis* de 0,3 a 0,7% en Sao Paulo, Brasil ⁽¹⁹⁾. En Cuba se encontró en un estudio en inmunodeprimidos por SIDA que el 3% estaba infectado con este agente etiológico ⁽⁴¹⁾.

En los casos de *Cyclospora cayetanensis* identificados, el 8.3% se asoció a parásitos comensales, el 25% a patógenos y el 66.7% corresponde a una parasitosis única.

En Caracas-Venezuela se analizaron 1 831 pacientes, utilizando la prueba de Ziehl-Neelsen modificada demostrando 12 casos positivos que corresponde al 8 %, en el 0.66% se asoció a *Cyclospora cayetanensis*, la cual estaba coinfectado con *Blastocystis hominis* en un solo caso ⁽¹⁾.

Blastocystis sp fue el parásito mayormente asociado a *Cyclospora* (25%), en el estudio realizado anteriormente en este mismo hospital se encontró a este microorganismo asociado con *Blastocystis sp* en un 73.3 %, seguido con un 40% por *Entamoeba coli* y *Endolimax nana* con un 26.7 %. En cuanto a los helmintos se encontró a *Hymenolepis nana* en un 13.3 % siendo este el más frecuente. Otro estudio realizado en una comunidad indígena en Venezuela, se demostró que la asociación entre *Cyclospora cayetanensis* y *Entamoeba histolytica* eran las más comunes, pero a la par se observaron coinfecciones con *Blastocystis sp* en el 10,5 % ⁽¹⁹⁾.

En el presente estudio, la edad más afectada fue en los niños de edad escolar (6-11 años) con un 41.6% de los casos; en Guatemala la infección tuvo mayor frecuencia entre de niños de 1.5-9 años y en Nepal son los niños de 4-15 años ⁽¹⁹⁾. En Perú, las infección por *Cyclospora cayetanensis* fue más común entre los niños de 1-9 años de edad ⁽⁴²⁾.

En el presente trabajo no encontramos una diferencia en cuanto a la distribución por sexo, similar a lo reportado en Guatemala y Perú donde la tasa global de infección en los niños no fue significativamente diferente según el sexo ⁽¹⁹⁾. En Texas, de 270 casos se reportó un 58% del sexo femenino y 42% correspondían al sexo masculino. Sin embargo, estos pacientes se asociaron con un brote de ciclosporiasis causado por cilantro procedente de Puebla y presumiblemente todos eran adultos ⁽³³⁾.

En nuestro estudio, se registraron 41.6% de los casos en el mes de Junio y el 33.3% en el mes de Julio, lo cual coincide con la temporada de lluvias en Morelia, similar a los reportes en otros países, donde se asocia la presencia del parásito con la temperatura y la precipitación pluvial. En Turquía, fue más frecuente en el verano y otoño ⁽⁴¹⁾. En países en vías de desarrollo se ha registrado la estacionalidad de *Cyclospora cayetanensis*, especialmente en períodos lluviosos y cálidos ⁽¹³⁾. En Guatemala, la infección se observa

con mayor frecuencia durante la temporada de lluvias tempranas, mientras que en Perú se produce durante el verano. En Haití, la prevalencia es más alta entre enero y abril, que son los más fríos y más secos meses del año. En Katmandú, Nepal, la temporada alta de la infección ocurre durante el verano y el comienzo de la temporada de lluvias durante los meses de junio y julio ⁽¹⁹⁾.

El síntoma que se encontró mayormente referido fue dolor abdominal en un 41.6% seguido de distensión abdominal con 36% y diarrea con 18.1%.

En Cuba los síntomas asociados a esta parasitosis son la diarrea, pérdida de peso, anorexia y náuseas ⁽¹⁴⁾. La manifestación clínica más frecuente asociada a ciclosporiasis referida en otros países incluye diarrea, pérdida de peso, distensión abdominal, náuseas, vómitos, dolor abdominal, flatulencias y fiebre 10-20% ⁽¹¹⁾. Como podemos apreciar los síntomas son menos frecuentes que en otros países, lo que indica el carácter endémico de la parasitosis en nuestro medio.

Nuestras fuentes de abastecimiento de agua y vegetales (cebollas, chiles, brócoli, lechuga, coliflor) analizadas resultaron negativas para la presencia de *Cyclospora cayetanensis* por medio de una PCR, a pesar de haber encontrado en las muestras de agua contaminación fecal. En los Estados Unidos de América y Canadá los brotes se ven asociados a tres tipos de productos frescos: frambuesas frescas, lechuga y albahaca. Las frambuesas frescas importadas de Guatemala se han asociado con brotes, así como las congeladas a -3,3°C ⁽⁴¹⁾. En países en vías de desarrollo, los brotes están mayoritariamente vinculados a la transmisión hídrica y alimentaria ⁽¹³⁾.

Existen pruebas moleculares como la PCR anidada que puede ayudar a mejorar el control de calidad de los alimentos de consumo humano mediante el aumento de la sensibilidad y especificidad para la detección de *Cyclospora cayetanensis* ⁽¹⁹⁾, en países en vías de desarrollo, como en Nepal, la infección ha sido asociada con el consumo de vegetales ⁽¹⁸⁾.

XI. CONCLUSIÓN.

En nuestro medio *Cyclospora cayetanensis* tiene una frecuencia, distribución y estacionalidad similar a la reportada en la literatura, siendo el dolor abdominal el síntoma mayormente referido.

Las fuentes de abastecimiento de agua y vegetales analizadas resultaron negativas para *Cyclospora cayetanensis*, a pesar de haber encontrado en las muestras de agua contaminación fecal

XII. RECOMENDACIONES.

- 1.- Realizar una nueva investigación en donde puedan analizarse las fuentes de agua y alimentos de los pacientes con ciclosporiasis en nuestro medio.
- 2.- Debido a que cada vez son mayores los reportes de infecciones por este microorganismo, es importante implementar la búsqueda intencionada de esta coccidia en el diagnóstico de laboratorio, esto con la finalidad de dar un tratamiento adecuado.
- 3.- Los brotes de transmisión por alimentos resaltan la necesidad de fortalecer las medidas de control y de prevención para asegurar que los productos alimentarios que se comen

crudos estén libres de *Cyclospora cayetanensis* por medio de la utilización de técnicas moleculares.

4.- Continuar investigando sobre la biología y la epidemiología de esta coccidia.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Caraballo Blanco L. Historia de la Parasitología. [Online]. [cited 2015 Septiembre 25. Available from: hyperlink "<https://es.scribd.com/doc/20820711/historia-de-la-parasitologia>" <https://es.scribd.com/doc/20820711/historia-de-la-parasitologia#> .
2. Rodríguez DJG, Olivares JL, Arece J. Evolución de los parásitos: consideraciones generales. Rev. Salud Anim.. 2009; 31(1): p. 13-17.
3. Díaz Murillo MdP, Ramírez Sánchez NA, Osorio García SD. El sentido de las enfermedades por parásitos intestinales en poblaciones americanas, identificando dilemas bioéticos. rev.latinoam.bioet. 2013 Junio; 1(1):p.17-34.
4. Menghi CI. Los parásitos en el túnel del tiempo. Revista Argentina de Microbiología. 2010; 42: p. 245-246.
5. Mas C S. Importancia de la evolución en la Parasitología y el interés de utilizar una aproximación evolutiva en estudios parasitológicos. Revista de la Sociedad Española de Biología Evolutiva.2010:p.80-82.
6. Pascual , Iannaccone , Abdías H. Parásitos intestinales en pobladores de dos localidades de Yurimaguas, Alto Amazonas, Loreto, Perú. Neotropical Helminthology. 2010 Diciembre; 4(2):p.127-136.
7. Portillo M, García P A. Diarrea del viajero por *Cyclospora cayetanensis*. Cartas al Editor / Med Clin (Barc). 2009: p. 377-378.
8. Vidal F , Toloza M L, Cancin. Evolución de la prevalencia de enteroparasitosis en la ciudad. Rev Chil Infect. 2010 Abril 28; 27 (4): p. 336-340.
9. Marangi M1, Arace E2, Giangaspero A . *Cyclospora cayetanensis* travels in tap water on Italian trains.PubMed - Medline. 2015; 13(1): p. 6-210.
10. Eleuterio J, Aponte , Arrunátegui-Correa. Prevalencia de parásitos intestinales en niños de diferentes niveles de educación del distrito de San Marcos, Ancash, Perú. Rev Med Hered. 2012; 23(4): p. 235-239.
11. Quesada L. Principales aspectos de los coccidios asociados a diarrea en pacientes VIH positivos. Acta Médica Costarricense. 2012 Julio - Septiembre; 54(3): p. 139-145.
12. Batista Rojas , Martínez Sánchez. Parasitismo intestinal y factores asociados en la población infantil de la comunidad Santa Bárbara ,Venezuela. Revista Panamericana de Infectología. 2011; 13(2): p. 38-45.

13. Archelli , Kozubsky. Cyclospora cayetanensis: Un coccidio emergente. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2012 Diciembre 04; 46(4): p. 683-688.
14. Germán R O, Herrera M D, Subirats M, Rivas G P, Sabino Puente S. Brote de Cyclospora cayetanensis en viajeros a Cuba. Originales breves. 2007 Diciembre 10:p.558-560
15. Vázquez T O, Jiménez D R, Campos R T, Valencia R S, Romero C R, Gamez A, et al. Infección por Cyclospora cayetanensis. Diagnóstico de Laboratorio. Revista Latinoamericana de Microbiología. 2000;(42): p. 45-52.
16. Botero G J, Montoya P MN, Barguil JI, Castaño G A. Brote epidémico por Cyclospora cayetanensis en Medellín, Colombia. Revista de salud publica. 2006 Noviembre; 8(3):p.258-268
17. Iqbal J, Parsotam R. H, Al-Ali. Cyclospora cayetanensis: First report of imported and autochthonous infections in Kuwait. J Infect Dev Ctries. 2011; 5(5):p.90-383.
18. Chacín B L, Barrios F, Cheng NG R. Cyclospora cayetanensis: Fuentes y mecanismos de transmisión. Interciencia. 2010 Septiembre; 35(9):p.666-672.
19. Orozco M G E, Martínez L O, Ortega Y. Cyclospora cayetanensis in a pediatric hospital in Morelia, México The American Journal de Medicina Tropical e Higiene. 2014 septiembre; 91(3): p. 537-40.
20. Chacín B L, Barrios F. Cyclospora cayetanensis: biología, distribución ambiental y transferencia. Biomedica. 2011;; p. 43- 132.
21. Álvaro Guerrero, AG, Magraner J, Guna , Domínguez , Borrás R. Control Calidad SEIMIC. [Online]. [cited 2015 Junio 14. Available from: HYPERLINK "<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/Cyclospora.pdf>"
<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/Cyclospora.pdf> .
22. Cernters for Disease Control and Prevention. [Online].; 2015 [cited 2015 Abril 28. Available from: HYPERLINK "<http://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/biology.html>"
<http://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/biology.html> .
23. Escobedo A, Almirall , Cimerman. Cyclospora cayetanensis: un protozoo intestinal emergente. Revista Panamericana Infectología. 2008; 10(1): p. 24-29.
24. Q. Betancourt W, J. Querales. L. Parásitos Protozoarios Entéricos en Ambientes Acuáticos: Métodos de Concentración y Detección. Interciencia. 2008 Junio; 33(6):418-423.
25. Beraun-Villa , Valdez L. Diarrea del viajero. Rev Med Hered. 2013;(24): p. 54-61.

26. Devera R, Blanco Y, Amaya , Nastasi MJ, Rojas G, Vargas B. Parásitos Intestinales en Habitantes de la comunidad rural "La Canoa, Estado Anzoátegui, Venezuela. Revista Venezolana de Salud Pública. 2014 Jan 08; 2(1): p. 15-21.
27. García A, Guerrero Á, Magraner , Guna , Domínguez. Cyclospora y Cyclosporiasis. Control de Calidad SEIMIC. Available from: https://www.seimc.org/controlcalidadseimc/index.php?mn_MP=64&mn_MS=15&mn_MN=0&expandable=0 .
28. Mas E, Poza J, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R, Rodellar C. Fundamentos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). AquaTIC. 2001 Noviembre.:p.70-78.
29. Angel Núñez F, M. Finlay C. Adiestramiento en el diagnóstico de las parasitosis intestinales en la red de laboratorios de Cuba. Cadernos de Saúde Pública. 2001 Junio; 17 (3):p.719-724.
30. Muñoz-Salazar , Baptista-Rosas R, Sánchez-Brambila C, Salas-Vargas D, Radilla-Chávez P, Arreola-Cruz A. Extracción molecular de protozoarios patógenos en muestras de agua. Medigraphyc. 2009; 34:p.63.
31. Weitz V C, Weitz R , Canales R , Moya R. R. Infección por Cyclospora cayetanensis.Revisión a propósito de tres casos de diarrea del viajero. Revista Chilena Infectología. 2009 Diciembre; 26(6): p. 549-554.
32. Centros para el control y la Prevención de Enfermedades. [Online].; 2013 [cited 2015 junio 2. Available from: HYPERLINK "<http://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/outbreaks/es/investigation-2013.html>" <http://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/outbreaks/es/investigation-2013.html> .
33. Abanyie , Harvey R, Harris , Wiegand R, Galia , Desvignes-Kendrick , et al. 2013 multistate outbreaks of Cyclospora cayetanensis infections associated with fresh produce: focus on the Texas investigations. Epidemiol. Infect. 2015 Febrero;; p. 1-8.
34. Hurtado C M, Lagunes H V, Ortigoza G S, Cortes G A, Torres F , Rodríguez R. Cyclospora cayetanensis Y Cryptosporidium spp, Principales parásitos en pacientes con SIDA. Bioquímica. 2009 Enero - Marzo; 34(1): p. 106.
35. Martínez S DI, Ayllón V D L, Benítez P T X. Cyclospora cayetanensis.Presentación de 20 casos. Revista Cubana Pediatría. 2002; 72(2): p. 178-81.
36. Marangi M, Koehler AV, Zanzani SA, Manfredi MT, Giangaspero , Gasser RB. Detection of *Cyclospora* in captive chimpanzees and macaques by a quantitative PCR-based mutation scanning approach.2015 p:1-5.
37. ME O, Y , AJ DS, MJ , JR.A lineal mitochondrial genome of Cyclosporacayetanensis (Eimeriidae,Eucoccidiorida,Coccidiasina,Apicomplexa) suggests the ancestral start position within mitochondrial genomes. Int J Parasitol. 2015 Mayo; 45(6): p. 5-361.

38. Sulaimán IM, Torres , Simp , Kerdahi , Ortega YY. Secuencia Caracterización de Heat Shock Protein génica de *Cyclospora cayetanensis* Aísle de Nepal, México y Perú. *Journal of Parasitology*. 2013 Abril ; 99(2): p. 379-382.
39. Méndez P I, Tejeda M A, Salvador R I. Boletín del instituto de Geografía. [Online].; 2010 [cited 2015 Marzo 15. Available from: HYPERLINK "<http://www.journals.unam.mx/index.php/rig/article/view/23866/41904>" <http://www.journals.unam.mx/index.php/rig/article/view/23866/41904> .
40. Rodriguez A R, Amato N V, Bezerra C, Gakiya. Observações sobre *Blastocystis hominis* e *Cyclospora cayetanensis* em exames parasitológicos *cayetanensis* em exames parasitológicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2007 Marzo - Abril; 40(2): p. 253-255.
41. Almirall P, Escobedo , Cimerman. *Cyclospora cayetanensis*: un protozoo intestinal emergente. *Revista Panamericana de Infectología*. 2008 Agosto 08; 10(1): p. 24-29.
42. Orozco M G E. Manual de Procedimientos de Parasitología. 2015:p.1-60.
43. Ortigoza G D S, Cruz A D M. Manual de procedimientos para el laboratorio E. E. Parasitología General. [Online].; 2011 [cited 2015 Junio. Available from: HYPERLINK "http://www.uv.mx/personal/sortigoza/files/2011/05/manual_para_gral_2012.pdf" http://www.uv.mx/personal/sortigoza/files/2011/05/manual_para_gral_2012.pdf.
44. Fernandez DN. Coprología. Coproparasitario. [Online]. [cited 2015 Junio 14. Available from: HYPERLINK "<http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/Cp.pdf>" <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/Cp.pdf>
45. Navone GT, Gamboa MI, Kozunbsky LE, Costas ME, Cardozo MS, Sisliauskas MN, et al. Estudio comparativo de recuperación de formas parasitarias por tres diferentes métodos de enriquecimiento coproparasitológico. *Parasitología latinoamericana*. 2005 Diciembre; 60(3-4): p. 178 - 181.
46. Beltrán Fabián de Estrada, Tello Casanova, Náquira Velarde. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. [Online]. [cited 2015 Junio 12. Available from: HYPERLINK "http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud_publica/nor_tec/37.pdf" http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud_publica/nor_tec/37.pdf.
47. [Online]. Available from: HYPERLINK "<http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/CCAYAC-M-004.PDF>" [http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/CCAYAC-M-004.PD](http://www.cofepris.gob.mx/TyS/Documents/TercerosAutorizados/CCAYAC-M-004.PDF) .
48. Mas E, Poza , Ciriza , Zaragoza , Osta R, Clementina R. Fundamentos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *AguaTIC*. 2001 Noviembre 15.

49. [Online]. Available from: HYPERLINK
"http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm073638.htm"
"
<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm073638.htm>.
50. Pértegas Díaz , Pita Fernández S. Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. [Online].; 2010 [cited 2015 Junio 10. Available from: HYPERLINK
"https://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp"
"I" "Tabla 1"
[https://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp#Tabla 1](https://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp#Tabla_1).

XIV. ANEXOS.

XIV.1. ANEXO 1.

INDICACIONES PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

A) PACIENTES FORÁNEOS

Se requiere una muestra fresca y dos muestras con conservador (formol).

Muestra fresca:

1. Colocar un pedazo de excremento del tamaño de una nuez en un frasco limpio con tapadera.
2. La muestra no debe extraerse de la taza del baño.
3. Remitir al laboratorio antes de 24 horas de haber sido colectada. La muestra puede ser obtenida a cualquier hora del día. No es necesario el ayuno.

Muestra con conservador (formol):

1. Colocar un pedazo de excremento del tamaño de una nuez en un frasco con Formol al 10%.
2. Homogenizar perfectamente con ayuda del abatelenguas hasta dejar una consistencia de un atole espeso.
3. Repetir el procedimiento hasta completar las 2 muestras (de días diferentes).

B) PACIENTES LOCALES.

4. Colocar un pedazo de excremento del tamaño de una nuez en un frasco limpio con tapadera.
5. La muestra no debe extraerse de la taza del baño.
6. Remitir al laboratorio antes de 24 horas de haber sido colectada. La muestra puede ser obtenida a cualquier hora del día. No es necesario el ayuno.

Repetir el procedimiento hasta completar 3 muestras (de tres días diferentes) ⁽⁴³⁾.

XIV.2. ANEXO 2.

TÉCNICAS COPROPARASITOSCÓPICAS.

A) EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO EN FRESCO.

Esta técnica es sencilla y simple para el análisis de las muestras fecales y particularmente cuando son diarreicas. Esta técnica nos ayuda a detectar la presencia y movilidad de trofozoitos de protozoarios, así como, quistes y ooquistes de los mismos, formas de *Blastocystis sp*, así como huevos y larvas de nematodos.

En esta técnica los reactivos más utilizados son:

1. Solución salina isotónica (ssi).
2. Yodo-lugol.
3. Azul de metileno amortiguado (AMA).

La observación en fresco con Solución Salina Isotónica se usa para el examen inicial microscópico de las heces y se emplea para conservar condiciones semejantes a las

del cuerpo humano y de esta manera observar los huevos y larvas de los gusanos, trofozoitos y quistes de protozoarios (44).

El examen en fresco con Yodo - lugol se utiliza para teñir el glucógeno y el núcleo de los quistes, por lo que si éstos están presentes pueden identificarse específicamente con este método.

El examen directo en fresco con Azul de metileno amortiguado, debe ser efectuado cada vez que se observen trofozoitos de amiba en la preparación en fresco con Solución salina isotónica o cuando se sospeche la presencia de éstos. El Azul de metileno amortiguado va a teñir trofozoitos de amibas pero no a quistes, ni trofozoitos o quistes de flagelados. El Azul de metileno amortiguado es apropiado exclusivamente solo para muestras que estén frescas y no debe usarse en muestras preservadas en donde los organismos han muerto.

Material:

- Aplicadores de madera.
- Hisopos.
- Portaobjetos de 26X76mm.
- Cubreobjetos de 22X22.

Reactivos:

- Solución salina isotónica.
- Solución Yodo – Lugol.
- Solución de azul de metileno amortiguado (AMA)
- Solución 1:1 de parafina y vaselina.

Equipo:

- Microscopio.

Procedimiento:

1. Colocar 1 gota de solución salina isotónica en el centro del portaobjetos.
2. Con el aplicador, tomar la muestra, calculando más o menos de 1.5 a 2 mg. de heces y hacer una suspensión uniforme con la gota de solución salina isotónica.
3. Cubrir la preparación con el cubreobjetos.
4. Con un hisopo limpiar las orillas del cubreobjetos para quitar el exceso de muestra.
5. Sellar la preparación con parafina.
6. Repetir el procedimiento en otros 2 portaobjetos adicionando a la suspensión hecha con solución salina isotónica, yodo-lugol y azul de metileno amortiguado respectivamente.
7. Finalmente observar al microscopio con objetivos 10X y 40X ⁽⁴³⁾.

B) MÉTODO DE RITCHIE

El fundamento de esta técnica se basa en lavados sucesivos de una muestra de terminada de materia fecal, con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de restos vegetales así como también grasas presentes en dicha muestra, ya que pueden obstaculizar la observación microscópica ⁽⁴⁵⁾.

Es una técnica de concentración que demuestra la presencia de huevos, quistes, ooquistes y larvas, no importa la densidad que estos tengan. El éter se emplea, para la eliminación de muchos detritus orgánicos y el formol, tiene una función como fijador, y poder así mantener la integridad de las formas parasitarias ⁽⁴³⁾.

Material:

- Tubos cónicos para centrifuga, de 15ml.
- Vaso de plástico de 100 mL.
- Gasa cortada en cuadros de 16x16 cm
- Abatelenguas de madera.
- Pipetas Pasteur
- Bulbos de goma.
- Porta objetos de 38 X 76 mm.
- Cubre objetos 22 X 22 mm.
- Tapones de hule
- Pizeta con agua
- Embudos de plástico de 5 cm de diámetro
- Hisopos
- Gradilla
- Parafina-vaselina 1:1
-

Reactivos:

- Solución de yodo-lugol.
- Solución de formol al 10%.
- Éter.
- Cloro como desinfectante al 10%.

Equipo:

- Microscopio compuesto.
- Parrilla.
- Centrifuga.
- Vortex.
-

Procedimiento:

1. Con ayuda de un aplicador, tomar una muestra de heces de aproximadamente 1 ó 2 gramos y hacer una suspensión 3:1 en un vaso de plástico.
2. Filtrar a través de gasa húmeda a un tubo cónico de 15 ml utilizando un embudo de plástico.
3. Centrifugar el tubo a 2,500 rpm durante un minuto.
4. Descartar el sobrenadante.
5. Añadir 10 ml de formol al sedimento y con ayuda de un aplicar agitar perfectamente la muestra y dejar reposar por 5 minutos.
6. Agregar 1 ml. de éter.
7. Tapar el tubo con tapón de hule y agitar vigorosamente en el Vortex durante 15 segundos.
8. Retirar cuidadosamente el tapón del tubo cónico, teniendo cuidado de realizar este proceso lejos de la cara

9. Volver a centrifugar a 2,500 rpm por 1 minuto.
10. Al finalizar el proceso de centrifugación se obtienen 4 capas:
 - 1) Sedimento.
 - 2) Formol.
 - 3) Detritus.
 - 4) Éter.

Con apoyo de un aplicador desprender el tapón de detritus de todo alrededor, para posteriormente decantar los sobrenadantes de un solo movimiento de tal manera que solo quede el sedimento.

11. Con un hisopo limpiar las paredes del tubo cónico.
12. Mezclar perfectamente el sedimento con formol y con ayuda de una pipeta pasteur transferir el sedimento a un portaobjetos (una gota) y agregar una gota de lugol, mezclar perfectamente y colocar un cubreobjetos.
13. Con un hisopo limpiar el exceso de muestra alrededor del cubreobjetos.
14. Sellar la preparación con parafina.
15. Finalmente observar al microscopio primero utilizando el objeto de 10x y posteriormente con el objetivo de mediana resolución para confirmar las estructuras de los quistes ⁽⁴³⁾.

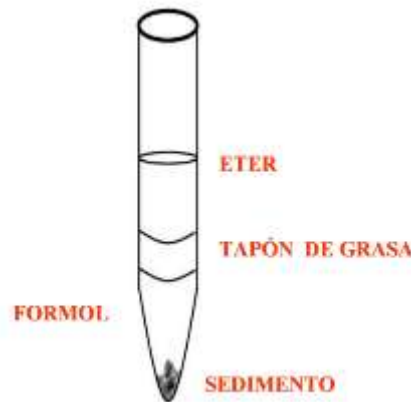


Fig.6. Tubo cónico y las capas de sedimentación por el método de Ritchie

Tomado de:

<http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/Cp.pdf>

C) TÉCNICA DE SHEATHER.

Esta técnica nos ayuda a Identificar las formas parasitarias de tamaño pequeño (ooquistes de *Cryptosporidium* y *Cyclospora*). Se utiliza una solución concentrada de sacarosa la cual posee una densidad de 1.200, lo que permite la flotación de parásitos menos densos ⁽⁴³⁾.

Las estructuras parasitarias son recuperadas de la capa superficial y los residuos se mantienen en el fondo del tubo. Con esta técnica los preparados suelen ser más limpios que los que se obtienen por sedimentación. Sin embargo, algunos huevos (los infértiles

de *Ascaris lumbricoides*) no se concentran bien en las flotaciones; para estos casos se recomienda el uso de técnicas de sedimentación. Es de relevancia mencionar que este método no es muy efectivo en materias fecales ricas en grasas ⁽⁴⁶⁾.

Material:

- Agua destilada 320 ml.
- Tubos de ensaye 13X100.
- Portaobjetos desengrasados de 26X76 mm.
- Cubreobjetos de 22X22 mm.
- Varilla de vidrio.
- Pizeta con agua.
- Vaso de plástico de 100 ml.
- Embudos de plástico de 5 cm de diámetro.
- Gasa en cuadros de 16X16 cm.
- Abatelenguas de madera.
- Aplicadores de madera.
- Hisopos.
- Asa bacteriológica con aro de 5mm de diámetro doblada con un ángulo de 90°.
- Gradilla.
- Parafina-vaselina 1:1.
- Solución parafina-vaselina 1:1.

Reactivos:

- Solución de Sheather densidad 1.180-1.200.
- Solución de yodo-lugol.
- Cloro al 10% para descartar el material.

Equipo:

- Microscopio compuesto
- Parrilla eléctrica
- Centrifuga
- Densímetro

Procedimiento:

1. Filtrar de 1 a 2 ml de heces con gasa en un tubo de centrifuga.
2. Lavar con agua de la canilla o agua destilada por centrifugación hasta sobrenadante limpio.
3. Agregar al sedimento la solución de Sheather hasta el borde del tubo.
4. Mezclar suavemente con varilla de vidrio.
5. Dejar reposar 3 minutos o centrifugar 1 minuto a 1500rpm.
6. Retirar 1 o 2 gotas de la película superficial con asa de alambre.
7. En un porta objetos colocar una gota de yodo-lugol, y homogeneizar con el cubreobjetos.
8. Con un hisopo limpiar el exceso de muestra alrededor del cubreobjetos.
9. Sellar la preparación con parafina.
10. Observar al microscopio, primeramente utilizando el objeto de 10x y posteriormente con el objetivo de mediana resolución para confirmar las estructuras de los quistes ⁽⁴³⁾.

D) TINCIÓN DE KINYOUN.

Se basa en el comportamiento ácido-resistente de la cubierta de estos parásitos, los cuales se tiñen de rojo y destacan sobre un fondo verde o azul, dependiendo del colorante de contraste usado ⁽⁴⁷⁾.

Material:

- Portaobjetos 7.5 x2.5 cm.
- Aplicadores de madera.
- Pipetas Pasteur con bulbo de goma.

Reactivos:

- Carbol-Fucsina.
- Ácido al 10%.
- Verde brillante al 1%.

Equipo:

- Microscopio compuesto

Procedimiento:

1. Elaborar un frotis de materia fecal con solución salina isotónica, dejar secar.
2. Fijar con metanol y al calor.
3. Cubrir la preparación con fucsina básica por 3 minutos. Evitando que la preparación se seque.
4. Enjuagar suavemente con agua la llave.
5. Decolorar con alcohol ácido al 10% por 5 segundos.
6. Colocar verde brillante al 1% por 30 segundos.
7. Lavar con agua y dejar secar, colocando el portaobjetos en posición vertical.
8. Observar a inmersión ⁽⁴³⁾.

E) MEDICIÓN MICROSCÓPICA DE PARÁSITOS Y SUS PRODUCTOS.

La medición de los parásitos y sus productos es un parámetro muy valioso ya que este nos ayuda a precisar el tamaño de los huevos y así como de los parásitos en sus estadios de su evolución, también permite una mejor diferenciación de ellos y un adecuado diagnóstico. Se puede realizar con un micrómetro ocular u ocular micrométrico y el micrómetro objetivo ⁽⁴³⁾.

Principio: Los micrómetros oculares están grabados con una escala fija que consiste en 50 líneas paralelas. Cada división del micrómetro ocular representa diferentes medidas según el poder de resolución del juego de objetivos utilizados en un microscopio compuesto, por lo tanto para cada juego de oculares y objetivos utilizados, la escala ocular se debe comparar con una escala calibrada conocida. Es importante recordar que una vez efectuada la calibración con un determinado juego de oculares y objetivos, éstos no pueden ser intercambiables con los componentes correspondientes de otro microscopio ⁽⁴³⁾.

Coeficiente micrométrico: se refiere a una cifra que expresa la equivalencia en μm de una división de la escala del micrómetro ocular al emplear cada objetivo del microscopio. Suele llamarse como “factor” y la operación para obtenerlo se le denomina “calibración del microscopio”. El coeficiente micrométrico es inversamente proporcional al poder de amplificación de los objetivos utilizados. Habitualmente se obtienen tres coeficientes micrométricos para cada microscopio usando un solo ocular micrométrico y los objetivos 10X y 45x (seco débil y seco fuerte) y de 90x ó 100x (de inmersión), pero puede hacerse cualquier combinación de ocular y objetivo. Para obtener el coeficiente micrométrico hay que seguir la siguiente técnica ⁽⁴³⁾.

Equipo:

- Micrómetro ocular de escala fija:

Es un pequeño disco de vidrio de 12 mm de diámetro, en el cual puede verse grabada una escala de 5 mm, dividida en 50 partes y generalmente numerada de 10 en 10. Este disco se coloca sobre el diafragma de cualquier ocular, transformándolo así en ocular micrométrico. Cada división de esta escala mide $100\ \mu\text{m}$ ⁽⁴³⁾.

- Ocular micrométrico de platina con divisiones de 0.1 y 0.01mm:

Es esencialmente similar al micrómetro ocular, pero la lente va montada sobre un corto tubo que puede acortarse o alargarse a voluntad por deslizamiento en el tubo externo, permitiendo así enfocar con toda precisión la escala micrométrica intercalada entre él ⁽⁴³⁾.

- Micrómetro objetivo:

Es un portaobjetos en cuyo centro se halla grabada una escala de 1 ó 2 mm, dividida en 100 ó 200 partes; cada división mide $10\ \mu\text{m}$ ⁽⁴³⁾.

- Microscopio compuesto estándar ⁽⁴³⁾.

Procedimiento:

1. Retirar el ocular del microscopio. Si se utiliza un microscopio binocular, se acostumbra a retirar el ocular X10 derecho.
2. Desenroscar la lente superior del ocular e insertar la oblea del micrómetro de modo que se apoye en el anillo del diafragma dentro del ocular. Colocar el micrómetro con el lado grabado hacia abajo. El micrómetro se manipula con paño para lentes y se debe evitar por todos los medios que algún hilo quede adherido a la superficie.
3. Reinsertar el ocular. Al observar a través del ocular, la escala del micrómetro aparece como una serie de divisiones alineadas.
4. Colocar el micrómetro de platina bajo el objetivo del microscopio que se ha de calibrar. Enfocar la escala del micrómetro de platina que se ve como una serie de divisiones de 0.1 y 0.01 mm.
5. Ajustar el micrómetro de platina de modo que la línea “0” de la escala del micrómetro ocular se superponga exactamente con la línea “0” de la escala del micrómetro de platina.

6. Sin efectuar ninguna otra manipulación, observar ambas escalas y hallar el próximo par de líneas que coincidan exactamente. Con un aumento de 450 X, las líneas coincidentes son la marca 40 de la escala ocular y la marca de 0.09 mm de la escala del micrómetro de la platina ⁽⁴³⁾.

Cálculos:

El objetivo de la calibración es determinar cuánto mide en μm cada división de la escala ocular cuando se calibra contra la escala del micrómetro objetivo. Por lo tanto, 40 unidades de la escala del ocular equivaldrán a 0.09 mm de la escala del micrómetro de platina y cada división del ocular es igual a $0.09\text{ mm}/40$, o sea 0.00225 mm . Dado que hay 1000 μm en cada milímetro, cada división del micrómetro es igual a 0.00225×1000 , o sea $2.25\text{ }\mu\text{m}$ ⁽⁴³⁾.

XIV.3. ANEXO 3.

MÉTODO DE PRUEBA PARA LA ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD MICROBIANA POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP), DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES, COLIFORMES FECALES Y *Escherichia coli* Y LA NORMA "CCAYAC - M - 004 / 11"

El campo de aplicación de este método es para la detección de Coliformes Totales, Coliformes fecales y *Escherichia coli* especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos menor a 10 UFC / g / mL. Por ejemplo: leche, agua y para aquellos alimentos cuyas características particulares puedan inferir en la exactitud de la cuenta de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Actualmente se utilizan tres grupos de indicadores microbianos con diferentes aplicaciones. La detección de bacterias coliformes se usa como indicador de la calidad sanitaria de agua o como indicador de condiciones sanitarias en el procesamiento de alimentos. Los coliformes fecales continúan siendo el indicador de elección para moluscos bivaldos y sus aguas de cultivo y *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal reciente o condiciones higiénicas inadecuadas. Casi todos los métodos utilizados para la detección de estos indicadores; son métodos de enumeración basados en la fermentación de la lactosa.

El método del número más probable consiste de una prueba presuntiva y confirmativa. La serie de tres tubos generalmente se utiliza para la mayoría de los alimentos, la serie de cinco tubos dependiendo la contaminación esperada y del grado de exactitud deseado.

Se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas y/o crecimiento microbiano propiedad de los microorganismos coliformes para producir gas a partir de la fermentación de lactosa dentro de las 48 horas de incubación a 35 ± 0.5 (coliformes) y a 45.5 ± 0.2 (Coliformes fecales y *E.coli*).

Para obtener el número más probable (NMP) en los resultados que se aplica en la teoría de la probabilidad, lo cual tiene como condición lo siguiente:

- Una distribución aleatoria de las bacterias que existen en la muestra.
- Las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas.

- Los microorganismos presentes en la muestra deben crecer en el medio son incubados y se mantengan en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

Consideraciones:

Si se espera una cuenta microbiana alta, la muestra debe diluirse para dar cumplimiento a las condiciones. La forma más común de realizar esta prueba es mediante diluciones decimales y usando un inóculo en series de 3,5 o 10 tubos en serie. A medida que el número de tubos inoculados para cada dilución aumenta, se reducen límites de confianza ⁽⁴⁹⁾.

XIV.4. ANEXO 4.

PCR

A) PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Colocar una cápsula de Envirocheck en línea con la fuente de agua muestra. Asegurarse de que el flujo no excede los estándares establecidos por el fabricante. Identificar correctamente la cápsula con el número de muestra.

Hacer pasar 10 L de la muestra por la cápsula de filtración con ayuda de una bomba de vacío.

Remover los contaminantes capturados en el filtro añadiendo 125 mL de buffer de elución, sellar el filtro y poner en agitación rotatoria a velocidad moderada de 5 a 10 minutos. Recuperar el buffer de elución decantando en sentido contrario al flujo de la muestra, dividir el buffer de elución en tubos de 50 mL. Repetir la remoción añadiendo 125 mL de buffer de elución, agitar y decantar.

Centrifugar todos los tubos a 2,000 g por 20 minutos.

Decantar cuidadosamente el sobrenadante y mantener una pastilla con volumen remanente de 5 mL por cada tubo. Juntar el volumen de las pastillas en un solo tubo, cuidando no exceder los 45 mL de volumen final.

Añadir 2.5mL de solución de celite al 20% en buffer NET-BSA 1% a la muestra. Mezclar la muestra en el agitador rotatorio a temperatura ambiente por 15 minutos.

Agregar 1mL de solución PVPP al 10% y mezclar la muestra en el agitador rotatorio temperatura ambiente por 15 minutos.

Pre-humedecer el filtro de la unidad de filtración con un volumen de aproximadamente 10mL de Buffer NET y aspirar. Decantar la muestra que contiene la solución de celite/PVPP dentro de la unidad de filtración y aspirar con la bomba de vacío. Asegurarse de que el líquido pase a través del centro del filtro para remover el celite y partículas de la suspensión mientras es filtrado.

Enjuagar el contenedor en que se encontraba la suspensión con la muestra con 10mL de Buffer NET para recuperar muestra tanto como sea posible, añadir a la unidad de filtración y aspirar. Agregar 10mL adicionales de Buffer NET en la unidad de filtración para enjuagar los remanentes de muestra que hayan quedado.

Ayudándose de tijeras previamente sanitizadas con cloro al 30% y un par de guantes nuevos, recortar y colocar los discos del filtro FTA dentro de una jeringa de 20mL. Colocar la jeringa en el sistema de vacío tipo Manifold, pre-humedecer el filtro FTA con Buffer NET y aspirar.

Decantar lentamente el filtrado obtenido de la filtración de la suspensión con celite dentro de la jeringa con el filtro FTA y aspirar. Repetir hasta que todo el volumen se haya filtrado.

Aun conectado al sistema Manifold, lavar dos veces con 10mL de buffer de purificación FTA. Posteriormente, lavar dos veces con 10mL de buffer de lavado FTA. Finalmente, retirar la tarjeta FTA con ayuda de pinzas estériles (unas pinzas para cada muestra) y colocarla en tubos cónicos de 15mL. Colocar los tubos en el bloque de calentamiento a 56°C durante 10min para secar la tarjeta FTA y proceder con la detección de *Cyclospora cayetanensis* por PCR Tiempo Real.

B) AMPLIFICACIÓN PRIMARIA

Perforar la tarjeta FTA seca con un perforador de 6mm. Limpiar el perforador con cloro al 30% entre muestras. Depositar el perforado en un tubo de 0.5mL de pared delgada para PCR. Los tubos deberán estar bien identificados con el código o número de muestra. Se debe incluir un blanco de reacción y de proceso.

Preparar el master mix de la reacción con los reactivos incluidos en el kit HotStarTaq multiplicando los volúmenes por el número de reacciones de acuerdo a la tabla. Preparar siempre media reacción más para amortiguar errores de pipeteo (ej: 5 rxn, preparar para 5.5)

Componente	Volumen (µL) para 1 rxn	Concentración final
HotStartTaq Master Mix	50	200 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl ₂ , 2.5 U de DNA polimerasa
MgCl ₂ 25 mM	2	2 mM
Oligo F1E 10 µM	2	0.2 µM
Oligo R2B 10 µM	2	0.2 µM
Agua para PCR	44	--

Agregar 100 µL del master mix a cada tubo de PCR y colocar en el termociclador.

Al finalizar la amplificación primaria, los tubos de 0.5mL se colocan en los adaptadores para centrífuga y se centrifugan durante un pulso a máxima velocidad. Si no se va a proceder con la amplificación multiplex anidada se almacenan en refrigeración protegidos con papel parafilm.

NOTA:

- **MgCl₂:**

Aumenta la temperatura de hibridación del DNA. La concentración de este ion resulta fundamental para la optimización de la reacción.

° En altas concentraciones de Mg⁺⁺ disminuyen la especificidad de la PCR.

° En bajas concentraciones de Mg⁺⁺ aumentan la especificidad de la reacción CITATION Mas01
V 2058 (48)

C) AMPLIFICACIÓN MULTIPLEX ANIDADA

Preparar el master mix de la reacción con los componentes incluidos en el kit SYBR Green I de acuerdo a la tabla, multiplicar los volúmenes por el número de reacciones preparando siempre media reacción de más.

El blanco se prepara con todos los componentes de la reacción excepto el producto de la amplificación primaria el cual se sustituye por agua para PCR.

Componente	Volumen (µL) para 1 RXN	Concentración final
Master SYBR Green I	2	--
MgCl ₂ 25 mM	1.6	3 mM
Oligo CC719 10 µM	1	0.5 µM
Oligo PDCL661 10 µM	1	0.5 µM
Oligo ESSP841 10 µM	1	0.5 µM
Oligo CRP999 10 µM	1	0.5 µM
Agua para PCR	11.4	--

Con ayuda de pinzas sanitizadas con cloro al 30% colocar los capilares dentro de los adaptadores para centrífuga previamente enfriados (incluidos en el sistema LightCycler) y transferir 19 µL del master mix a cada capilar. Agregar 1 µL de la reacción de la amplificación primaria, el cual contiene el amplicón que servirá como templado. Tapar los capilares con la herramienta para tapar (Incluida en el sistema LightCycler) y centrifugar durante 2min a 3000rpm. Transferir los capilares al carrusel del LightCycler en la posición correspondiente y colocarlos en el termociclador.

Por último se realiza la confirmación de resultados.

En algunos casos será necesario realizar una confirmación del resultado obtenido mediante la PCR tiempo real. Esta confirmación se lleva a cabo mediante una electroforesis del producto amplificado.

Identificar apropiadamente tubos de 2mL nuevos y libres de nucleasas, agregar 10µL de buffer de carga en cada tubo. Cuidadosamente destapar los capilares y colocarlos boca abajo en los tubos correspondientes. Centrifugarlos a 3000rpm durante 1min.

El producto mezclado con el buffer de carga se colocará el gel de electroforesis y se correrá bajo el programa establecido en el sistema E-Gel.

Se deberán correr siempre marcador de peso molecular para referenciar apropiadamente el tamaño de las bandas obtenidas.

El tamaño esperado de los productos amplificados para cada especie se resume en la tabla ⁽⁴²⁾.

Nombre del oligonucleótido	Especificidad	Tamaño del ampliación (pb)
F1E	<i>Cyclospora</i> y <i>Eimeria</i> spp.	636
R2B	<i>Cyclospora</i> y <i>Eimeria</i> spp.	-
CC719	<i>C. cayetanensis</i>	298
PLDC661	<i>C. cercopithecii</i> , <i>C. colobi</i> , <i>C. papionis</i>	361
ESSP841	<i>Eimeria</i> spp.	174
CRP999	<i>Cyclospora</i> y <i>Eimeria</i> spp.	-

Oligonucleótidos

Oligonucleótido	Especificidad	Secuencia (5'-3')
F1E	<i>Cyclospora</i> y <i>Eimeria</i> spp.	TACCCAATGAAAACAGTTT
R2B	<i>Cyclospora</i> y <i>Eimeria</i> spp.	CAGGAGAAGCCAAGGTAGG
CC719	<i>C. cayetanensis</i>	GTAGCCTTCCGCGCTTCG
PLDC661	<i>C. cercopithecii</i> , <i>C. colobi</i> , <i>C. papionis</i>	CTGTCGTGGTCATCGTCCGC
ESSP841	<i>Eimeria</i> spp.	GTTCTATTTTGTTGGTTTCTAGGACCA
CRP999	<i>Ciclospora</i> y <i>Eimeria</i> spp.	CGTCTTCAAACCCCTACTGTCTG

XIV.5. ANEXO 5.

TABLA DE DATOS

Fecha	Nombre	Edad	Sexo	Ritchie	Faust	Sheater	Tinción Kinyoun