



## Educación Continua

# Diagnóstico de laboratorio de coccidios intestinales

**Lisette Retana Moreira,**

Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

Correo electrónico: lisette.retanamoreira@ucr.ac.cr

### Introducción

Los coccidios intestinales son protozoarios, parásitos intracelulares obligados, pertenecientes al phylum Apicomplexa<sup>(1)</sup>. Estos parásitos afectan el tracto gastrointestinal de seres humanos y animales, principalmente células del duodeno y yeyuno, causando diferentes tipos de manifestaciones clínicas; la más común es la diarrea, considerada una de las cinco principales causas de muerte a nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>(2)</sup>. Debido al carácter oportunista, estos parásitos son considerados los principales causantes de diarrea en pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>(3)</sup>. Además, en el caso de pacientes inmunosupresos se reportan manifestaciones clínicas y complicaciones de tipo extraintestinal<sup>(4,5)</sup>, resultando esta población la que presenta las manifestaciones clínicas más severas y que pueden llegar incluso a ser fatales<sup>(6)</sup>.

Las cuatro principales especies que afectan al ser humano son *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli*, *Cryptosporidium hominis* y *Cryptosporidium parvum*. Las principales diferencias entre los géneros se presentan a nivel de ciclo de vida y para realizar el diagnóstico se deben conocer las diferencias con respecto a la estructura de los ooquistes, ya sean tanto ooquistes no esporulados como ooquistes esporulados (formas infectantes).

En la actualidad, existen muchos métodos desarrollados para el diagnóstico de coccidios intestinales además de la microscopía, los cuales incluyen técnicas inmunológicas y moleculares, que debido al elevado costo de las mismas y a la necesidad de infraestructura apropiada para realizarlas, este tipo de diagnóstico no es posible de implementar en la mayoría de laboratorios clínicos de Costa Rica. Es por lo anterior que las tinciones de ácido resistencia se convierten en una opción

factible y efectiva para el diagnóstico de estos parásitos. Algunas de estas tinciones también son utilizadas de rutina en laboratorios de Bacteriología, por lo que no constituyen una carga económica adicional importante para los servicios de salud.

El objetivo de esta revisión es hacer una breve mención de las principales especies de coccidios intestinales presentes en Costa Rica y que afectan al ser humano, así como presentar diferentes técnicas utilizadas para el diagnóstico de las enfermedades producidas por estos parásitos, con el fin de resaltar lo importante de realizar el diagnóstico adecuado y oportuno de los mismos en los laboratorios clínicos.

### *Cyclospora cayetanensis*

A pesar de que el primer reporte publicado en la literatura sobre una infección por *Cyclospora* en seres humanos es del año 1979<sup>(7)</sup>, la especie *C. cayetanensis* fue descrita en heces humanas en el año 1993 por Ortega y colaboradores<sup>(8)</sup>. En pacientes inmunocompetentes este parásito causa diarreas leves o moderadas, las cuales son autolimitadas; en cambio, en pacientes inmunosupresos, los episodios de diarrea son generalmente prolongados. En países desarrollados, es uno de los agentes involucrados en la denominada "diarrea del viajero", sobre todo en personas que visitan países de América Latina, India y el Sureste Asiático<sup>(9)</sup>.

Desde inicios de los años 90 se considera esta especie como un importante agente patógeno en seres humanos, debido a que ha sido identificado como el responsable de diversos brotes de diarrea en países desarrollados, asociados principalmente con el consumo de frutas y vegetales contaminados con ooquistes del parásito, provenientes de países en vías de desarrollo<sup>(9)</sup>.

Dentro de los alimentos implicados en estos brotes, los reportados con mayor frecuencia son las frambuesas, las fresas, la albahaca y alimentos utilizados para la preparación de ensaladas<sup>(7)</sup>.

El diagnóstico etiológico de *C. cayetanensis* se realiza observando los ooquistes en las muestras de heces, los cuales se caracterizan por ser pequeños y esféricos, con un diámetro aproximado de 7.7 - 9.9  $\mu\text{m}$ <sup>(7)</sup>. A la hora de ser excretados, aparecen en las heces como esferas conteniendo una serie de glóbulos refráctiles (Figura 1). Sin embargo, transcurridos entre 7 y 15 días posteriores a su excreción<sup>(10)</sup>, los ooquistes ya han esporulado en el medio ambiente y se observan dos esporoquistes dentro del ooquiste, con dos esporozoítos dentro de cada esporoquiste<sup>(7,8,9)</sup>.

### *Isospora belli*

El género *Isospora* fue establecido por Schneider en 1881 y la especie *Isospora belli* (sin. *Cystoisospora belli*) fue descrita en 1923 por Wenyon<sup>(11)</sup>. Al igual que en el caso de *C. cayetanensis*, este parásito causa diarreas prolongadas en pacientes inmunosupresos y también ha sido implicado en casos de diarrea del viajero. Además de las manifestaciones clínicas similares, *I. belli* comparte la misma distribución mundial y los mecanismos de transmisión con *C. cayetanensis*. Se ha llegado a diagnosticar infecciones de carácter extraintestinal en nódulos linfáticos mesentéricos, hígado y bazo<sup>(12)</sup>.

La forma elipsoidal u ovoide y el tamaño aproximado de 10 - 20  $\mu\text{m}$  de sus ooquistes hacen que este parásito sea fácilmente reconocible en una observación directa de una muestra de heces. En el caso de los ooquistes inmaduros, es común observar formas conteniendo un esporoblasto o dos esporontes (Figura 2a y 2b) y posterior a 24 -72 horas, dependiendo de diferentes condiciones ambientales (por ejemplo humedad, temperatura y concentración de

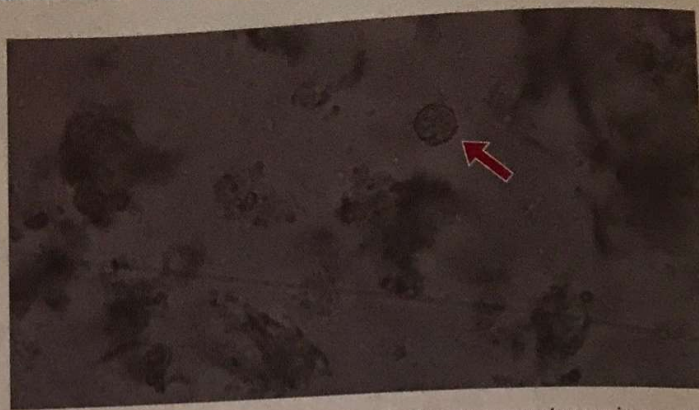


Figura 1. Ooquistes inmaduros de *Cyclospora cayetanensis* en una observación directa, a 40x. El tamaño varía entre los 7.7  $\mu\text{m}$  y 9.9  $\mu\text{m}$  y dentro de ellos se observan los glóbulos refráctiles.

oxígeno)<sup>(12)</sup>, se observan ooquistes maduros, los cuales contienen dos esporoquistes, cada uno de ellos con cuatro esporozoítos<sup>(4)</sup>.

A pesar de la sencilla identificación de este parásito en muestras de heces, la intermitencia en la excreción de estas formas hace que se recurra a técnicas de concentración y tinciones para poder recuperar los ooquistes.

### *Cryptosporidium* sp.

El género *Cryptosporidium* lo describió Tyzzer por primera vez en ratones, en el año 1907. En 1976 se reportó en un niño inmunocompetente y en un adulto inmunosupreso y se implicó como agente causal de enfermedad gastrointestinal en seres humanos. Solamente 8 casos humanos habían sido descritos en la literatura hasta que aparece el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), lo que resultó en un aumento considerable en el diagnóstico de casos de criptosporidiosis<sup>(13)</sup>. Desde entonces se ha ligado esta enfermedad parasitaria con pacientes VIH

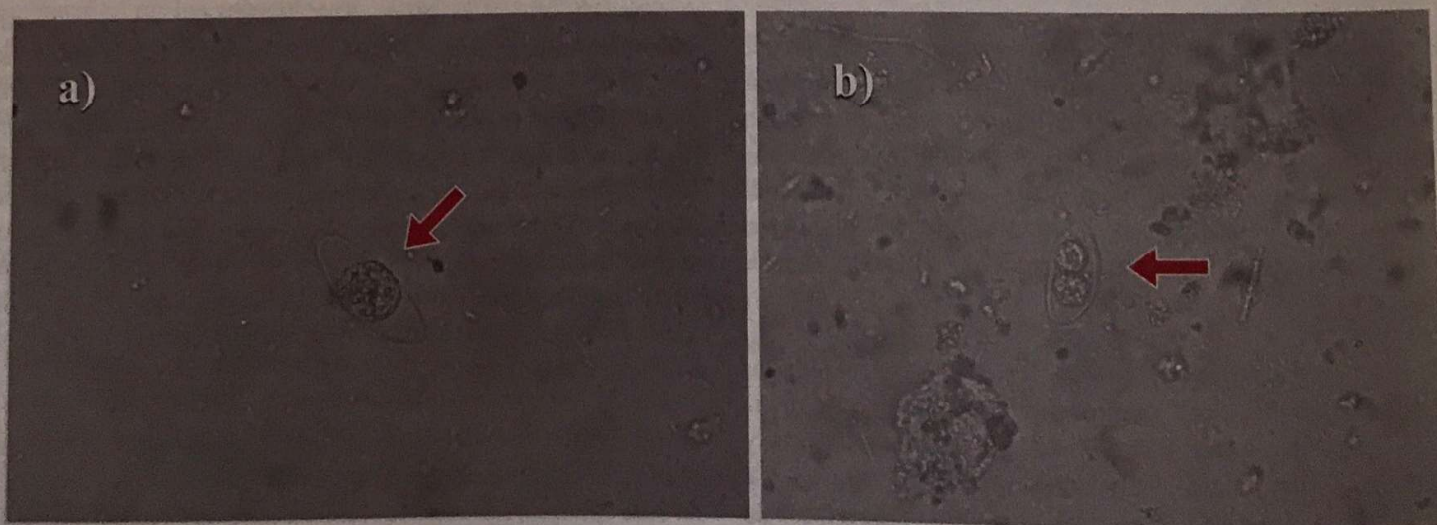


Figura 2. Ooquistes inmaduros de *Isospora belli* en una observación directa, a 40x. El tamaño varía entre los 10  $\mu\text{m}$  y 20  $\mu\text{m}$  y dentro de ellos se observa: a) un esporoblasto o b) dos esporontes.

positivos y se consideró la criptosporidiosis, con diarrea de más de un mes de duración, como una condición incluida en la definición de caso de SIDA (revisada en 1987 por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades -CDC, por sus siglas en inglés- y la OMS)<sup>(14,15,16)</sup>.

Dos especies son las principales responsables de la infección en seres humanos: *C. hominis* y *C. parvum*. Esta última se vincula con una gran cantidad de especies animales como hospederos, entre ellos animales domésticos<sup>(17)</sup>. El hecho de que la enfermedad producida por *Cryptosporidium parvum* sea considerada una zoonosis, asegura la permanencia del parásito en la naturaleza, implicándose así, diferentes animales en su diseminación.

La criptosporidiosis se caracteriza por cuadros de diarrea de aproximadamente dos semanas de duración e incluso diarreas persistentes y problemas de malabsorción, manifestaciones que son graves sobre todo en personas inmunosupresas, con recuentos bajos de linfocitos CD4<sup>+</sup> (<180 linfocitos/mm<sup>3</sup>)<sup>(17,18)</sup>. Se reportan también manifestaciones extraintestinales en esta población, principalmente en el hígado, páncreas e incluso en el árbol traqueo-bronquial<sup>(18)</sup>. Una característica que diferencia este parásito de las dos especies de coccidios mencionadas anteriormente es la capacidad de producir autoinfecciones debido no sólo a la excreción de ooquistes maduros sino también a la producción de ooquistes de pared delgada, estos últimos capaces de liberar formas (esporozoítos) que van a infectar nuevas células dentro del mismo hospedero<sup>(18)</sup>.

Este parásito ha sido el responsable de muchos brotes asociados con agua contaminada y junto con *Lamblia intestinalis* son los parásitos que más casos de diarrea por esta vía han generado en países desarrollados<sup>(5)</sup>. *Cryptosporidium* sp. ha sido clasificado por la OMS como un "patógeno de referencia", utilizado como indicador de la calidad del agua<sup>(19)</sup>. Se ha reportado también su transmisión por aguas recreacionales contaminadas<sup>(17)</sup> y por contaminación alimentaria, recuperándose ooquistes de vegetales frescos y mariscos<sup>(20,21)</sup>.

Características como la baja dosis infectante, la excreción de ooquistes ya esporulados y la resistencia de esos ooquistes a condiciones ambientales y a los métodos utilizados para el tratamiento y purificación de las aguas para consumo humano, hacen indispensable el diagnosticar este coccidio. La identificación se realiza observando los ooquistes de pared gruesa, los cuales son esféricos y tienen un tamaño aproximado de 4 - 6 µm<sup>(13)</sup>; debido al pequeño tamaño de estos ooquistes, el parásito podría pasar desapercibido si se utiliza solamente la observación directa, por lo que se recomienda realizar tinciones para asegurar el correcto diagnóstico. Estos ooquistes se caracterizan por presentar en su interior 4 esporozoítos, sin la presencia de esporoquistes<sup>(18)</sup>, a diferencia de *C. cayetanensis* e *I. belli*.

## Diagnóstico de coccidios intestinales

En la actualidad, existe disponible una gran cantidad de pruebas para el diagnóstico de coccidios intestinales. Antes de implementar alguna técnica de diagnóstico, se debe considerar algunos aspectos importantes como la consistencia de la muestra y algunas características de la diarrea producida por este grupo de parásitos, las cuales se resumen en la Tabla 1.

La microscopía es la herramienta más utilizada para este fin y se emplean con mayor frecuencia la observación directa y las técnicas de concentración y tinción. Existen además técnicas inmunológicas y moleculares desarrolladas, pero el alto costo de la mayoría de ellas y la necesidad de contar con equipo especializado son aspectos que limitan su uso a estudios epidemiológicos e investigación.

A continuación se hace referencia a algunas de las técnicas disponibles para el diagnóstico de coccidios intestinales. Es importante recalcar que un diagnóstico se reporta negativo solamente cuando no se observan parásitos en al menos tres muestras de heces, recogidas en días alternos<sup>(23)</sup>.

### Observación directa

Es la técnica que se emplea de rutina en los laboratorios clínicos para muestras de heces. Se acostumbra realizar un montaje de la muestra en solución salina al 0.85% y en solución de lugol doble. En este caso, es imprescindible tomar en cuenta las características de los ooquistes en una muestra de heces con poco tiempo de excreción y poder realizar la diferencia de estos ooquistes inmaduros, en el caso de *C. cayetanensis* e *I. belli* (Figura 1, Figura 2a y 2b).

El diagnóstico de *Cryptosporidium* sp. no se realiza por medio de la observación directa, debido al pequeño tamaño de los ooquistes. Además, al ser la excreción de ooquistes intermitente y eliminarse un número bajo de ooquistes en estas enfermedades parasitarias<sup>(10)</sup>, se recomienda acompañar la observación directa al menos con una técnica de concentración y la posterior observación y tinción del material obtenido de la concentración.

Si se desea, se puede añadir dicromato de potasio a las muestras de heces para preservarla y permitir que se produzca la esporogonia<sup>(18)</sup>. Con ésto se logra realizar una identificación con ooquistes maduros y mantener la viabilidad de los ooquistes y la capacidad de infectividad de los parásitos. Sin embargo, tiene como desventaja el tiempo que se debe esperar para que se de esta reproducción asexual, el cual comprende de 7 a 15 días en el caso de *C. cayetanensis* y de 1 a 3 días en el caso de *I. belli*<sup>(10,12)</sup>, como ya ha sido mencionado.

Tabla 1. Características de la diarrea en pacientes con coccidios intestinales (7,12,18,22,28,31)

<b>Inmunocompetentes:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inicio abrupto.</li> <li>• Acompañada de calambres abdominales y fiebre de bajo grado (en algunos casos).</li> <li>• Acuosa, secretora e intermitente.</li> <li>• Intensidad variable (5 - 7 deposiciones/día).</li> <li>• Generalmente de 5 a 14 días, podría prolongarse hasta un mes o más.</li> <li>• No es común la presencia de eritrocitos ni leucocitos.</li> </ul>
<b>Inmunosupresos:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diarrea crónica y reincidente, semejante a la que se presenta en el cólera.</li> <li>• Acompañada de pérdida de peso y deshidratación.</li> <li>• Intensidad variable (se reporta una excreción de hasta 17L de heces/día).</li> </ul>

Tabla 2. Procedimiento para realizar la concentración de Ritchie<sup>(25)</sup>

- 1 Colocar 1 g de heces en un recipiente pequeño.
- 2 Agregar 10 mL de agua destilada o solución salina.
- 3 Fraccionar la muestra con ayuda de aplicadores.
- 4 Filtrar con gasa y agregar de nuevo agua destilada o solución salina hasta 1 cm antes del borde.
- 5 Centrifugar a 2000 rpm durante 2 minutos.
- 6 Decantar el sobrenadante y repetir el paso hasta que el sobrenadante quede claro.
- 7 Agregar al sedimento 4 mL de formalina al 10% y dejar en reposo durante 5 minutos.
- 8 Agregar 3 mL de éter o acetato de etilo, tapar el tubo y agitar vigorosamente.
- 9 Quitar el tapón y centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos.
- 10 Romper el tapón de detritos con la ayuda de un aplicador y decantar el sobrenadante.
- 11 Colocar una gota del sedimento entre portaobjetos y cubreobjetos y observar al microscopio.

Tabla 3. Procedimiento para realizar la concentración de Sheather<sup>(25)</sup>

- 1 Colocar 1 mL de heces homogeneizadas en un tubo de centrifuga.
- 2 Añadir solución saturada de azúcar hasta llegar a 0,5 cm del reborde del tubo.
- 3 Colocar un tapón de corcho e invertir varias veces hasta obtener una suspensión uniforme.
- 4 Centrifugar durante 2 minutos a 1500 o 2000 rpm.
- 5 Recoger el material flotante con una pipeta Pasteur.
- 6 Colocar entre portaobjetos y cubreobjetos y observar al microscopio.

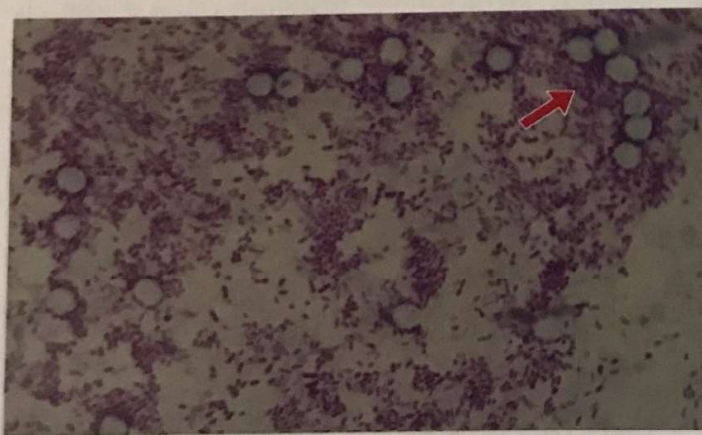


Figura 3. Tinción de Wright de una muestra con oocistos de *Cryptosporidium* sp., 100x. Debido a las características estructurales de la pared, los oocistos no se logran teñir.

## Concentración y tinciones

Las técnicas de concentración mediante sedimentación y flotación son técnicas que deben emplearse para el diagnóstico de parásitos intestinales en general. En el caso de los coccidios, la técnica de concentración por sedimentación utilizando

formalina-acetato de etilo (concentración de Ritchie) (Tabla 2) es una técnica empleada con frecuencia<sup>(7)</sup>, además de la técnica de concentración por flotación, utilizando la solución azucarada de Sheather (Tabla 3)<sup>(24)</sup>. Existen otras técnicas de concentración como la sedimentación con agua, la sedimentación con ácido-éter y la flotación con sulfato de Zinc (Faust)<sup>(25)</sup>. Se recomienda el uso de estas técnicas para aumentar las probabilidades de detectar parásitos intestinales ya que son fáciles de realizar, la probabilidad de cometer errores técnicos es baja y permite la recuperación de un amplio rango de organismos<sup>(26)</sup>.

Con respecto a las tinciones empleadas para el diagnóstico de estos parásitos, deben utilizarse las tinciones de ácido resistencia. Debido a las características estructurales de la doble pared de los ooquistes, técnicas convencionales de tinción como las tinciones de Giemsa o Wright no permiten colorear los parásitos puesto que el colorante no logra penetrar el ooquiste. En estos casos, se tiñen otras estructuras presentes en la muestra de heces y los ooquistes quedarían como espacios claros, a manera de tinción negativa. La Figura 3 muestra la sección de un frotis de heces con ooquistes de *Cryptosporidium* sp. teñido con colorante de Wright.

En el caso de las tinciones de ácido resistencia, la tinción más utilizada es la de Ziehl-Neelsen modificada (Tabla 4) aunque también pueden emplearse las tinciones Kinyoun, dimetilsulfóxido-carbolfucsina y safranina-azul de metileno<sup>(7,27,28,29)</sup>. La tinción de Koster modificada (Tabla 5) es una tinción diferencial para *Cryptosporidium* sp. ya que permite la visualización de los esporozoítos dentro del ooquiste, a diferencia de la tinción de Ziehl-Neelsen<sup>(25)</sup>. Debería considerarse el emplear esta tinción de rutina en muestras diarreicas, donde se sospeche de una criptosporidiosis.

Para el diagnóstico de coccidios intestinales es posible realizar la tinción auramina-fenol. La desventaja de considerar esta técnica es que necesariamente se debe contar con un microscopio de fluorescencia<sup>(17,18)</sup>.

En las Figuras 4a, 4b y 4c se muestran ooquistes teñidos con la tinción de Ziehl-Neelsen modificada y en la Figura 5 se observan algunas estructuras que son comúnmente confundidas con ooquistes. Los resultados de esta tinción son variables, observándose ooquistes que se tiñen rojo oscuro, rosado pálido e incluso ooquistes que no se tiñen<sup>(7)</sup>.

En la Figura 6 se observan ooquistes teñidos con una tinción de Koster, donde los ooquistes de *Cryptosporidium* sp. se observan de un color rojo pálido contra un fondo verde.

### Autofluorescencia

Los ooquistes de *C. cayetanensis* fluorescen bajo una longitud de onda de 450 - 490 nm y se observan de color verde<sup>(7,30)</sup> mientras que, utilizando una longitud de onda de 340 - 380 nm es posible observar los ooquistes de color azul<sup>(23)</sup> al igual que sucede con los ooquistes de *I. belli*<sup>(31)</sup>. Es importante considerar que la intensidad de la fluorescencia de los ooquistes depende del tiempo de excretada la muestra así como de las condiciones de almacenamiento<sup>(7)</sup>, por lo que la autofluorescencia una técnica que no se recomienda para el diagnóstico de rutina de estos parásitos, ya que es útil solamente si se cuenta con muestras recién emitidas.

### Técnicas inmunológicas

En el caso de *Cryptosporidium* sp. se puede realizar diagnóstico por medio de separación inmunomagnética e inmunofluorescencia directa e indirecta (con anticuerpos monoclonales), aglutinación en látex, hemaglutinación reversa pasiva y ELISA. También, existen reactivos comerciales de inmunocromatografía para detección de antígenos del parásito en muestras

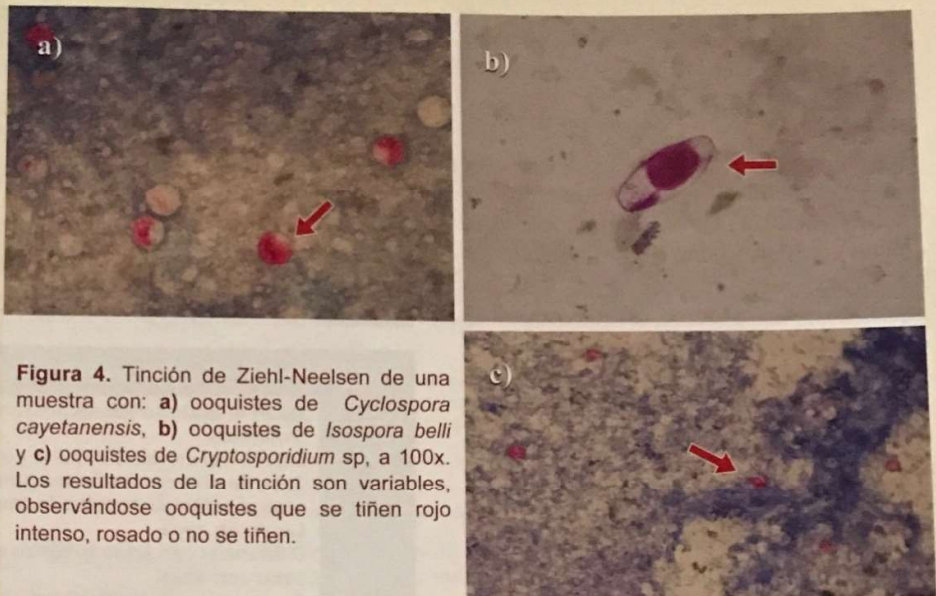


Figura 4. Tinción de Ziehl-Neelsen de una muestra con: a) ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*, b) ooquistes de *Isospora belli* y c) ooquistes de *Cryptosporidium* sp., a 100x. Los resultados de la tinción son variables, observándose ooquistes que se tiñen rojo intenso, rosado o no se tiñen.

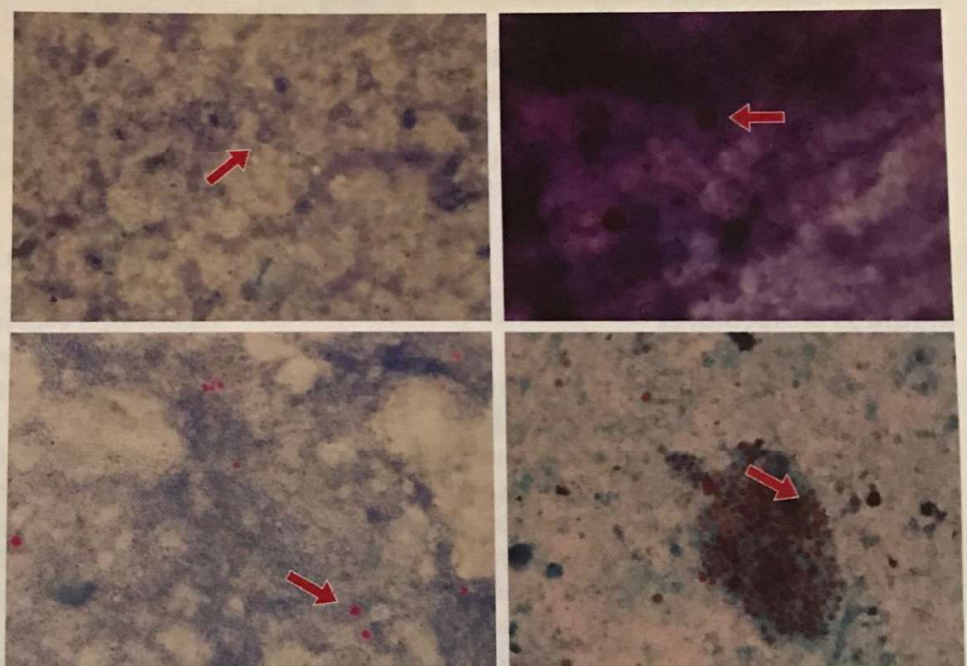


Figura 5. Estructuras que comúnmente se confunden con ooquistes al realizar la tinción de Ziehl-Neelsen, 100x.

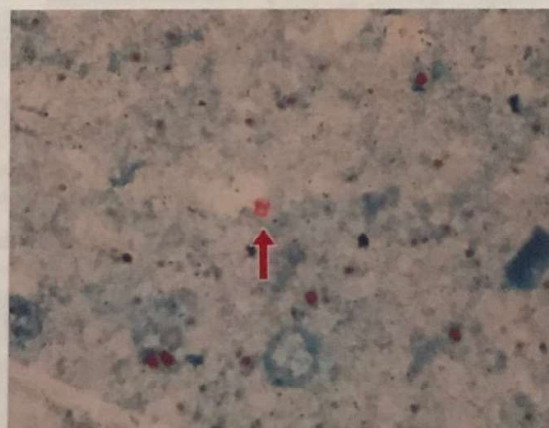


Figura 6. Tinción de Koster en una muestra con *Cryptosporidium* sp., a 100x. Al ser una tinción diferencial para este parásito, es posible observar los esporozoitos dentro del ooquiste.

frescas o preservadas<sup>(14,28,32,33,34,35)</sup>, como por ejemplo el InmunoCard STAT *Cryptosporidium/Giardia*® de Meridian Diagnostics y el ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium*® de Beckton Dickinson. Dentro de las desventajas del uso de este tipo de técnicas se encuentran el costo elevado, la posibilidad de falsos positivos por reacciones cruzadas y el que los resultados van a verse afectados por la consistencia de las muestras<sup>(17)</sup>.

Aún no ha sido posible el desarrollo de una técnica inmunológica para el diagnóstico a nivel de especie<sup>(33,36)</sup>, aunque la importancia de la identificación a nivel de especie es más epidemiológica que clínica, utilizándose otro tipo de técnicas para este fin y que sirven para evaluar infectividad, principalmente en situaciones de brotes<sup>(36)</sup>.

Hasta el momento no existe disponible comercialmente ninguna técnica inmunológica para el diagnóstico de *C. cayetanensis*<sup>(7)</sup> ni de *I. belli*. Algunos inconvenientes para el desarrollo de estas técnicas son la gran cantidad de ooquistes que se necesitan y la falta de modelos animales donde mantener estas especies<sup>(7)</sup>.

### Métodos moleculares

En el área del Diagnóstico Molecular también se ha trabajado en el diagnóstico de coccidios intestinales. Por ejemplo, en el caso de *C. cayetanensis* existe una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando el gen ARNr 18S, aunque el producto amplificado no diferencia entre especies de *Cyclospora* sp. y *Eimeria* sp<sup>(37)</sup>. Posterior a ésta, se desarrolló una SNP-PCR<sup>(38)</sup> y una PCR-RFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción) seguida de una visualización por medio de electroforesis en gel, técnica que sirve para distinguir entre los géneros mencionados anteriormente<sup>(39)</sup>. Se ha descrito también una RT-PCR<sup>(40)</sup> y una PCR utilizando ADN de la región ITS2<sup>(41)</sup>. Para el diagnóstico de *Isospora belli* también ha sido utilizada la técnica de PCR<sup>(42)</sup>.

En el caso de *Cryptosporidium* sp. es más común el uso de técnicas moleculares no solamente para el diagnóstico en muestras clínicas, sino también en muestras ambientales. Se ha utilizado la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), técnica que funciona para la detectar ooquistes, pero no para realizar diferenciación de especies o genotipos; se propone que la técnica funciona para la detección de ooquistes viables exclusivamente, teoría que resulta controversial para algunos autores<sup>(43)</sup>. La PCR-RFLP es útil para diferenciar entre genotipos de *Cryptosporidium* sp<sup>(35)</sup> y actualmente se ha desarrollado una técnica de RT-PCR que permite un análisis

Tabla 4. Procedimiento para realizar la tinción de Ziehl-Neelsen modificada<sup>(25)</sup>

1	Hacer el frotis y dejar secar al aire. Fijar el frotis con alcohol metílico durante 5 minutos.
2	Colocar la carbolfucsina sobre el frotis y calentar durante 5 minutos. Debe haber emisión de vapor, pero no hervir.
3	Lavar con agua.
4	Decolorar con alcohol ácido durante 30 segundos o hasta que solo queden trazas del color rojo.
5	Contrateñir con azul de metileno o verde malaquita al 5% durante un minuto.
6	Lavar con agua y dejar secar al aire.
7	Observar al microscopio.

Tabla 5. Procedimiento para realizar la tinción de Koster modificada<sup>(25)</sup>

1	Hacer el frotis y dejar secar al aire. Fijar el frotis con alcohol metílico de 2 a 5 minutos.
2	Secar en el mechero durante poco tiempo (hasta que el alcohol se quemé).
3	Teñir durante 5 minutos con una mezcla de 2 partes de una solución acuosa saturada de safranina más 5 partes de solución de KOH al 5,6%.
4	Lavar con agua.
5	Diferenciar con ácido sulfúrico al 0,1% durante 10 segundos.
6	Lavar con agua.
7	Contrateñir con verde malaquita al 5% durante 10-15 segundos.
8	Lavar con agua y dejar secar al aire.
9	Observar al microscopio.

directo de secuencias que sirve para identificar cualquier especie del género<sup>(44)</sup>.

### Conclusiones

Los coccidios son parásitos intestinales diagnosticables en muestras de heces, no obstante, muchas veces no se utiliza la metodología adecuada para asegurar su correcto diagnóstico. Las concentraciones y tinciones de ácido resistencia son las técnicas recomendadas, ya que son de bajo costo, consumen poco tiempo y los reactivos que se utilizan están disponibles en la mayoría de laboratorios clínicos. Se sugiere que cada laboratorio establezca un protocolo para diagnóstico de parásitos en muestras de heces que contemplen estas técnicas ya que, aunque las técnicas moleculares son muy útiles en estudios epidemiológicos y taxonómicos de coccidios intestinales, estas técnicas probablemente no lleguen a desplazar a la microscopía en el diagnóstico de rutina de estas enfermedades parasitarias.

### Referencias

1. Ravindran S, Boothroyd JC. Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasites. *Traffic* 2008, 9: 647-656.
2. World Health Organization, <http://www.who.int/>. Consultada: 02 de noviembre de 2012.
3. Chalmers MR, Davies AP. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology* 2010, 124: 138-146.
4. Michiels JF, Hofman P, Bernard E, Saint Paul MC, Boissy C, Mondain V, LeFichoux Y, Loubiere R. Intestinal and extraintestinal *Isospora belli* infection in an AIDS patient. A second case report. *Pathology, Research and Practice* 1994, 190: 1089-1094.
5. Balduresson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004-2010. *Water Research* 2011, 45: 6603-6614.

6. Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection* 2002, 4: 1059-1066.
7. Ortega YR, Sanchez R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite. *Clinical Microbiology Reviews* 2010, 23: 218-234.
8. Ortega YR, Sterling CR, Gilman RH, Cama VA, Díaz F. *Cyclospora* species – a new protozoan pathogen of humans. *New England Journal of Medicine* 1993, 328: 1308-1312.
9. Chacin-Bonilla L. Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis*: A review focusing in endemic areas. *Acta Tropica* 2010, 115: 181-193.
10. Eberhard, ML, Pieniazek NJ, Arrowood MJ. Laboratory diagnosis of *Cyclospora* infections. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 1997, 121: 792-797.
11. Neira P, Barthel M, Wilson G, Muñoz N. Infección por *Isospora belli* en pacientes con infección por VIH. Presentación de dos casos y revisión de la literatura. *Revista Chilena de Infectología* 2010, 27: 219-227.
12. Lindsay DL, Dubey JP, Blagburn BL. Biology of *Isospora* spp. From humans, nonhumans primates and domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* 1997, 10: 19-34.
13. Dillingham RA, Lima AA, Guerrant RL. Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection* 2002, 4: 1059-1066.
14. Centers of Disease Control. Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 1987, 36: 1S-15S.
15. World Health Organization. 1987 revision of CDC/WHO case definition for AIDS. *The Weekly Epidemiological Record* 1988, 63: 1-8.
16. Díaz-Torres HM, Lubián-Caballero AL. Definición de caso y clasificación de la infección por VIH y SIDA. *Revista Cubana de Medicina* 1998, 37: 157-165.
17. Leitch GJ, He Q. Cryptosporidiosis – an overview. *Journal of Biomedical Research* 2012, 25: 1-16.
18. Chalmers RM, Davies AP. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology* 2010, 124: 138-146.
19. Medema G, Teunis P, Blokker M, Deere D, Davison A, Charles P, Loret JF. WHO Guidelines for Drinking Water Quality: *Cryptosporidium*. New York: WHO 2006, p. 138.
20. Monge R, Chinchilla M. Presence of *Cryptosporidium* oocysts in fresh vegetables. *Journal of Food Protection* 1996, 59:202-203.
21. Freire-Santos F, Oteiza-Lopez AM, Vergara-Castiblanco CA, Ares-Mazas E, Alvarez-Suarez E, Garcia-Martin O. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in bivalve molluscs destined for human consumption. *Journal of Parasitology* 2000, 86: 853-854.
22. Weitz JC, Weitz C, Canales M, Moya R. Infección por *Cyclospora cayetanensis*. Revisión a propósito de tres casos de diarrea del viajero. *Revista Chilena de Infectología* 2009, 26: 549-554.
23. Karanja RM, Gatei W, Wamae N. Cyclosporiasis: an emerging public health concern around the world and in Africa. *African Health Sciences* 2007, 7: 62-67.
24. Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL. Biology of *Isospora* spp. From humans, nonhuman primates, and domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews* 1997, 10: 19-32.
25. Castro A, Guerrero OM. Técnicas de diagnóstico parasitológico. Segunda edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio". San José, Costa Rica, 2006. 112 páginas.
26. Garcia LS. Macroscopic and microscopic examination of fecal specimens. *Diagnostic Medical Parasitology*. ASM Press. Washington D.C., 2001: 741-785.
27. Jex AR, Smith HV, Monis PT, Campbell BE, Gasser RE. *Cryptosporidium* – Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances* 2008, 26: 304-317.
28. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal of Parasitology* 2000, 30:1305-322.
29. Galvan-Díaz AL, Herrera-Jaramillo V, Santos-Rodríguez ZM, Delgado-Naranjo M. Coloraciones Ziehl-Neelsen y Safranina modificadas para el diagnóstico de *Cyclospora cayetanensis*. *Revista de Salud Pública* 2008, 10: 488-493.
30. Núñez-Fernández FA, Gálvez-Oviedo MD, Finlay-Villalvilla CM. Primer reporte en Cuba de infección intestinal humana por *Cyclospora cayetanensis*, Ortega, 1993. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 1995, 47: 211-214.
31. Berlin OG, Contreas CN, Sowerby TM. Detection of *Isospora* in the stools of AIDS patients using a new rapid autofluorescence technique. *AIDS* 1996, 10: 442-443.
32. Chako JW, Tyler JW, Schultz LG, Chiguma L, Beerntsen. Cryptosporidiasis in people: it's not just about the cows. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010, 24: 37-43.
33. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection* 2002, 4: 1047-1058.
34. Collinet-Adler S, Ward HD. Cryptosporidiosis: environmental, therapeutic and preventive challenges. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2010, 29: 927-935.
35. Del Coco VF, Córdoba MA, Basualdo JA. Criptosporidiosis: una zoonosis emergente. *Revista Argentina de Microbiología* 2009, 41: 185-196.
36. Smith HV, Caccio SM, Tait A, McLaughlin J, Thompson RC. Tools for investigating the abiotic transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Trends in Parasitology* 2006, 22: 160-166.
37. Relman DA, Schmidt tm, Gajadhar A, Sogin J, Cross K, Yoder O, Echeverría P. Molecular phylogenetic analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggests that it is closely related to *Eimeria* species. *Journal of Infectious Diseases* 1996, 173: 440-445.
38. Orlandi PA, Carter L, Brinker AM, da Silva AJ, Chu DM, Lampel KA, Monday SR. Targeting Single-Nucleotide Polymorphisms in the 18S rRNA gene to differentiate *Cyclospora* species from *Eimeria* species by Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2003, 69: 4806-4813.
39. Mundaca CC, Torres-Slimming RV, Araujo-Castillo, Moran M, Bacon DJ, Ortega Y, Gilman RH, Blazes DL. Use of PCR to improve the diagnostic yield in an outbreak of cyclosporiasis in Lima, Peru. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2008, 102: 712-717.
40. Hussein EM, El-Moamly AA, Dawoud HA, Fahmy H, El-Shal HE, Sabek NA. Real-time PCR and flow cytometry in detection of *Cyclospora* oocysts in fecal samples of symptomatic and asymptomatic pediatric patients. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 2007, 37: 151-170.
41. Lalonde LF, Gajadhar AA. Highly sensitive and specific PCR assay for reliable detection of *Cyclospora cayetanensis* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* 2008, 74: 4354-4358.
42. Murphy CS, Hoogestraat DR, SenGupta DJ, Prentice J, Chakrapani A, Cookson BT. Molecular diagnosis of Cystoisosporiasis using extended-range PCR screening. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2011, 13: 359-362.
43. Jex AR, Smith HV, Monis PT, Campbell BE, Gasser RB. *Cryptosporidium* – Biotechnological advances in detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances* 2008, 26: 304-327.
44. Hadfield SJ, Robinsos G, Elwin K, Chalmers RM. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* spp. In human clinical samples by use of Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2011, 49: 918-924. \*