

336427



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO

CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA DE QUIMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO

INCORPORADA A LA UNAM

**" PARASITOSIS EMERGENTES CAUSADAS POR
PROTOZOOS: CLÍNICA Y DIAGNÓSTICO POR EL
LABORATORIO "**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

MÓNICA WONG DE LA MORA

DIRECTOR DE TESIS:

QFB GERARDO GARCÍA CAMACHO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: QFB. Gerardo García Camacho

Vocal: M. en C. Angélica Calderón Villagomes

Secretario: QFB. Javier Araiza Santibañez

Primer Suplente: M. en C. Agustín Palma de la Cruz

Segundo suplente: M. en C. Eduardo del Rey Pineda

ASESOR

QFB. GERARDO GARCÍA CAMACHO

SUSTENTANTE

MÓNICA WONG DE LA MORA

“Les dijo: Un sembrador salió a sembrar. Y al sembrar, una parte de la semilla cayó en el camino, y las aves se la comieron.

Otra parte cayó entre las piedras, donde no había mucha tierra; esa semilla brotó...pero, el Sol la quemó.

Pero otra parte cayó en buena tierra...” (Mateo 13, 3.8)

Esta es mi tierra, Señor. Aquí he recibido tus semillas.
Algunas se han perdido entre las piedras y otras han caído
en tierra buena. Dame tu amor y tu consejo para rendir
una abundante cosecha. En ti pongo mi confianza

Quiero agradecerte Papá Dios, por que Tu has estado siempre, acompañando cada uno de mis pasos, sin importar si te invitaba o no, o si te hacía participe de ellos, hoy quiero darte las gracias por que se que esta meta y muchas otras alcanzadas solo son posibles gracias a tu amor y tus bendiciones gracias Papá Dios

A mi Mamà y mi Papa, por que ¿Qué sería yo si no tuviera su amor y su apoyo? Así incondicional, por que este trabajo es tan suyo como mío, por que tuvieron fe en mí y en ustedes mismos. Los amo, gracias a los dos

A Paty, mi mayor tesoro, por que tú eres pieza fundamental en mi diario caminar, por que eres mi ejemplo y tus consejos y Tu ayuda hoy puedes verlos reflejados en este trabajo que te dedico con todo mi amor.

A mis abuelitos, los que ya se fueron pero su vida y su sabiduría perduran hasta hoy, y para Mis abuelitas Teté y Carlota que Dios me concede la gracia de tenerlas aún a mi lado, y que siempre tienen amor para mí.

A toda la Brigada de la Facultad de Química (Ale, Arturo, Cyn, Mony, Roberto, Poncho, Gabù, Clau, a Sayra y a Will siempre apoyándome) por que aprendimos y vivimos intensamente el trabajar en equipo, juntos siempre.

A mis hermanos en Cristo, sí, a mis hermanos de Comunidad, por que en estos últimos años hemos caminado en compañía, en la misma dirección y entre unos y otros nos hemos levantado cuando ha faltado fuerza para seguir creciendo.

A mi buen consejero, al Padre Cherry, por que amorosamente me corrige y me invita a no dejar este camino de aprendizaje y de fe.

A mis maestros entrañables, que han sido mas que guías, que se han quedado plasmadas sus palabras y sus vivencias aquí en mi corazón, al maestro Benjamín Loyola, a Eduardo Marambio, a Santiago Salazar, a Javier Araiza, y a los que escapan por momentos de mi memoria.

A los miembros del Jurado por su amabilidad y el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo.

Para todos aquellos que llevo en el corazón

Para Omar, por que en todo me has apoyado, y por que tu paciencia y tenacidad lograron impulsarme a seguir adelante, a no detenerme mas que para tomar aliento nuevamente. Gracias por estar ahí y darme la mano para levantarme una y otra vez, y gracias por tu arte que gentilmente plasmaste en este trabajo.

Para mis Amigos, mis mejores amigos, los que a lo largo de mi vida han estado conmigo, viviendo y sufriendo cada etapa juntos. Para mis amigas de siempre, de la infancia y de toda la vida, Licha, Pequeña y Katia. Para mis amigos de la UNAM y de la UVM, gracias por esos momentos de estudio y de reve compartidos.

Por que cada logro alcanzado, es la suma de esfuerzos y sueños una vez pensados."

ESTE
SIGNO SIGNIFICA:
¡NEGATIVO!

ESTE SIGNO
SIGNIFICA:
¡POSITIVO!



¿ME PRESTAS
EL LAPIZ,
DOBLEBE? ?

¿Y ESTO
QUE...?

SIGNIFICA QUE
ES NECESARIO
¡SUBRAYAR SIEMPRE
LO POSITIVO!!!

Índice General

1. Resumen	Pág. 1
2. Objetivos	3
3. Introducción	
3.1 Generalidades	4
3.2 Ámbito Parasitológico	11
4. Desarrollo Clínico de las Parasitosis	
4.1 Intestinal Apicomplexa	16
4.1.1 Babesiosis	18
4.1.2 Criptosporidiosis	26
4.1.3 Ciclosporiasis	44
4.1.4 Isosporiasis	56
4.2 Microsporidiosis	66
4.2.1 <i>Encephalitozoon sp</i>	72
4.2.2 <i>Enterocytozoon sp</i>	78
4.2.3 <i>Vittaforma corneae (Nosema sp)</i>	82
4.2.4 <i>Pleistophora sp</i>	83
4.2.5 <i>Trachipleistophora sp</i>	84
4.2.6 <i>Brachiola versicularum</i>	86
4.3 Blastocistosis	98
4.4 Amibas de Vida Libre	105
4.4.1 Acanthamibiasis	109
4.4.2 Naegleriasis	119
5. Cuadros Sinópticos de las Parasitosis Emergentes	
5.1 Cuadro Sinóptico de Parásitos Emergentes	127
5.2 Cuadro Sinóptico de Parásitos Emergentes Pertencientes al <i>Phyllum Apicomplexa</i>	129

6. Métodos Diagnósticos

6.1 Generalidades	131
6.2 Métodos Diagnósticos de las parasitosis Intestinales	131
6.3 Métodos Diagnósticos para las parasitosis Extraintestinales	135
6.4 Preservación de la Muestra	137
6.5 Procesamiento de la Muestra	139
6.6 Técnicas de Tinción	148
6.7 Microscopía	172
6.8 Exámenes en Sangre	177
6.9 Detección de Antígenos	180
6.10 Diagnóstico Molecular	182

7. Discusión	190
---------------------------	-----

8. Conclusiones	193
------------------------------	-----

9. Bibliografía	196
------------------------------	-----

10. Apéndices

Apéndice A <u>CYTOSEALTM 60</u>	207
Apéndice B <u>MEDIOS DE MONTAJE ALTERNOS</u>	210
Apéndice C <u>DATOS ESTADÍSTICOS INEGI- SECRETARÍA DE SALUD</u> <u>PRINCIPALES CAUSAS DE EGRESOS HOSPITALARIOS, 2001</u>	211
Apéndice D <u>DATOS ESTADÍSTICOS INEGI-SECRETARIA DE SALUD</u> <u>PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD</u> <u>(General, Infantil y Hospitalaria) 2001</u>	212

Índice de Cuadros

Cuadro 1	
Enfermedades emergentes y reemergentes agrupadas según agente etiológico	6
Cuadro 2	
Factores que promueven la emergencia o reemergencia de las enfermedades	8
Cuadro 3	
Organismos de interés que pertenecen al Phylum Apicomplexa	16
Cuadro 4	
Especies de <i>Cryptosporidium</i> en Mamíferos	32
Cuadro 5	
Distribución de casos reportados y comentarios / Epidemiología de <i>Cyclospora</i>	46
Cuadro 6	
Consideraciones importantes en el diagnóstico de laboratorio de las infecciones por <i>Isospora belli</i>	64
Cuadro 7	
Clasificación Taxonómica para <i>Microspora</i>	66
Cuadro 8	
Especies de Microsporidios y Manifestaciones Clínicas	71
Cuadro 9	
Revisión general del paciente / Diagnóstico de la Microsporidiosis	88
Cuadro 10	
Organismos con los que los microsporidios suelen encontrarse asociados	97
Cuadro 11	
Cuadro sinóptico de Parasitosis Emergentes	127
Cuadro 12	
Cuadro sinóptico de Parasitosis Emergentes Pertenecientes al <i>Phylum Apicomplexa</i>	129
Cuadro 13	
Clasificación de Exámenes Coproparasitológicos	133
Cuadro 14	
Protozoarios Intestinales	136
Cuadro 15	
Relación de pruebas diagnósticas inmunológicas con equipos de detección rápida	181
Cuadro 16	
Pares de primers para el diagnóstico de la infección por microsporidios	186

Índice de Figuras

Babesia

Figura 1
Fotografía de un frotis de sangre de hamster teñida con Giemsa 18

Figura 2
Ciclo Biológico de *Babesia microti* 20

Figura 3
Infección por *Babesia microti*, Frotis teñidos con Giemsa 24

Cryptosporidium

Figura 4
Biopsia del duodeno tomada de un paciente con SIDA
y afectado por *Cryptosporidiosis* 27

Figura 5
Ciclo Biológico de *Cryptosporidium parvum* 28

Figura 6
Fases del Desarrollo de *Cryptosporidium parvum* 29

Figura 7
Micrografía electrónica de *Cryptosporidium* en íleon 30

Figura 8
Micrografía del parásito *Cryptosporidium parvum* genotipo I,
sobre la membrana basal del intestino delgado 34

Figura 9
Fotografía de contraste fases, de un esporozoito liberado
de un ooquiste de *Cryptosporidium* 40

Figura 10
Ooquistes de *Cryptosporidium parvum* 41

Figura 11
Ooquistes de *Cryptosporidium parvum* marcados
en un ensayo inmunofluorescente indirecto 41

Cyclospora

Figura 12.
Representación gráfica de un Ooquiste esporulado de
Cyclospora cayentansi 44

Figura 13		
Ooquiste de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	45
Figura 14		
Ooquiste de <i>Cyclospora cayetanensis</i>	50
 <i>Isospora</i>		
Figura 15		
Representación esquemática de un ooquiste de <i>Isospora belli</i>	56
Figura 16		
Ciclo Biológico de <i>Isospora belli</i>	57
Figura 17		
Fases de Desarrollo de <i>Isospora belli</i>	58
Figura 18		
Ooquiste de <i>Isospora belli</i> con 2 esporoblastos	60
Figura 19		
Ooquistes de <i>Isospora belli</i> bajo el microscopio	63
Figura 20		
Ooquistes de <i>Isospora belli</i>	65
 <i>Microsporidia</i>		
Figura 21		
Micrografía electrónica de una espora de <i>Microsporidia</i>	68
Figura 22		
Representación esquemática de una espora de <i>Microsporidia</i>	68
Figura 23		
Representación esquemática de la germinación de la espora de <i>Microsporidia</i>	69
Figura 24		
Ciclo Biológico de <i>Microsporidium spp.</i>	70
Figura 25		
Nefritis Intersticial debida a <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	74
Figura 26		
Nefritis con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	74
Figura 27		
Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> en epitelio	75

Figura 28	
Esporas de <i>Encephalitozoon hellem</i>	
teñido mediante microscopía de fluorescencia indirecta	75
Figura 29	
Fases de desarrollo de <i>Encephalitozoon intestinalis</i>	77
Figura 30	
Ciclo Biológico de <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	79
Figura 31	
Micrografía electrónica de <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	80
Figura 32	
Microfotografía electrónica de <i>Nosema connori</i>	82
Figura 33	
<i>Trachipleistophora hominis</i>	84
Figura 34	
Esporas de <i>Trachipleistophora</i>	84
Figura 35	
Micrografía electrónica de macrófagos humanos	
en cerebro infectados con <i>T. anthropophthora</i>	85
Figura 36	
Micrografía electrónica de Transmisión de una espora	
de <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	90
Figura 37	
Micrografía electrónica de Transmisión de una espora	
de <i>Encephalitozoon intestinales</i>	90
Figura 38	
A, B, C y D Micrografías electrónicas de Transmisión	
donde se encuentra a <i>Encephalitozoon intestinalis</i>	91
Figura 39	
Micrografía electrónica de una espora de <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	92
Figura 40	
A: Frotis de una muestra fecal teñida con Cromotropo 2R,	
B: Frotis de una muestra fecal teñida con la tinción rápida y caliente de	
Gram-Cromotropo que contiene esporas de <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	93
Figura 41	
Esporas de <i>Encephalitozoon intestinalis</i> teñidas con Tricromo modificado,	94
Figura 42 Identificación de <i>Encephalitozoon hellem</i> por ensayo	
inmunofluorescente con anticuerpos monoclonales	95

Blastocystis

Figura 43	
Blastocystis hominis	98
Figura 44	
Microfotografía electrónica de <i>B.hominis</i> : forma vacuolaza	99
Figura 45	
Ciclo Biológico de <i>Blastocystos hominis</i>	100
Figura 46	
Fases de desarrollo de <i>Blastocystis hominis</i>	101
Figura 47	
Forma quística vacuolada de <i>Blastocystis hominis</i>	104

Amibas de Vida Libre

Figura 48	
Ciclo Biológico para las Amibas de vida libre <i>Naegleria fowleri</i> , <i>Acanthamoeba spp</i> y <i>Balamuthia madralis</i>	108
Figura 49	
Tres grupos de <i>Acanthamoeba spp.</i>	109
Figura 50	
Trofozoito de <i>Acanthamoeba sp.p</i>	109
Figura 51	
Trofozoitos de <i>Acanthamoeba spp</i> , en Tinción Tricrómica	110
Figura 52	
Trofozoito de <i>Acanthamoeba spp.</i> de forma irregular.....	112
Figura 53	
Trofozoitos de <i>Acanthamoeba spp.</i> vistos bajo un microscopio de contraste de fases.	113
Figura 54	
Quistes de <i>Acanthamoeba spp.</i> teñidos con el método de hierro de Heidenhain	114
Figura 55	
<i>Acanthamoeba</i> ; grandes lesiones de ulceración central y necróticas en la pierna de un paciente afectado	114
Figura 56	
Trofozoito de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> en cultivo de tejido; tinción tricrómica	117

Figura 57	
Trofozoitos de <i>Balamuthia mandrillaris</i> en tejido cerebral	117
Figura 58	
Acanthamibiasis / Queratitis.	
Biopsia de córnea que muestra un trofozoito.	118
Figura 59	
Acanthamibiasis / Queratitis.	
Quiste con su forma radiada característica en un raspado de córnea	118
Figura 60	
Trofozoito de <i>Negleria fowleri</i>	119
Figura 61	
Morfología de <i>Naegleria fowleri</i> y <i>Acanthamoeba spp.</i>	120
Figura 62	
Esquema que ejemplifica la forma en la que <i>N fowleri</i> ingresa al organismo	122
Figura 63	
Esquema que indica la ruta de entrada al organismo así como las regiones donde se aloja <i>Naegleria fowleri</i>	123
Figura 64	
Trofozoito ameboide de <i>Negleria fowleri</i>	124
 Métodos Diagnósticos	
Figura 65	
Distribución de las formas parasitarias en la materia fecal de acuerdo a su consistencia	134
Figura 66	
Método PARASEP®	144
Figura 67	
Método PARASEP® / Preparación de la muestra.....	145
Figura 68	
Método PARASEP® / Emulsificación.....	145
Figura 69	
Método PARASEP® / Concentración de los Parásitos	146
Figura 70	
Método PARASEP® / Examinación	146
Figura 71	
Esquematación de la Tinción Ácido-Alcohol Resistente Modificada.	151

Figura 72	
Esquematzación de la Tinción Blanca de Calcoflúor.	165
Figura 73	
Ejemplo del espesor al realizar una preparaci3n en fresco	174
Figura 74	
Sellado adecuado de un cubreobjetos en una preparaci3n	174
Figura 75	
Observaci3n sistemática de la totalidad de la superficie del cubreobjetos	175
Figura 76	
Análisis por PCR para la identificaci3n de <i>B microti</i>	184
Figura 77	
Análisis por PCR para la identificaci3n de <i>Microsporidia</i>	189

ABREVIATURAS USADAS

CDC	Centro para el Control y Prevención las Enfermedades Infecciosas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIE	Enfermedades Infecciosas Emergentes
ELISA	Ensayo inmunoenzimático de absorción
GAE	Encefalitis Amibiana Granulomatosa
IFA	Inmunofluorescencia Indirecta (del ingles; Indirect Fluorescent antibody test)
IgA	Inmunoglobulina tipo A
MAP	Meningoencefalitis Amibiana Primaria
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
USEPA	Agencia de Protección al Ambiente
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

1. RESUMEN

Hablar hoy de las enfermedades y de su emergencia, puede introducirnos en un fascinante viaje al pasado y a la historia del hombre desde que posee la cronología de su existencia. Es por mucho un tema vasto y complejo, en el que participan un sin número de factores que como piezas sueltas van dando forma a un rompecabezas de la vida natural y al género humano. Ha sido la experiencia y la observación, lo que en principio ayudaron al hombre a identificar que podía padecer ciertos "males" que llamó enfermedades y más tarde infecciones, y con ese conocimiento empírico fue clasificando a las mismas, las causas que las originan, y las consecuencias que producían entre ellos. En la actualidad se necesita de la participación de muchas ramas de la ciencia para poder entender la interrelación de todo lo que participa en una enfermedad, podemos acudir desde luego a un Médico, a un Biólogo, a un Químico, a un Médico Veterinario, por mencionar solo algunos, pero entender hoy un padecimiento involucra muchas manos, muchos ojos y muchas cabezas, que ayuden a determinar la compleja relación entre el o los factores que producen una enfermedad y sus consecuencias.

Las **enfermedades emergentes** son padecimientos infecciosos de elevada incidencia en las últimas dos décadas. Estas se identifican con diversas etiologías; priónica, viral, bacteriana, micótica o **parasitaria**; actuando en diferentes poblaciones de riesgo, con diferentes vías de transmisión y epidemiología.

En la actualidad las enfermedades parasitarias han mostrado un notable aumento de incidencia entre distintas poblaciones. El fenómeno de emergencia de estas infecciones se ha ligado a cambios ecológicos que han provocado la transformación de ecosistemas y esto aunado a la producción de bienes, servicios y alimentos para la compleja sobrepoblación mundial, han afectado la salud pública en todos los rincones de la tierra. Así mismo los hábitos del hombre han favorecido nuevas condiciones patológicas y biológicas que predisponen al oportunismo.

Con frecuencia ante un proceso intestinal más o menos rebelde, el médico suele solicitar simplemente "estudio de parásitos", sin más indicaciones u orientación hacia sus sospechas. Tampoco se suele advertir al paciente, de la necesidad de ir previamente al

laboratorio, para que le sea suministrado el material necesario para una correcta obtención y conservación de la muestra. Lo anterior suele explicar el porque de muchos resultados falsamente negativos. En este sentido y en línea con las actuales necesidades se observa que dentro del campo de la Parasitología es indispensable un **análisis de laboratorio** riguroso de las muestras para su correcto diagnóstico.

Es imprescindible el desarrollo de estrategias de prevención y control de las enfermedades emergentes (parasitosis, micosis, virosis, etc.), por medio de intervenciones eficaces basadas en investigaciones practicas y realistas que deben ser estudiadas desde distintos ámbitos.

En el ámbito del laboratorio clínico, cotidianamente el analista se encuentra ante la dificultad de diagnosticar y precisar adecuadamente el agente etiológico que origina el padecimiento a elucidar y ello se debe en gran medida a que no cuenta con la información, ni con los materiales y métodos más adecuados que le permitan implementar un eficiente diagnóstico clínico. La ciencia y la tecnología han desarrollado en las últimas dos décadas, procedimientos innovadores para el estudio de estos parásitos, sin embargo esta información, es poco accesible y suele estar fuera del alcance de la mayoría. Las estadísticas a nivel mundial, muestran el incremento de las enfermedades parasitarias emergentes. México, como muchos países en desarrollo es un "paraíso" para la proliferación de éstos gérmenes De ahí que surge la imperiosa necesidad de contar con un manual clínico y de diagnóstico por el laboratorio actualizado y que proporcione clara y detalladamente, más de un método de análisis en la búsqueda de parásitos emergentes.

El presente trabajo se ocupa sólo de un pequeño, pero no menos importante nicho del problema; **microorganismos parasitarios**. El tema central desarrollado se avoca a 8 agentes de enfermedades infecciosas que están consideradas como parasitosis emergentes y que son de particular importancia en nuestro país. El presente trabajo pretende ser una guía práctica que describa la **información, materiales y métodos de análisis de laboratorio** necesarios que le permitan identificar dichas parasitosis.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Proponer una guía práctica sobre distintos métodos de análisis por el laboratorio para lograr el diagnóstico de distintas parasitosis causadas por protozoarios y que están consideradas en la actualidad como padecimientos emergentes o reemergentes, dirigido al sector salud, en específico a los técnicos, químicos y personal de laboratorio clínico de las distintas dependencias de salud pública y privada. Esto con el propósito de evitar diagnósticos erróneos que no permitan detectar el agente causal de un padecimiento y prolonguen un cuadro de enfermedad.

Objetivos Particulares

- a) Dar a conocer la importancia que presentan las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios en las últimas dos décadas, así como su incidencia y prevalencia en aumento en los últimos años.
- b) Dar a conocer los aspectos particulares de cada una de estas parasitosis afín de comprender mejor la clínica y los cuadros críticos que se presentan, ya que serán fundamentales para dirigirse a la mejor técnica de diagnóstico que ponga de manifiesto la presencia del parásito.
- c) Brindar diferentes técnicas de diagnóstico que le permitan al encargado de la realización de los estudios por el laboratorio, elegir el método más adecuado de acuerdo con las propias capacidades de instrumentación y personal que cuente en el laboratorio en cuestión.

INTRODUCCIÓN

3.1 GENERALIDADES

Las enfermedades infecciosas han afectado al género humano desde los comienzos de la civilización. Desde sus inicios el hombre padeció las mismas enfermedades que los primates en las áreas tropicales y con el tiempo aprendió que al alejarse de dichas zonas y al estar bajo otras condiciones climáticas fue menos susceptible de padecer las infecciones antes contraídas.⁽¹⁾

Más tarde la agricultura fue la fuente fundamental del alimento del hombre, y con el desarrollo de la misma fueron estableciéndose poblaciones que al incrementarse trajeron determinados hábitos que influyeron en la diseminación de los microorganismos infecciosos, a través de un contagio directo de individuo a individuo. Con este advenimiento, los seres humanos se convirtieron en reservorios de diversos agentes que permanecieron y evolucionaron de tal suerte que tanto animales, agua y alimentos contaminados se identificaron como potenciales fuentes de infección.

El Progreso y la civilización se tradujeron en una intensa diseminación de enfermedades infecciosas. Las caravanas de comerciantes, los exploradores y los conquistadores, trajeron consigo patógenos antes desconocidos al nuevo mundo. Surgieron así las primeras epidemias de plaga, viruela, tifoidea etc. que alteraron en más de una ocasión el curso de la historia.⁽²⁾

El conocimiento del control de estos padecimientos fue posible gracias a los trabajos de Robert Koch y Luis Pasteur con el estudio de las enfermedades y sus agentes causales. Con los primeros destellos del estudio científico de las observaciones que realizaron y con los primeros instrumentos y técnicas de estudio, fue posible aislar e identificar los agentes etiológicos de distintos padecimientos. Así también se identificaron los ciclos biológicos, la epidemiología y la historia natural de cada agente fueron descritas con el paso de muchas décadas, y con todo ello se lograron mantener y controlar estas enfermedades en el ser humano. Más tarde comenzaron a desarrollarse las medidas preventivas que contribuyeran al control de las enfermedades, por ejemplo el tratamiento del agua, campañas de reducción en la población de roedores y el control de otros vectores.

Al inicio del siglo XX, los principios de vacunación se establecieron de manera empírica por Edward Jenner, y más de 100 años después estas teorías comenzaron a dar frutos. Los antibióticos fueron descubiertos y muchos desinfectantes fueron desarrollados. Todas estos avances lograron un decremento importante en la incidencia y prevalencia de muchas afecciones producidas por diversos microorganismos.

La eliminación de la viruela en 1977, constituyó un invaluable logro en la lucha contra las infecciones y padecimientos. Sin embargo, muchas afecciones han persistido con una marcada habilidad para re-surgir después de largos períodos de absoluto o mediano control.

La década pasada ha sido la más azarosa en la larga historia de las enfermedades infecciosas. Hay múltiples indicadores de esos casos y del ritmo con que ha crecido nuestro conocimiento. El número de las publicaciones pertinentes indica un crecimiento explosivo de dichas enfermedades.

Las personas que viven en climas tropicales continúan siendo tan vulnerables a diversas infecciones como lo fueron sus primeros ancestros. Por ejemplo, cada año más de un millón de niños mueren de malaria en el África.

En América Latina el Cólera resurgió como enfermedad infecciosa, después de haberse mostrado casi ausente desde hace 90 años, hasta que fue reintroducida al Perú en el año de 1991. A partir de ese momento más de un millón de casos de cólera fueron reportados en no menos de 20 países de la región.

Brotos recientes subrayan las potentes y repentinas apariciones de infecciones en grupos humanos que normalmente no eran afectados. En los Estados Unidos, una contaminación del agua municipal en el Estado de Milwaukee, Wisconsin, en 1993, resultó en un brote de Cryptosporidiosis que afectó acerca de cuatrocientas mil personas, de las cuales aproximadamente cerca de 4,400 requirieron hospitalización.⁽³⁾

Nuevas enfermedades infecciosas, regularmente con un impacto en la salud pública poco estudiado o prácticamente desconocidos, continúan apareciendo. Nuevos agentes

etiológicos van siendo identificados gracias al desarrollo tecnológico que permite aislar e identificar microorganismos que no pueden ser cultivados.

ENFERMEDADES EMERGENTES.

Pero ¿Qué es una enfermedad emergente?.

La Organización Panamericana de la Salud define "**enfermedades emergentes**" como aquellas enfermedades infecciosas cuya incidencia ha aumentado en las últimas dos décadas. Se identifican con diversas etiologías: priónica, viral, bacteriana, micótica o parasitaria; en diferentes poblaciones de riesgo, con diferentes vías de transmisión, historia natural y eco-epidemiología. Como "**reemergentes**", figuran aquellas afecciones infecciosas conocidas que reaparecen después de una disminución significativa de su incidencia" ⁽⁴⁾

Cuadro 1. Enfermedades emergentes y reemergentes agrupadas según agente etiológico ⁽⁵⁻⁷⁾

Virales	Bacterianas	Parasitarias	Micóticas
Arenavirrosis ** Dengue EEB/CJ *** Fiebre amarilla Fiebre del valle del Rift Fiebre Ebola Hantavirrosis Hepatitis C Rotavirrosis Sida	Cólera Cólera (O139) Difteria Enfermedad de Lyme Enfermedades por resistencia antibiótica Fascitis necrotizante Legionelosis Peste Síndrome urémico hemolítico Tuberculosis	Blastocistosis Criptosporidiasis Ciclosporiasis Isosporiasis Leishmaniasis Microsporidiasis Paludismo resistente Pediculosis Sarna Toxoplasmosis	Aspergilosis Candidiasis Criptococosis Feohifomicosis Hialohifomicosis Histoplasmosis Pneumocistosis Zigomicosis

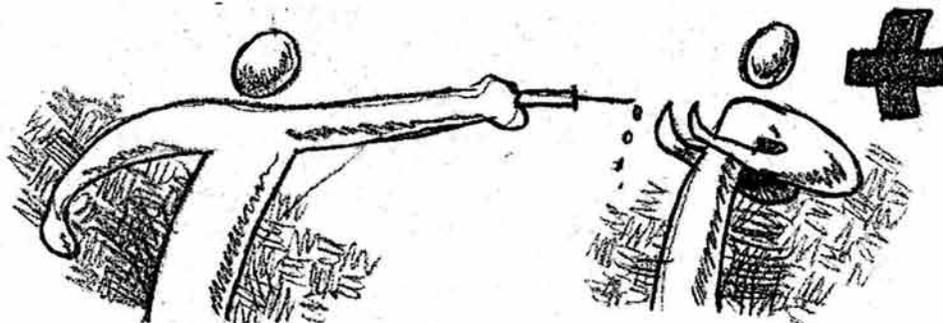
** Virus Junín Guanarito Sabiá Machupo Lassa. *** Encefalopatía espongiforme bovina/Creutzfeld Jacob.

¿Qué promueve la incidencia de estos resurgimientos?

Muchos factores contribuyen a estos numerosos y cada vez más frecuentes brotes epidémicos. En vastas regiones de Latinoamérica por ejemplo, las inversiones en salud pública han ido reduciéndose y empobreciéndose año con año, como consecuencia de las recesiones económicas y los cortos presupuestos del sector público destinados a la salud de sus poblaciones. La sobrepoblación que afecta a países en desarrollo trae como resultado condiciones de vivienda inadecuadas, de hacinamiento, con insuficientes o incluso inexistentes medidas sanitarias, y al mismo tiempo las presiones comerciales han orillado a una invasión por parte de nuevas poblaciones hacia lugares endémicos de nuevos agentes y portadores de infección.

Los factores responsables incluyen cambios ecológicos, como los que se producen a causa del desarrollo económico o agrícola, o anomalías climáticas ⁽⁸⁾; cambios demográficos y comportamiento humanos; transporte y comercio; tecnología e industria; adaptación y cambio de los microbios; y fracaso de las medidas de salud pública. En la actualidad los reportes e informes médicos toman importancia y estudian las enfermedades infecciosas de acuerdo a los factores que están relacionados con su emergencia.

Cuando se estudian las EIE, muchos distinguen entre una multitud de fenómenos que está directamente relacionada con acciones humanas—desde técnicas de laboratorio mejoradas y descubrimiento científico hasta "desarrollo" económico, el calentamiento global, y las deficiencias en la salud pública—y otro grupo de fenómenos, mucho menos frecuente, relacionado con cambios de los microbios mismos. El estudio detallado de las mutaciones microbiales suele mostrar, otra vez, que las acciones humanas han desempeñado un importante papel en la ampliación de la patogenicidad o el incremento de la resistencia a agentes antimicrobianos.



Cuadro 2 ⁽⁹⁾

FACTORES QUE PROMUEVEN LA EMERGENCIA O REEMERGENCIA DE LAS ENFERMEDADES
* Cambios ecológicos y climáticos
* Sobrepopulación y cambios demográficos y de migración entre los pueblos
* Comportamiento humano; <ul style="list-style-type: none">- guerras y conflictos civiles- decadencia urbana- hábitos sexuales uso de drogas intravenosas
* Comercio internacional <ul style="list-style-type: none">- Movimiento de mercancías y personas a través del todo el mundo
* Industria y Tecnología <ul style="list-style-type: none">- Globalización de los suministros de comida
* Transplante de órganos y tejidos <ul style="list-style-type: none">- Fármacos asociados a transfusiones que promueven la inmunosupresión
* Uso inmoderado de antibióticos
* Adaptación y evolución de los microorganismos y su resistencia ante los antibióticos.
* Deterioro de las medidas de salud pública <ul style="list-style-type: none">- Reducción de presupuestos para programas de prevención y control de vectores, e inadecuadas medidas de sanidad.

¿Tiene alguna implicación de tipo social o racial, el fenómeno de las enfermedades emergentes?

Tanto en ciudades de países desarrollados y subdesarrollados como por ejemplo Harlem en Estados Unidos y Bangladesh en la India se reportan datos que indican que las principales causas de mortalidad son las enfermedades infecciosas y la violencia. ⁽¹⁰⁾

El estudio de todo fenómeno emergente suele ser dinámico. Sin embargo, en poblaciones heterogéneas, el propio concepto de emergencia plantea problemas de análisis que rara vez son enfrentados. No todas las teorías sobre la producción social de las enfermedades son igualmente sensitivas a la importancia del grado en que la posición económica y social—la desigualdad—influye en el riesgo de infección. ⁽¹¹⁾ Es evidente que existen

grupos de personas que se ven más expuestas a contraer una enfermedad infecciosa, gracias a una serie de factores que ya hemos mencionado, y también a la marginación social y económica que sufren estas personas. México se encuentra en la línea media entre los países desarrollados y los que están subdesarrollados, pero igualmente presenta cifras que deberían llamar más la atención de las autoridades de salud y de la población en general. Según el informe realizado por parte de la Secretaría de Salud del año 2001, las enfermedades infecciosas intestinales ocupan el decimo quinto lugar como causas de mortalidad general, y al mismo tiempo ocupan el cuarto lugar de causa de mortalidad infantil. (Véase apéndice C)

Para entender la complejidad de las preguntas—médicas, sociales, y de comunicación—asociadas a la emergencia de una enfermedad de la vista pública, podemos considerar como ejemplo el SIDA. A comienzos de la década de los 80, funcionarios de salud informaron al público que el SIDA había emergido probablemente de Haití. Aunque esto resultó equivocado, el daño provocado a la industria turística entre otras, ya se había hecho, como resultado se agudizaron los problemas de pobreza, desigualdad, vulnerabilidad a las enfermedades, en ese país y en todo aquel que se dijera tener algún vínculo con aquella nación y obstaculizó los esfuerzos para brindarles servicios de salud pública.⁽¹²⁾

Desde entonces, la enfermedad provocada por el VIH ha sido la infección más estudiada en la historia de la humanidad. Sin embargo, algunas preguntas han recibido más atención que otras. Tampoco han sido bien estudiadas las consideraciones sobre la dinámica de la gran epidemia. El SIDA ha sido una epidemia de sorprendente regularidad. Pese a que las advertencias de las autoridades de salud pública insistan en que "el SIDA es para todos," es evidente que algunos corren más riesgo de ser infectados con el VIH que otros. Buena parte de la propagación del VIH en los 70 y 80 ocurrió a lo largo de "líneas de defecto" internacionales, definidas por las abruptas pendientes de la desigualdad, las cuales son también caminos del trabajo de inmigrantes y del comercio del sexo.⁽¹³⁾

Además, aunque el SIDA ocasiona la muerte a casi todos los infectados con el VIH, el curso de la enfermedad varía, lo que ha dado lugar a la búsqueda de centenares de otros factores contribuyentes, desde *Mycoplasma* y lesiones genitales ulceradas, hasta ritos

vudú y predisposición psicológica. Asociados a pacientes infectados con VIH, se han reportado numerosos cuadros diarreicos en los cuales se han identificado a agentes como ***Cryptosporidium*** y ***Microsporidia*** (*Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon hellem*, y *Encephalitozoon* [forma *Septata*] *intestinalis*).⁽¹⁴⁾

Sin embargo, ninguna conexión ha podido explicar de manera convincente las disparidades en la distribución o en el resultado de la enfermedad causada por el VIH. Los únicos factores combinados que han sido bien demostrados son las desigualdades sociales, que han estructurado no solo los contornos de la epidemia del SIDA, sino también el curso de la enfermedad desde el momento que el paciente es infectado.

En Junio de 1995 la Organización Panamericana de la Salud realizó un congreso con expertos internacionales para discutir estrategias para la prevención y el control de estas enfermedades. Y como resultado de dicha reunión se preparó un Plan de Acción Regional que fuera capaz de proveer a los países que integran dicha organización, una guía de estrategias para la detección, identificación, respuesta y control ante nuevos brotes de enfermedades infecciosas de carácter emergente o reemergente.

En los países de primer mundo estos esfuerzos van de la mano con el avance científico y tecnológico que caracteriza a estas naciones. Pero en países como el nuestro en vías de desarrollo y en muchos otros que aún se consideran subdesarrollados, los esfuerzos por enfrentar la problemática de las enfermedades emergentes deben ser constantes. Necesitamos sistemas articulados y multidisciplinarios; los médicos y el personal de distintas instituciones del sector salud necesitan trabajar en conjunta colaboración; así mismo los responsables de los programas de medicina pública necesitan la pronta participación de médicos veterinarios que son un eslabón fundamental en la comprensión de la ecología y biología tanto de los vectores como de agentes zooticos de enfermedades infecciosas, que ofrezcan técnicas epidemiológicas y de detección modernas en diferentes sectores de salud que permitan una **rápida identificación** de las enfermedades que emergen o reemergen con gran voracidad. Se necesitan programas dirigidos a médicos y a los profesionales de los laboratorios clínicos; (con equipos, técnicas actualizados y personal bien capacitado) para integrar un buen sistema de vigilancia sanitaria al respecto.

3.2 ÁMBITO PARASITOLÓGICO

La **parasitología** es la "ciencia que trata de la coexistencia de organismos heteroespecíficos o de la relación (simbiosis) hospedador-parásito". Ciencia que estudia el parasitismo y los **parásitos** desde diversos puntos de vista. ⁽¹⁵⁾

Esta definición se aplica en un sentido general a grupos de organismos como bacterias, hongos, virus, espiroquetas, entre otros; Sin embargo como hoy entendemos a la Parasitología, es la rama de la medicina que se avoca al estudio de los Protistas, Helmintos y Artrópodos entre otros, que viven en humanos, plantas y animales. Es por todo ello que surgen las disciplinas afines a Ella y que podemos entonces dividir por grupos en:

- Protozoología
- Helmintología
- Nematología agrícola
- Entomología médica
- Malacología médica
- Acarología médica y otras.

En los últimos 20 años este avance ha sido vertiginoso en todas sus ramas, lo que ha generado un cúmulo de información que necesita clasificarse adecuadamente para poder así sacarle un mejor provecho.

Por otro lado existen diferentes asociaciones entre el huésped y parásito, a continuación se mencionan algunas de ellas con su significado: ⁽¹⁵⁾

- *Comensalismo*: Uno de los seres vivos funciona como huésped sin recibir ni perjuicio ni beneficio, mientras que el otro asociado se procura casa y sustento del huésped.
- *Simbiosis*: ambos organismos reciben beneficio y existe una dependencia forzosa y necesaria para la supervivencia mutua.
- *Parasitismo*: asociación en la que un organismo deriva todo el beneficio de la asociación para sí y además le causa daño al huésped.

De las asociaciones anteriormente citadas podemos ver que no todos los parásitos son causa de enfermedad. Aquellos que si lo hacen son considerados **patógenos**, y la severidad de los síntomas que produzca dependerá de la **virulencia** del mismo o de ciertas condiciones del propio huésped. Como ejemplo tenemos a *Cryptosporidium* y *Enterocytozoon*, parásitos que en un principio fueron encontrados en pacientes inmunodeficientes ya que en ellos se amplificaba su sintomatología, después de estos primeros estudios se encontró que también afecta a huéspedes inmuno-competentes pero que difícilmente presentaban signos de infección, se comprendió entonces que estos parásitos han acompañado al hombre en su historia, pero por los pequeños o imperceptibles signos mostrados se desconocía su patogenicidad, ahora estos parásitos son considerados emergentes y algunos autores los consideran parásitos de nuevo reconocimiento.

PARASITOSIS Y ENFERMEDADES ASOCIADAS

EPIDEMIA MUNDIAL: EL SIDA

La actual epidemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) recalca la imperiosa necesidad de tener un mejor conocimiento de las infecciones parasitarias, diagnósticos más adecuados y una constante vigilancia de patógenos que normalmente no esperamos encontrar en humanos pero que ante las condiciones de supresión inmunológica que conlleva esta enfermedad los hace susceptibles de infección. Como ejemplo de lo anterior tenemos el caso de las especies de *Microspora* y *Apicomplexa* que en la última década se presentó en pacientes inmuno-comprometidos en su gran mayoría y también en inmuno-competentes.

Sin embargo existen otros padecimientos como la hipogammaglobulinemia y la achlorhydria, que igualmente debilitan el sistema inmune del hombre.

Entre otras importantes causas que predisponen a una infección por parásitos oportunistas encontramos; efectos cito-tóxicos de radiaciones, terapias prolongadas con corticoesteroides, fármacos usados ante un transplante de órganos.

La malnutrición puede, aunado a estos factores, determinar la severidad de las infecciones.

Factores raciales también se ven involucrados en la predisposición de estos padecimientos, tal es el caso de los africanos quienes muestran un decremento en su cuenta total de células T y T-cooperador proporcionales a su edad, y que los hace vulnerables a adquirir mayor cantidad de enfermedades.

Cierto es que los hábitos que va adquiriendo el género humano lo predisponen a adquirir ciertas patologías, ejemplo de ello son los homosexuales en los cuales se ha reportado que en aquellos que practiquen sexo oral-anal, presentan mayormente infecciones provocadas por *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Enterocytozoon bieneusi* y otros microorganismos no patógenos.

En pacientes con SIDA es común desarrollar infecciones oportunistas provocadas por parásitos con organismos que son selectivos a cierta deficiencia de linfocitos CD4⁺. Entre estos podemos mencionar: Apicomplexa (*Cryptosporidium*, *Isospora*, *Toxoplasma*, y *Cyclospora*), y Microspora (*Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Vittaforma*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*, etc)

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

El diagnóstico de parásitos es complicado. La identificación de estos organismos requiere un alto grado de entrenamiento por parte del personal que labora en los laboratorios, ya que tiene que estar familiarizado con los métodos de análisis y porque debe estar en constante actualización médica.

La tecnología ha permitido el avance de técnicas diagnósticas; estudios por imágenes como tomografías por computadora, ultrasonido, y endoscopias entre otros permiten diagnosticar padecimientos como la cisticercosis, y la fasciolosis. Estas técnicas permiten la visualización no solo de las lesiones propias del padecimiento, sino que también permiten la identificación del parásito.

Por otro lado están las determinaciones directas, como el estudio de las heces en donde se pone de manifiesto la presencia o ausencia del parásito de interés, o de otros organismos.

Las pruebas serológicas nos indican la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito en estudio, más NO nos constatan el curso de la infección. Las pruebas serológicas están indicadas en infecciones en donde el parásito se localiza en tejidos o cuando se sabe que es muy difícil acceder a una determinación por observación directa. Las nuevas y recientes técnicas de análisis con DNA aún no están lo suficientemente desarrolladas, ni son muchas las personas que tienen el suficiente conocimiento para su aplicación, pero debemos decir que su especificidad es notable y que es hacia donde se inclina el desarrollo en materia de diagnósticos parasitológicos. Sin embargo estas metodologías son costosas y se necesita de mucha infraestructura.

PREVALENCIA PARASITOLÓGICA

En nuestro país, las afecciones intestinales que son objeto de consulta, las cuales incluyen alguno de los padecimientos aquí mencionados; representan un gasto económico considerable para el Estado y para las familias de los afectados; Ya que están considerados entre las principales causas de mortalidad en nuestro país, así lo ha reportado la propia Secretaría de Salud en su informe del año 2001, donde se consideran entre las primeras 20 causas de mortalidad y de egresos hospitalarios de ese mismo año.

Los **helminths** y los **protozoos** constituyen dos de los grupos de mayor incidencia en enfermedades oportunistas emergentes.⁽¹⁶⁾ El presente trabajo se avocará al segundo.

De las parasitosis emergentes que a continuación se mencionan solo estudiaremos las parasitosis que por diversas causas no se ha hecho hasta el día de hoy un trabajo que recopile la información necesaria en cuanto a la clínica y a la metodología diagnóstica de

las mismas; las parasitosis que observamos marcadas con asterisco como es el caso de *Balantidium coli* y *Giardia lamblia* quedan fuera de esta revisión.

- BABEIOSIS
- BALANTIDIOSIS *
- BLASTOCISTOSIS
- CRIPTOSPORIDIOSIS
- CYCLOSPORIOSIS
- GIARDIASIS *
- ISOSPORIASIS
- MICROSPORIDIOSIS
- NAEGLERIASIS y ACANTAMIBIASIS

Los parásitos responsables de las infecciones anteriormente señalados los podemos agrupar de acuerdo a su propia clasificación como sigue. ^(15, 17)

<i>PHYLLUM</i>	<i>GÉNERO</i>
* <i>Apicomplexa</i>	<i>Babesia, Cryptosporidium, Cyclospora, Isospora</i>
* <i>Ciliophora</i>	<i>Balantidium</i>
* <i>Microspora</i>	<i>Encephalitozoon, Enterocytozoon, Vittaforma, Nosema, Plestophora y Trachipleistophora</i>
* <i>Sarcomastigophora</i>	<i>Blastocystis, Giardia</i>
* <i>Sarcomastigophora</i>	<i>Acanthamoeba, Naegleria, Balamuthia</i> (Amibas de Vida Libre)

Y del modo en como están agrupados, será el estudio y descripción que de ellos se haga en el presenta trabajo, así como las técnicas de laboratorio que permitan el diagnóstico de las mismas.

4. DESARROLLO CLÍNICO DE LAS PARASITOSIS

4.1 Intestinal Apicomplexa

Existen numerosos microorganismos parásitos que presentan una característica muy particular y definida, que permite agruparlos y clasificarlos dentro de un Phylum que se creó en exclusiva para ellos, el Phylum **APICOMPLEXA**; lo que los distingue es el complejo apical, que es un complejo que se localiza en la parte anterior del cuerpo y está presente en uno o más estadios de organismo en su ciclo de vida. Su función principal es sujetarse y proveerse de una ruta de entrada a la célula huésped. Todos los organismos colocados dentro del Phylum Apicomplexa son parásitos intracelulares en algún punto de su ciclo celular. ⁽¹⁸⁾

Los parásitos que pertenecen a él presentan una amplia distribución entre animales y humanos, y en cuanto a la mortalidad y morbilidad que producen puede encontrarse numerosos casos reportados.

A continuación se presenta un cuadro con los organismos que integran este grupo.

Cuadro 3 ⁽¹⁸⁾

Phylum: Apicomplexa
Clase: Coccidia
Orden: Eucoccidia
Familia: Cryptosporidiidae
Género: <i>Cryptosporidium</i>
Familia: eimeriidae
Géneros: <i>Isospora</i> y <i>Cyclospora</i>
Familia: Sarcocystidae
Géneros: <i>Sarcocystis</i> y <i>Toxoplasma</i>
Familia: Plasmodiidae
Género: <i>Plasmodium</i>
Orden: Piroplasmidia
Familia: Babesiidae
Géneros: <i>Babesia</i> y <i>Entoplozoides</i>

No todas las especies que se incluyen en el cuadro son causantes de parasitosis emergentes, únicamente las que se encuentran subrayadas, y sobre ellas tratará este capítulo.

Generalidades

Todos los apicomplexos poseen estados de reproducción tanto femeninos como masculinos y pueden reproducirse de manera sexual o asexual de manera alterna entre una y otra generación en uno o dos huéspedes.

La reproducción asexual se conoce como **esquizogonia** proceso por el cual el núcleo del trofozoito intracelular se divide cierto número de veces y a un determinado tiempo, después del cual cada núcleo adquiere una pequeña porción de citoplasma para formar un organismo independiente, el merozoito. Los merozoitos son liberados después de la ruptura celular y entran a otras células para repetir dicho ciclo.

La reproducción sexual o **esporogonia** involucra la producción de dos formas sexuadas que se desarrollan de merozoitos, conocidas como microgametocitos y macrogametocitos, o masculino y femenino, respectivamente. Estas formas sexuadas se unen para producir un cigoto que se desarrolla posteriormente en un ooquiste, y finalmente en los estados infectivos conocidos como esporozoitos.⁽¹¹⁾ Los esporozoitos pueden permanecer en los ooquistes como la mayoría de las especies intestinales, o pueden ser liberados de los ooquistes para ser inoculados como vectores biológicos dentro de el próximo huésped como en los parásitos de la malaria.

Este esquema general de ciclo celular presenta variaciones que se van aplicando a cada especie. Estas variaciones incluyen el número y tipos de huéspedes en donde las especies se desarrollan, el tipo de célula donde ellos crecen y la presencia o ausencia de algunos estados en el ciclo de vida.⁽¹⁸⁾

4.1.2 BABESIOSIS

Babesia spp

Introducción

La Babesiosis es producida por un hemoparásito del género *Babesia*. A pesar de que más de 100 especies han sido reportadas, sólo unas cuantas se han identificado como causantes de infectar al humano. *Babesia microti* y *Babesia divergens* han sido identificadas en la mayoría de los padecimientos humanos, pero algunas variantes han sido reportadas en los últimos años. Poco se sabe acerca de la ocurrencia de las especies de *Babesia* en las áreas endémicas de malaria donde *Babesia* puede fácilmente ser erróneamente "diagnosticada" como *Plasmodium*.⁽¹⁹⁻²¹⁾

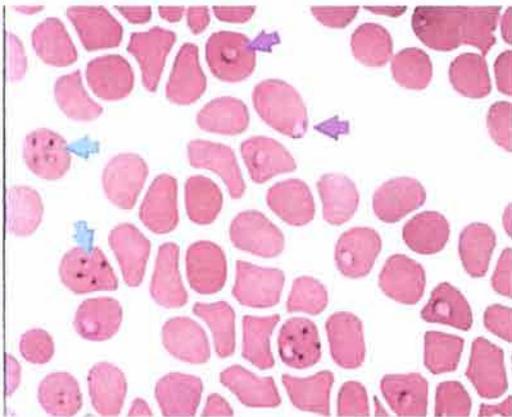


Figura 1. ⁽²²⁾

(a) Fotografía de un frotis de sangre de hamster teñida con Giemsa que muestra las células sanguíneas infectadas con el más reciente e identificado aislado de *Babesia WAI*.⁽²²⁾

Nótese la forma tétrada del parásito; la forma con la cual se identifica a *Babesia* y se le distingue de infecciones de malaria diagnosticadas igualmente mediante frotis sanguíneos y teñidos. Ambas formas del parásito pueden observarse; formas anilladas (flechas moradas) y formas tétradas (flechas azules).⁽²²⁾

La Babesiosis es una parasitosis transmitida por un artrópodo como la garrapata y que provoca síntomas como los de la Malaria y la Anemia Hemolítica.

Pacientes de edad avanzada o inmunocomprometidos, se encuentran en un alto riesgo de adquirir la enfermedad con severidad; sin embargo la Babesiosis también puede ser seria en pacientes con un estado inmunológico normal.

La Babesiosis esta considerada como una enfermedad emergente y un problema de salud publica en los Estados Unidos de Norte América, con reportes de alta incidencia de este padecimiento y en algunos casos fatales en áreas donde el riesgo a la infección no había sido identificado previamente.

Hasta hace poco, las infecciones por *Babesia* en humanos en este país se han atribuido a *Babesia microti*, parásito proveniente de roedores. Sin embargo los últimos reportes sugieren que la Babesiosis humana en Norte América puede ser causada por parásitos de *Babesia* que son antigénica y genotípicamente distintos de *Babesia microti*. (22-24)

Clasificación Taxonómica

- **Phillum** ; Apicomplexa
- **Orden**; Eucoccidia
- **Familia**; Babesiidae
- **Género**; *Babesia microti*

Morfología

- Parásito intra-eritrocítico
- .Organismos pleomórficos, algunos en forma de anillos (0.9-2.2 μm), y otros de forma tétrada. (25)

Ciclo Biológico de *Babesia microti*

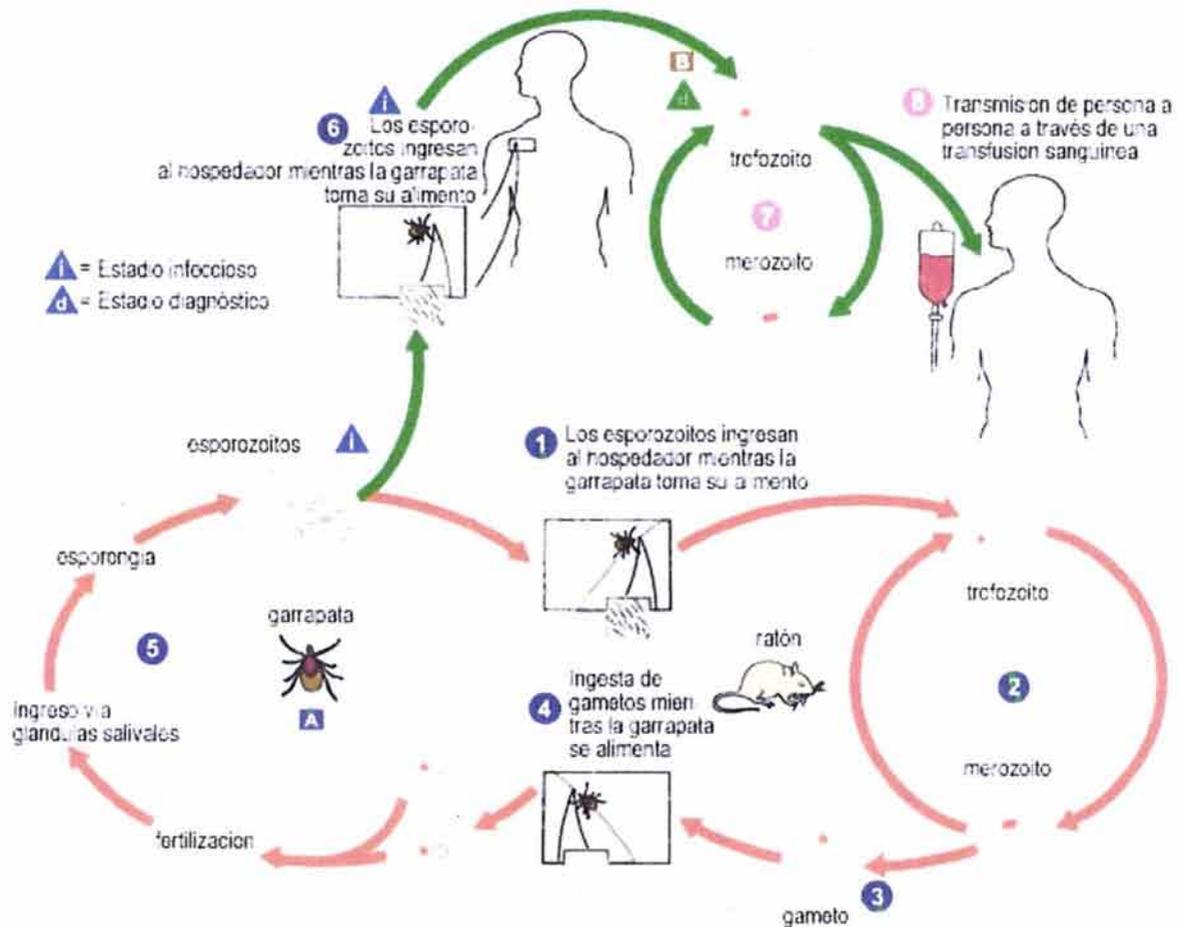


Figura 2 (22)

El ciclo celular de *Babesia microti* involucra a dos hospederos, entre los cuales están el roedor, primordialmente el ratón blanco (*Peromyscus leucopus*) y la garrapata. Durante un almuerzo de sangre, la garrapata o ácaro infectado con *Babesia*, introduce esporozoitos al interior del ratón ①. Los esporozoitos alcanzan los eritrocitos y se desarrollan en el interior de manera asexual ②. En la sangre, algunos parásitos logran diferenciarse en gametos, masculino y femenino aunque estos no pueden ser distinguidos a la luz del microscopio óptico. ③. El hospedero definitivo es la garrapata o ácaro, en particular la garrapata del ciervo, *Ixodes dammini* (*I. scapularis*). Una vez ingeridos por el ácaro apropiado ④, los gametos se unen y experimentan un ciclo esporogónico que resulta en la formación de esporozoitos ⑤. La transmisión transovarica también conocida como vertical o hereditaria, ha sido documentada para una gran número de especies de *Babesia*, pero no para la pequeña como *B. microti* A.

El humano ingresa al ciclo cuando es mordido por un ácaro infectado. Durante la hemofagia, el ácaro infectado introduce los esporozoitos en el nuevo huésped **6**. Los esporozoitos entran a los eritrocitos **B** y sufren una reproducción asexual **7**. La multiplicación en la sangre de los estadios del parásito son los responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. El humano es para fines prácticos el hospedador final del parásito. Sin embargo no podemos descartar la transmisión de persona a persona mediante una transfusión sanguínea que como bien sabemos llega a ser algo frecuente y común. **8**. ⁽²²⁾

Nota: El ciervo es el hospedador del cual la garrapata adulta se alimenta, así que de manera indirecta puede considerársele dentro del ciclo biológico de *Babesia*. Cuando aumenta la población de ciervos, de igual forma aumenta la población de garrapatas intensificando el potencial de transmisión para *Babesia*.

Hospederos definitivos ⁽²⁵⁾

- *Peromyscus leucopus*, Ratón blanco
- *Microtus pennsylvanicus*, Ratón de campo
- Humanos
- Mandriles, macacos, monos capuchinos, titís (experimentalmente infectados).
- Hamsters (experimentalmente infectados)
- Caballos, perros y ciervos muestran resistencia a curar después de una infección.

Hospederos intermediarios (vectores) ⁽²⁵⁾

- *Ixodes scapularis*, garrapata

Distribución Geográfica y Epidemiología

Mundial, pero poco se sabe acerca de la prevalencia de *Babesia* en los países endémicos para Malaria, donde fácilmente se puede confundir y asociarse la afección a *Plasmodium* en lugar de *Babesia*. En Europa, la mayoría de los casos se deben a *B divergens* y ocurren en pacientes esplenectomizados. En Norte América *B microti* es el agente más frecuentemente identificado, encontrándolo también en individuos no esplenectomizados.

Nota: Dos variantes llaman la atención; diferentes especies discutibles y/o disputables han sido reportadas en los Estados Unidos de América en los estados de Washington y California (los del tipo WA1 y relacionados) y en Missouri (los del tipo MO1).⁽²²⁾

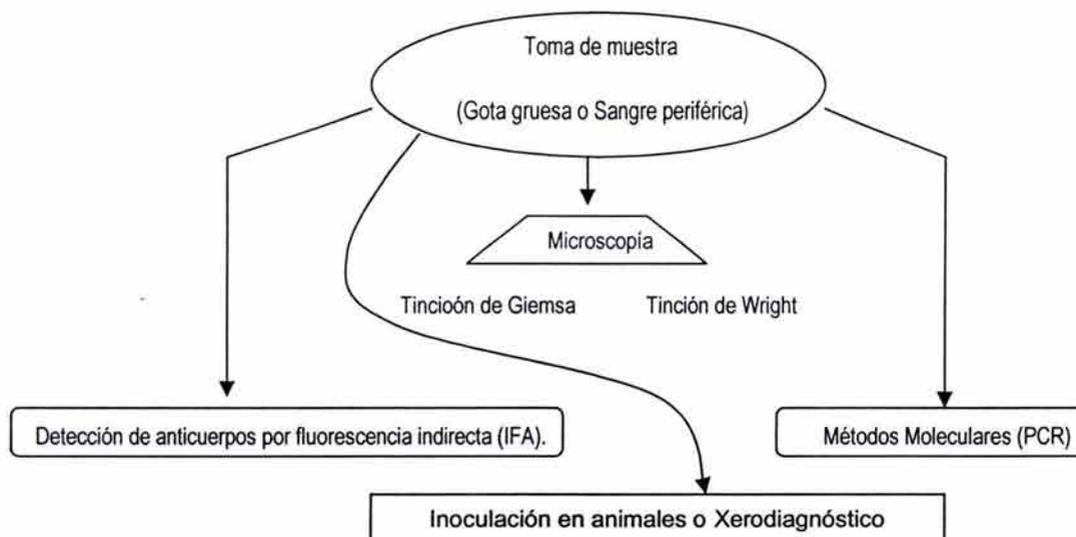
Manifestaciones Clínicas

La mayor parte de las infecciones son probablemente asintomáticas como lo indican estudios serológicos. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad incluyen fiebre intermitente, escalofríos, sudoración, mialgias, fatiga, hepatoesplenomegalia y anemia hemolítica. Los síntomas aparecen de forma típica después del período de incubación que oscila entre 1 y 4 semanas, y que perdura por varias semanas. La enfermedad es más severa en pacientes que se hayan inmunosuprimidos o esplenectomizados, y/o de edad avanzada.

La infección provocada por *B divergens* tiende a ser un poco más severa (frecuentemente fatal si no es tratada apropiadamente) que la producida por *B microti*, donde la recuperación clínica ocurre usualmente.

Diagnóstico de *Babesia microti*

El método diagnóstico tradicional consiste en la examinación al microscopio de un tupido y delgado frotis de sangre teñido con Giemsa. El esquema general de análisis es el siguiente:

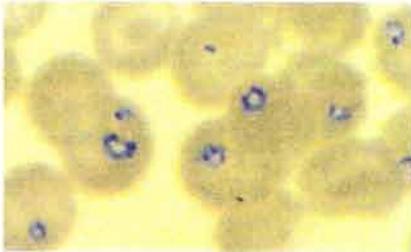


Xenodiagnóstico:

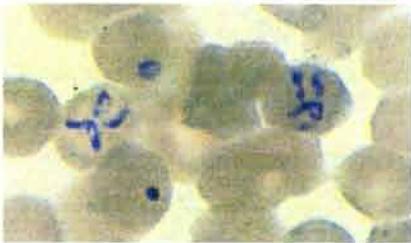
Este es un procedimiento que etimológicamente significa el diagnóstico con el extraño o extranjero. Se utiliza el transmisor u otro huésped diferente del hombre para que el parásito se reproduzca y se localice en aquél. ⁽²⁶⁾

Inoculación en Animales:

La inoculación en animales es un método excelente para detectar infecciones de flagelados y en general de parásitos de cavidades⁽²⁶⁾; como *Babesia* es un hemoparásito, podemos utilizar este tipo de técnica para diagnosticarlo. Para realizar lograrlo, se realiza lo siguiente: Se aísla al organismo por inoculación de sangre del paciente en hamsters o gerbos. Los animales inoculados con sangre infectada usualmente desarrollan la enfermedad en un período de 1 a 4 semanas.



Infección por *Babesia microti* ,
Frotis teñido con Giemsa. ⁽²¹⁾



El microorganismo se parece a *Plasmodium falciparum*, sin embargo los parásitos de *Babesia* presentan numerosas variantes: por ejemplo varían mas en su forma y tamaño; y no producen pigmento.

Infección por *Babesia*, frotis teñido
con Giemsa. ⁽²¹⁾

Figura 3

Detección de Anticuerpos

El diagnóstico de *Babesia* debe hacerse mediante la detección del parásito en muestras de sangre de los pacientes. Sin embargo la detección de anticuerpos es útil para detectar la infección en individuos con niveles muy bajos de parasitemia (como donadores de sangre asintomáticos), para el diagnóstico después de una infección y corroborar que ha sido erradicada gracias al tratamiento administrado, y para el discernimiento de la infección contraída entre *Plasmodium falciparum* y *Babesia* en pacientes cuya examinación al microscopio es confusa y cuya historia clínica incluya permanencia en zonas endémicas para el primero y no pueda ser clarificado.

El ensayo de anticuerpos por fluorescencia indirecta (IFA) utiliza a parásitos de *B microti* como antígeno para detectar anticuerpos en 88-96% de los pacientes que cursan infección con *B microti*. Las laminillas con antígeno del IFA son preparadas utilizando eritrocitos parasitados y lavados producidos en ratón (hamsters). ⁽²¹⁾

Los títulos de los pacientes generalmente se elevan a $\geq 1:1024$ durante la primer semana del padecimiento y declina gradualmente por encima de 6 meses a títulos de 1:16 a 1:256, pero puede permanecer detectable incluso a bajos niveles por un año o más. ⁽²¹⁾ La especificidad es de 100% en pacientes con otras enfermedades transmitidas por artrópodos o personas no expuestas al parásito.

Reacciones cruzadas pueden ocurrir en especímenes de suero de pacientes con infecciones de malaria, pero generalmente los títulos son mucho más altos con el antígeno homólogo. El alcance de las reacciones cruzadas entre las especies de *Babesia* es variable.

4.1.3 CRIPTOSPORIDIOSIS

Cryptosporidium sp

Introducción

Cryptosporidium parvum está considerado como uno de los seis mayores patógenos oportunistas asociados a huéspedes inmunocomprometidos. Se trata de un protozoo obligatoriamente intracelular el cual afecta de manera típica las células intestinales del huésped. Se ha dicho que *Cryptosporidium* pertenece a la familia de los coccidios y que de 20 años a la fecha ha cobrado una considerable importancia médica como un patógeno para el hombre. ⁽²⁸⁾

La primera descripción de este parásito se le atribuye a E. Tyzzer, quien en 1907 lo describió como un organismo asociado a una célula en la mucosa gástrica de un ratón. ⁽¹⁷⁾ Muchas décadas después, se le identificó como un importante agente patógeno, que causaba enteritis entre vacas y aves de corral.

La clasificación taxonómica de *Cryptosporidium* se esclarece día con día. Ha sido tradicionalmente puesto en línea con otros coccidios. A lo largo poco más de un siglo diversos estudios se han realizado para esclarecer de donde provienen estos organismos, el conocimiento adquirido en ellos ha dado como resultado la siguiente clasificación taxonómica para *Cryptosporidium*. ⁽²⁹⁾

Phylum: Apicomplexa	Levine, 1970
Clase: Conoidasida	Levine, 1988
Subclase: Coccidiasina	Leuckart, 1879
Orden: Eucoccidiorida	Leger and Duboscq, 1910
Suborden: Eimeriorina	Leger, 1911
Familia: Cryptosporidiidae	Leger, 1911

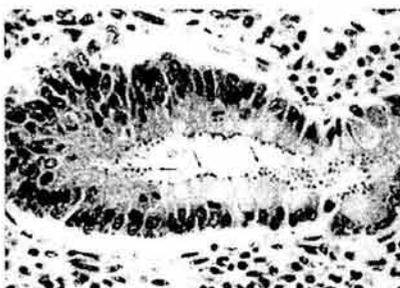
Cryptosporidium parvum es por predominio un parásito de animales neonatos. Algunas excepciones pueden ocurrir pero animales viejos logran esporádicamente desarrollar la infección.

Por muchas décadas, se pensó que *Cryptosporidium* era un organismo patógeno y oportunista que afectaba en exclusiva a animales, pero el primer caso reportado en humanos ocurrió en 1976 en donde se encontró en una pequeña de 3 años de edad de una población rural en Tennessee quien cursaba una severa gastroenteritis que duró dos semanas.⁽²⁸⁾

Gracias al microscopio electrónico y las observaciones realizadas de la mucosa intestinal, se descubrió que *C parvum* era una especie infecciosa también en humanos. En la década de los 80's, la fuerte asociación entre casos reportados de este microorganismo y pacientes inmunosuprimidos trajo a *Cryptosporidium* al primer plano como un patógeno ubicuo.

Pronto el incremento en la población de personas inmunocomprometidas y los numerosos brotes de Cryptosporidiosis a través de una contaminación por quistes de *Cryptosporidium* en fuentes de agua para consumo humano, (usualmente en agua "potable") lograron poner un énfasis a este patógeno.

Poco se sabe acerca de la patogenicidad de nuestro parásito en cuestión, y actualmente no se cuenta con un tratamiento efectivo que ayude a combatir a *Cryptosporidium*.⁽³¹⁾ Distinto a otros patógenos intestinales, *Cryptosporidium* puede infectar a numerosos hospederos, puede sobrevivir a numerosas y diversas condiciones ambientales por períodos prolongados y habitar la mayoría de los climas, debido a su "quiste resistente".⁽²⁷⁾



Biopsia del duodeno tomada de un paciente con SIDA y afectado por cryptosporidiosis⁽²⁸⁾

Morfología y Ciclo Biológico de *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidium está clasificado taxonómicamente como Sporozoa, ya que a partir de su ooquiste libera 4 esporozoitos (las formas móviles infectivas). Su ciclo de vida monoxénico lo completa dentro de un solo huésped. ⁽²⁸⁾

El ciclo en sí es complejo, ya que posee reproducción tanto sexual como asexual y existen también seis distintas fases de desarrollo: ⁽³⁰⁾

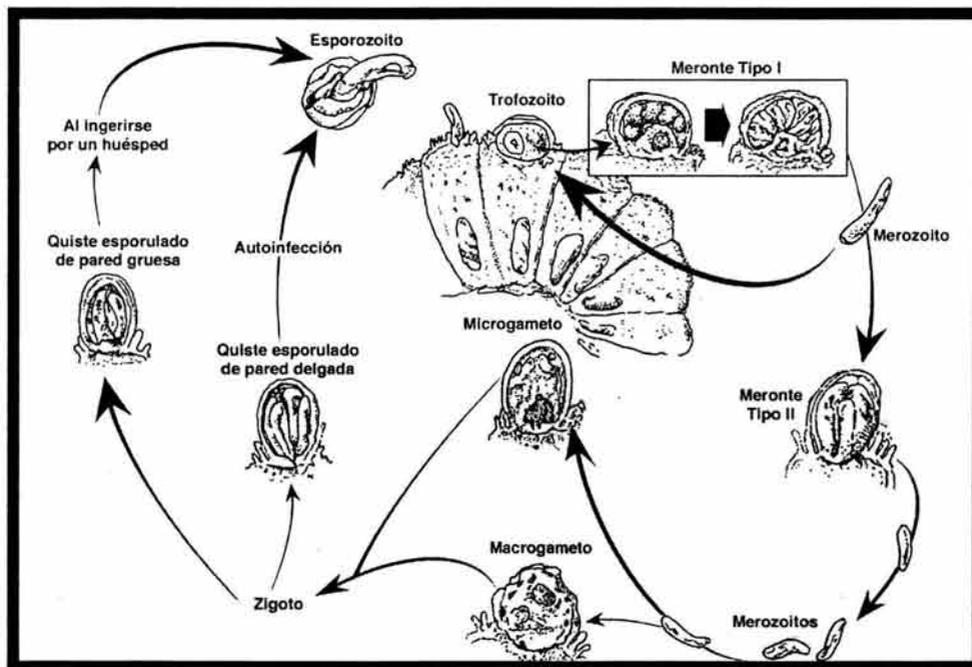
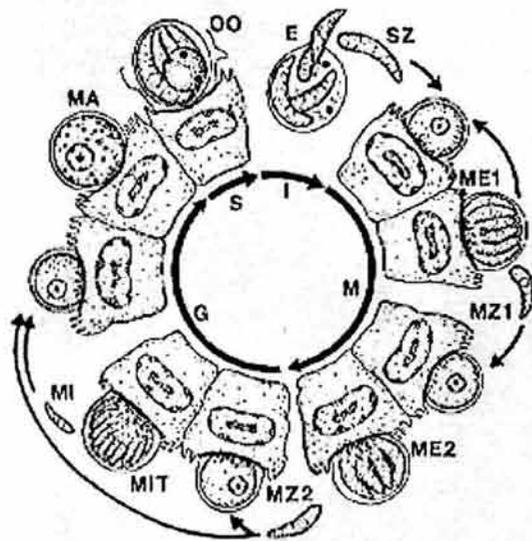


Figura 5 ⁽³⁰⁾

1. Desenquistación del ooquiste ingerido por vía oral, y una vez en el intestino delgado ocurre la liberación de cuatro esporozoitos.
2. Invasión de las células epiteliales intestinales gracias al complejo apical del esporozoito dentro de una vacuola formada en ambas membranas (huésped y parásito) y el comienzo de la multiplicación asexual intracelular.
3. Diferenciación de microgametos y macrogametos
4. Comienzo de la replicación sexual, (Fertilización)
5. Desarrollo de ooquistes
6. La formación de un nuevo e infeccioso esporozoito dentro del ooquiste, el cual es excretado en las evacuaciones
7. El ciclo comienza nuevamente cuando estos ooquistes son ingeridos por un nuevo hospedero. ⁽³²⁾

Figura 6 ⁽³⁰⁾

Fases de Desarrollo de *Cryptosporidium parvum*.

Abreviaturas (E) Desenquistación que resulta en la liberación de 4 esporozoitos a través de una sutura en la membrana; (G) Gamogonia; (I) Fase infectiva; (M) Merogonia; (ME1) Meronte Tipo I que contiene 8 merozoitos; (ME2) Meronte Tipo II que contiene 4 merozoitos; (MA) Macrogameto, con cuerpos membranosos formados; (Mi) Microgameto; (MIT) Microgametocito con 16 microgametos no flagelados; (MZ1) Merozoito Tipo 1; (MZ2) Merozoito Tipo 2; (OO) óoquiste; (S) Esporogonia; (SZ) Esporozoito

El ciclo de vida de *C parvum* comienza con la ingestión de un ooquiste esporulado, que es la forma resistente del parásito que se encuentra en el medio ambiente. Cada ooquiste contiene a su vez 4 estados infecciosos denominados esporozoitos, que salen de una sutura localizada a lo largo de uno de los costados del ooquiste. El sitio predilecto a infectar es el íleon, en el cual los esporozoitos penetran a las células epiteliales de manera individual. Los parásitos habitan en la superficie del lumen celular en donde se piensa que permanecen hasta un momento antes de ocurrir de modo extracelular. ⁽³³⁾

Sin embargo observaciones ultraestructurales, muestran claramente que estos parásitos se hallan de manera intracelular, encerrados por una fina capa del citoplasma de la célula hospedera. Un organelo de adherencia único parecido a un desmosoma, adicional a los accesorios plegadizos de la membrana del parásito, se desarrolla en la interfase entre el parásito y el citoplasma de la célula huésped. Este organelo de adherencia es en ocasiones nombrado como "órgano alimentador".

Fisiones múltiples (merogonia, esquizogonia), ocurren y resultan en la formación de 8 merozoitos dentro de un meronte. Estos merontes se denominan de Tipo I y se abren rompiendo y liberando merozoitos libres. Uno de estos merozoitos penetra nuevas células, después ellos experimentan una merogonia para formar merontes adicionales. Se piensa que los merozoitos Tipo I son capaces de reciclarse indefinidamente y así entonces poseen el potencial para originar nuevos merozoitos Tipo I de manera continua.

Se postula que algunos de los merozoitos Tipo I son de alguna manera provocados o forzados a formar un segundo tipo de merontes, los de Tipo II, los cuales contienen únicamente 4 merozoitos. Una vez liberados, estos merozoitos Tipo II manifiestan la formación de estadios sexuales. Algunos merozoitos Tipo II entran a la célula, crecen y se ensanchan, y forman macrogametos. Otros experimentan fisiones múltiples en el interior de la célula formando así microgametocitos conteniendo a su vez 16 microgametos no flagelados. ⁽²⁹⁾

El cigoto se forma cuando de la ruptura del microgameto los microgametocitos penetran el macrogameto. Una pared ooquistica resistente es formada entonces alrededor del cigoto, (el único estado diploide en el ciclo de vida); ocurre entonces la Meiosis y 4 esporozoitos son formados en el proceso. La formación de esporozoitos es denominada Esporogonia. Estos ooquistes son liberados en las heces y de ahí al medio ambiente.



Imágen de *Cryptosporidium* en íleon

Tipo de imágen: Micrografía electrónica

Figura 7 ⁽³⁴⁾

Gracias al desarrollo de la genética y a los múltiples estudios que sobre ella giran, hoy sabemos que por el momento existen dos genotipos distintos para *Cryptosporidium parvum*.⁽²⁹⁾

- **Genotipo 1** (o genotipo H para los humanos) ha sido encontrado únicamente hasta ahora en humanos (así como en un primate y una vaca de mar). Estos ooquistes no infectan de manera rápida a otros animales.
- **Genotipo 2** (o genotipo C para becerros) ocurre en un amplio rango de animales incluyendo al hombre.

El Genotipo **1** tiende a ser más agresivo en los humanos, con un período que se manifiesta y casi dobla al que cursa el Genotipo 2, con un promedio apenas por debajo de 2 semanas. Muy raramente, ambos genotipos pueden encontrarse infectando a la misma persona. Marcadores genéticos en diferentes cromosomas revelan que existe una muy pequeña o casi nula mezcla entre ambos genotipos, por lo que se sugiere fuertemente que existen dos especies distintas (pero morfológicamente idénticas).

Cualquiera de los dos genotipos puede causar brotes de infección, sin embargo hasta ahora en siete muestras aisladas durante el brote epidemiológico de Milwaukee en Estados Unidos en 1993, fue encontrado únicamente el genotipo 1.

Cuadro 4⁽²⁹⁾
***Cryptosporidium* spp en Mamíferos**

<i>Especies de Cryptosporidium</i>	Ooquistes L x W (escala) Índice de formas (escala); N	<i>Especies del Huesped</i>	<i>Comentarios</i>
<i>C. muris</i> (108735)	8.76 x 6.32 (8.2-9.4 x 6.0-6.8) 1.39 (1.21-1.50); N=20	<i>Mus musculus</i>	Originalmente aislado del Parque Zoológico Nacional de Virginia, 1993. (15th mouse passage, gDNA library ATCC 87666.)
<i>C. parvum</i> (KSU-1) (genotype 2)	5.2 x 4.6 (4.8-5.6 x 4.2-4.8) 1.16 (1.04-1.33); N=30	<i>Bos taurus</i>	Aislado bovino de Bendena, KS en 1987. (gDNA library ATCC 87439;) Tilley et al. 1991. Can. J. Microbiol. 37: 949-952.
<i>C. parvum</i> (KSU-1) (genotype 2)	5.2 x 4.6 (4.8-5.6 x 4.2-4.8) 1.15 (1.04-1.22); N=30	<i>Bos taurus</i>	Aislado bovino de Bendena, KS en 1987. Continuamente liberado por ganado. (gDNA library ATCC 87439;) Tilley et al. 1990. J. Zoo Wildlf. Med. 21: 463-467.
<i>C. parvum</i> (KSU-4) (genotype 2)	5.15 x 4.45 (4.8-5.6 x 4.0-4.6) 1.16 (1.04-1.35); N=20	<i>Bos taurus</i>	Aislado de Ternero y becerro, Marshall Co., KS, 1999.
<i>C. parvum</i> ("Texas") (genotype 1)	5.33 x 4.66 (4.8-5.6 x 4.2-4.8) 1.15 (1.08-1.23); N=20	<i>Homo sapiens</i>	Pacientes con SIDA, Texas, 1998.
<i>C. parvum</i> (genotype 2)	5.17 x 4.46 (4.6-5.6 x 4.2-4.6) 1.16 (1.04-1.27); N=20	<i>Canis familiaris</i>	R. Fayer, USDA, 1999.
<i>C. andersoni</i> (KSU-3)	7.72 x 5.86 (7.2-8.2 x 5.6-6.4) 1.32 (1.13-1.46); N=20	<i>Bos taurus</i>	Especies adultas de ganado; usualmente organismos parecidos a <i>C. muris</i> . Kansas, 1999.
<i>C. andersoni</i> (VMTRC49)	7.99 x 6.24 (7.4-8.8 x 5.8-6.6) 1.28 (1.19-1.40); N=20	<i>Bos taurus</i>	Especies adultas de ganado; usualmente organismos parecidos a <i>C. muris</i> , 1998. Oocysts courtesy E.R. Atwill.
<i>C. andersoni</i> (VS1742)	8.38 x 6.19 (8.0-9.2 x 5.8-6.4) 1.35 (1.25-1.59); N=20	<i>Bos taurus</i>	Especies adultas de ganado; usualmente organismos parecidos a <i>C. muris</i> , Idaho, 1996. gDNA library ATCC 87715.
<i>C. wrairi</i>	5.36 x 4.57 (4.8-5.6 x 4.0-5.0) 1.17 (1.04-1.33); N=30	<i>Cavia porcellus</i>	C.E. Chrisp; Tilley et al. 1991. Can. J. Microbiol. 37: 949-952.

Distribución Geográfica y Epidemiología

Las infecciones humanas por *Cryptosporidium* están ampliamente distribuidas por todo el mundo. La infección por *C. parvum* ha sido reportada en los seis continentes e identificada en un rango de edad entre los 3 y los 95 años de edad.⁽²⁸⁾ La vía de transmisión es la ruta fecal-oral, usualmente a través de agua contaminada por excremento de Ganado.⁽³⁵⁾

La criptosporidiosis es una infección muy común, un tanto más en climas tropicales que en climas templados, en las estaciones húmedas y en temporada de lluvias y predomina en la población infantil (menor a 1 año de edad). También presenta una alta incidencia en individuos con diarrea, en lugares de alta transmisión, y población seropositiva en general.⁽³⁶⁾ La prevalencia de *Cryptosporidium* en comunidades de hombres homosexuales varía notablemente en los países desarrollados.⁽³⁷⁾

La temporada del año en la que *Cryptosporidium* se convierte en un problema en la superficie de distintas fuentes de agua, en la mayor parte de las regiones de Norte América, es entre Marzo y Junio, cuando prevalecen las lluvias de primavera y muchos animales neonatos están presentes en la naturaleza y son los responsables de amplificar el número de ooquistes.⁽³⁸⁾

Sin embargo es importante hacer notar que diversos estudios nos muestran que no solo los neonatos liberan ooquistes, también los animales adultos continúan produciéndolos aunque en mucho menores cantidades, pero de modo constante, lo que incrementa la carga en el ambiente y sirve como fuente de infección para los neonatos. Ruminantes, cerdos, gatos, perros, y otros mamíferos, todos ellos pueden contribuir e incrementar el número de ooquistes de *Cryptosporidium* en áreas tanto rurales como urbanas.

La epidemiología de *Cryptosporidium* y *Giardia* esta íntimamente relacionada, comparten los mismos factores en cuanto a su prevalencia, incidencia y transmisión.⁽³⁸⁾ Numerosos brotes de Criptosporidiasis producidos por contaminación de agua potable han sido estudiados, la mayoría de ellos en los Estados Unidos y Europa, en un período

comprendido entre 1993-1994 de 30 casos de contaminación 10 de ellos fueron provocados por *Cryptosporidium* y *Giardia*.

El caso mas popular a nivel mundial fue en Milwaukee, en el cual *Cryptosporidium*, fue responsable de 403,000 individuos afectados. ⁽³⁵⁾ Este brote se debió a una contaminación en el agua potable por excremento de ganado. (en el ganado hay una alta incidencia mas de 90% de adquirir la infección; ⁽³⁹⁾ y una particularidad de este microorganismo es su alta resistencia al cloro).

Las personas más expuestas y que pueden adquirir la infección son: ^(27, 28, 29, 40,41)

- Infantes y niños pequeños en guarderías.
- Personas que ingieren agua no filtrada o no tratada
- Personas involucradas en labores de granja
- Simpatizantes de prácticas sexuales que pongan en contacto a la persona con materia fecal o contacto entre individuos infectados
- Pacientes y personal nosocomial que estén en contacto con otros pacientes infectados
- Veterinarios que interactúan con animales de granja.
- Viajeros que transiten por áreas donde no existen sistemas potabilizadores de agua.
- Individuos que habiten áreas densamente pobladas.
- Propietarios de mascotas infectadas (raramente).

Dentro de la población de individuos inmunocomprometidos, la enfermedad severa y persistente ha sido asociada a niveles de células CD 4⁺ por debajo de 180 células por mililitro cúbico



Figura 8

Micrografía del parásito *Cryptosporidium parvum* genotipo I, sobre la membrana basal del intestino delgado. Infección experimental de un *Macaco mullata*. (10000x). ⁽⁴²⁾

Transmisión

El intestino es un hábitat vasto para el desarrollo de protozoarios, y a ciencia cierta nadie sabe realmente cuántos ooquistes se requieren para que se establezca una infección en el humano. ⁽⁴³⁾

Un estudio sugiere que la dosis infectiva 50% (ID₅₀) para humanos es de alrededor de 132 ooquistes, sin embargo un voluntario sano fue infectado en este mismo estudio con tan solo 30 ooquistes. ⁽⁴⁴⁾ Otro estudio emplea aislamientos mucho más agresivos, lo que indica, que incluso bajas cantidades de ooquistes (hasta nueve) pueden en algunos casos iniciar una infección y provocar la enfermedad. ⁽⁴⁵⁾ Los humanos como los animales, parecen mostrar diversos grados de susceptibilidad hacia este parásito y dosis efectivas.

No se sabe si el número de ooquistes de *Cryptosporidium* reportados por varios grupos que toman como fuente de estudio agua de consumo público son confiables, ya que las técnicas de concentración para ooquistes en muestras ambientales no se encuentran estandarizadas y otros métodos de detección han presentado reacciones cruzadas con algas u otros restos de microorganismos. ⁽⁴⁶⁾

La criptosporidiosis puede ser transmitida como se mencionó anteriormente por contaminación de agua y alimentos por heces, por contacto entre personas y animales, y contacto directo entre personas. La probabilidad de transmisión debido a una pequeña cantidad de contaminante es desafortunadamente alta, como se mencionó anteriormente, estudios recientes determinaron que la dosis infectiva (ID₅₀) de *C. parvum* es sólo de 132 ooquistes por un individuo sano sin una inmunidad previa para *Cryptosporidium*. ⁽⁴⁴⁾

Agua y Alimentos

Hasta ahora han ocurrido seis grandes brotes de criptosporidiosis en los Estados Unidos de Norte América como resultado de la contaminación de agua "potable". ⁽³¹⁾ El mayor de todos ellos ocurrido en Milwaukee en 1993 y que afectó cerca de 400,000 personas. Brotes como este usualmente son el resultado de beber agua cercana a la superficie de la tierra, como ríos o lagunas. El agua de albercas y de parques recreativos

han sido de igual manera asociadas a estos brotes. Así también, el agua no tratada y de uso de riego o agua para consumo humano en fuentes públicas, representan importantes fuentes de contaminación.

La alta resistencia a las condiciones ambientales por parte de los quistes de *C. parvum* le permite al patógeno sobrevivir y traspasar a través de varias filtraciones y métodos de clorinación en el tratamiento y potabilización del agua.

Los alimentos pueden representar al igual que el agua una fuente de transmisión cuando una persona asintomática o enferma entra en un contacto poco higiénico con los mismos. La primera documentación de un hecho como este ocurrió en Maine, cuando dos niños que bebieron jugo de manzana que después se comprobó estaba contaminado por excremento animal, desarrollaron Cryptosporidiosis.⁽¹⁹⁾ El ooquiste no logra sobrevivir a las condiciones de cocción de los alimentos, pero la contaminación puede darse en otro tipo de alimentos como ensaladas, o bebidas que no requieren ser calentados y/o cocidos.

Transmisión Animal- Persona

La Transmisión de *C. parvum* proveniente de mascotas en el hogar puede llegar a presentarse pero se consideran sumamente raros y son escasos los casos reportados, sin embargo podemos afirmar una clara relación entre el ganado y los humanos (aproximadamente un 50% del ganado libera ooquistes en aquellos establos contaminados).⁽⁴³⁾

Algunos de los factores de riesgo han sido investigados en África, donde la presencia de cerdos y perros domésticos infectados se correlacionó con la infección de infante.⁽²⁷⁾

Transmisión de Persona a Persona

Cryptosporidium se trasmite con un alta frecuencia en guarderías y centros de desarrollo infantil, donde los pequeños se encuentran encerrados en pequeños salones, baños y áreas de juego comunes o cuando necesitan numerosos cambios de pañal.⁽⁴⁷⁾

A su vez los empleados que laboran en estos centros, están igualmente expuestos a adquirir la infección y convertirse posteriormente en portadores del patógeno y dispersarlo entre sus propias familias y hogares.

Los nosocomios representan un ambiente propicio para la transmisión de la Criptosporidiosis. Existen numerosos reportes que cursan en ambos sentidos entre paciente y el personal y de paciente a paciente. Brotes como el de 5 pacientes que fueron infectados en una unidad de trasplante de médula ósea tras la admisión de una persona afectada por Criptosporidiosis. ⁽⁴⁸⁾

Otro reporte ocurrió después de que un paciente con SIDA en fase terminal fue infectado por *Cryptosporidium* fue admitido al área de enfermedades infecciosas de un nosocomio, se encontraron 5 casos confirmados entre el personal de enfermería. Como resultado de estos informes se ha reforzado la idea de la posible transmisión de este patógeno en el medio ambiente en forma de "aerosol" de *C. parvum* de persona a persona. Diversas rutas de transmisión como la anterior no se descarta, ya que los ooquistes de *Cryptosporidium* se dispersan en gran cantidad durante un cuadro agudo y se vuelven potencialmente infecciosos para otros. ⁽⁴⁰⁾

Estos brotes nosocomiales muestran la imperiosa necesidad para que se implementen medidas extremas en los Hospitales y centros de atención para la salud ante la admisión de pacientes afectados por este parásito. Y todo personal involucrado debe reportar a la brevedad cualquier síntoma gastrointestinal por pequeño e inofensivo que parezca a fin de prevenir infecciones posteriores entre ellos mismos y los pacientes a su cargo.



Manifestaciones Clínicas

La Criptosporidiasis es una enfermedad que afecta por igual a individuos de ambos sexos y de todas las edades, aunque predomina en los infantes. Clínicamente la Criptosporidiasis se presenta como una gastroenteritis. La severidad de los síntomas depende del estado inmunológico del huésped. ⁽³³⁾

La diversos síntomas presentes en la Cryptosporidiosis varían considerablemente entre un paciente inmunocompetente y uno inmunocomprometido. En pacientes inmunocompetentes, la Cryptosporidiosis se manifiesta como un cuadro diarreico agudo, que se resuelve de manera autolimitada (1-2 semanas de duración), y los síntomas incluyen:

- Diarrea acuosa y frecuente
- Náusea
- Vómito
- Calambres abdominales
- Fiebre moderada

El período de incubación es aproximadamente de 7 días y la duración de la enfermedad es cerca de 12 días (2-26 días). En algunos individuos los ooquistes son recogidos de las evacuaciones entre los 7 y 28 días de la infección en curso; en muchos otros entre el día 1 y el día 15 después de que cesan los síntomas: y en pocos casos dura mas allá de 2 meses. Puede decirse que el cuadro en general es parecido a la diarrea del turista. ⁽⁴⁸⁾

Para personas inmunocomprometidas, la enfermedad es mucho más severa: ⁽³⁸⁾

- Diarrea intensa y debilitante tipo cólera, (por arriba de 20 litros al día).
- Calambres abdominales severos
- Malestar generalizado
- Fiebre moderada
- Pérdida de peso
- Anorexia

Debido a la deficiencia de especificidad de *C. parvum*, la infección ha sido identificada también en el tracto biliar (causando un adelgazamiento de la pared de la vesícula biliar) así como en el sistema respiratorio. ⁽⁴⁰⁾

En pacientes inmuno suprimidos, la Criptosporidiosis es mas pronunciada y dura una mayor cantidad de meses e incluso años. Las condiciones asociadas con un cuadro intratable de este mal, es desde luego el SIDA y bajos niveles de IgA, hipogammaglobulinemia congénita así como las terapias prolongadas con Ciclofosfamida y Prednisolona. ⁽⁴⁹⁾

La broncopulmonía asociada a una Criptosporidiosis es un cuadro muy común en personas con SIDA que presenta muy bajos niveles de linfocitos T CD4⁺. La pulmonía con Criptosporidiosis no presenta síntomas específicos, ya que consisten en tos crónica, disnea, fiebre, dolor en el pecho. La tos algunas veces cursa con una profusa producción de moco. Algunas radiografías por rayos X se muestran normales y otras muestran infiltrados difusos o áreas de consolidación. La muerte puede venir por paro respiratorio.

Cuando el tracto biliar se ve comprometido produce síntomas e histología que encaja con un cuadro de colangitis esclerosa, sobre todo en individuos con SIDA avanzado y una cuenta muy pobre de linfocitos T CD4⁺.

Los síntomas principales son dolor en el cuadrante superior derecho, diarrea, fiebre y colestasis. Radiografías del conducto biliar muestran estenosis de la porción distal con dilatación. ⁽⁵⁰⁾

Patogenicidad

Poco se sabe acerca del mecanismo por el cual *Cryptosporidium* produce enfermedad, principalmente por la ausencia de un modelo disponible. De limitados experimentos, puede establecerse que provoca una diarrea secretoria; el mecanismo propuesto para esta hipersecreción se basa en el daño de enterocitos causado por la multiplicación del parásito que resulta en una hiperplasia de las células de la cripta. La destrucción de las células absorbentes y las puntas de las vellosidades así como la hiperplasia de las células

de la cripta secretoras son suficientes para inclinar el balance hacia una secreción de fluido y de iones por la mucosa intestinal. ⁽⁴⁷⁾

De la desenquistación del ooquiste, cuatro esporozoitos son liberados los cuales adhieren su complejo apical a la superficie de la mucosa intestinal. ⁽²⁷⁾ En la figura 9 se muestra una fotografía de contraste fases, donde se aprecia un esporozoito liberado de un ooquiste de *Cryptosporidium*. ⁽²⁸⁾

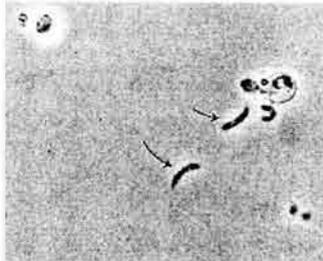


Figura 9 ⁽²⁸⁾

El esporozoito cuenta con un factor de lecitina específico que le permite adherirse a la superficie del intestino. ⁽²⁷⁾ Una vez adherido, hipotéticamente se ha propuesto que la mucosa libera citocinas que activan los fagocitos residentes. Estas células activas liberan a su vez factores solubles que incrementan la secreción intestinal de agua, cloruros y a la par inhiben la absorción. Entre los factores liberados podemos mencionar la histamina, serotonina, adenosina, prostanglandina, leucotrienos y factores plaquetarios de coagulación que actúan sobre diversos sustratos, incluyendo los nervios entéricos y las mismas células epiteliales. ⁽⁴¹⁾

Consecuentemente las células epiteliales son seriamente dañadas por uno de los siguientes modelos:

1. Muerte celular como resultado directo de la invasión, multiplicación y extrusión parasitaria,
2. Daño celular debida a inflamación mediada por células T, provocando la atrofia de las vellosidades y hiperplasia de las criptas.

Cualquiera de ellos provoca una distorsión en la arquitectura de las vellosidades y esto se acompaña de una mala absorción de nutrientes y diarrea. ⁽⁴¹⁾

Diagnóstico de *Cryptosporidium* sp

Cuando *C. parvum* fué identificado por vez primera como patógeno humano, el diagnóstico fué realizado mediante una biopsia de tejido intestinal. Sin embargo este método de prueba puede dar falsos negativos debido a la naturaleza irregular y desigual de esta infección intestinal parasitaria. ⁽⁴⁷⁾

Métodos tintoriales fueron desarrollados para detectar e identificar los ooquistes directamente de muestras de material fecal. Hasta hoy la tinción ácido-resistente modificada (Kinyoun o Ziehl Neelsen), ha sido la opción a elegir de manera rutinaria en la búsqueda de estos parásitos, pero recientemente se desarrollo una tinción igualmente útil para el diagnóstico de estos parásitos y de otros igualmente importantes de manera simultánea, la tinción de safranina Tricrómica, mas adelante hablaremos de ella.

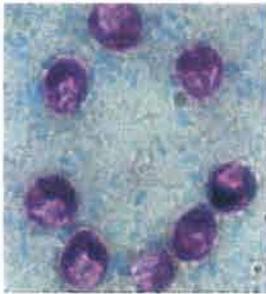


Figura 10

Ooquistes de *Cryptosporidium parvum* ⁽³⁰⁾

Inmunológicamente, se pueden detectar inmunoglobulinas anti-cryptosporidia (IgM, IgG, e IgA) mediante un ensayo inmunoenzimático de absorción como el ELISA, o mediante un ensayo inmunofluorescente de anticuerpos como el IFA. Pero ninguno de los dos puede proveer un diagnóstico directo de la Cryptosporidiosis. El IFA sigue siendo la técnica mas comúnmente usada para detectar ooquistes en muestras ambientales

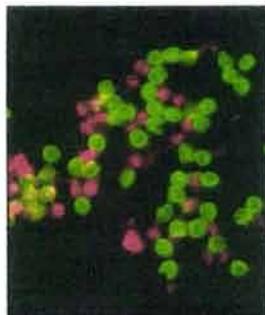
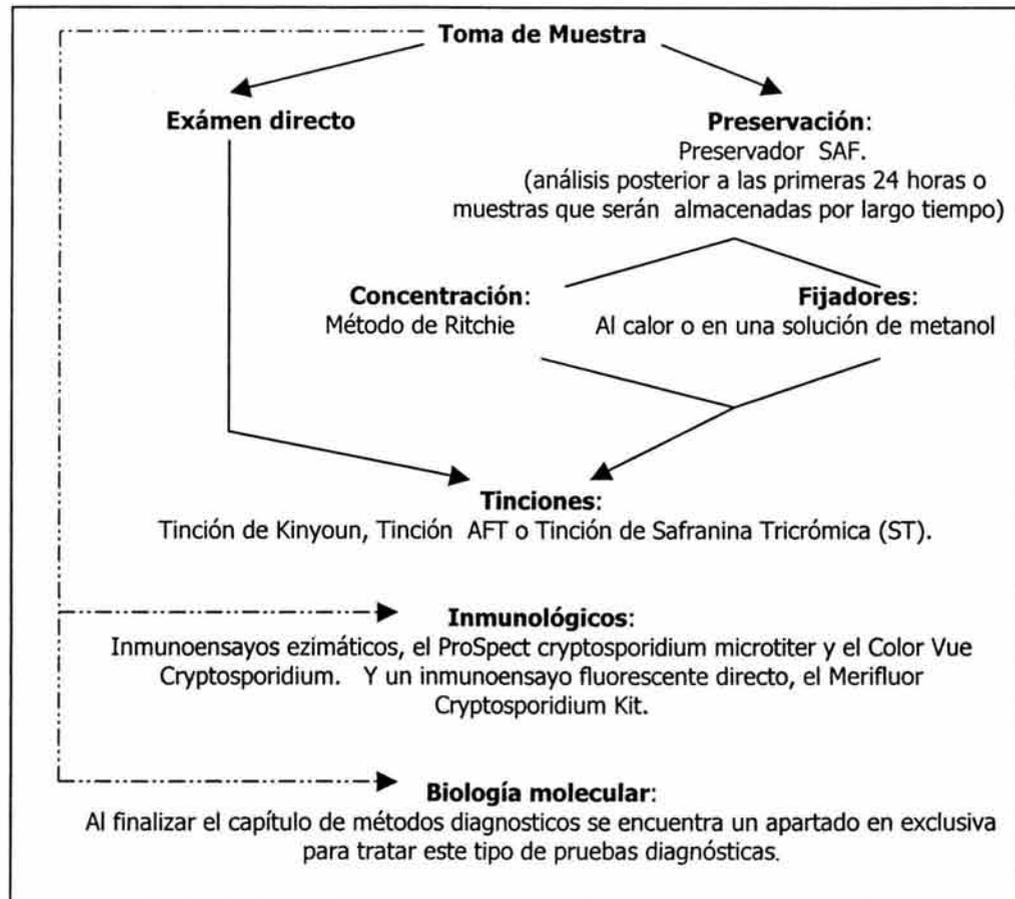


Figura 11

Ooquistes de *Cryptosporidium parvum* marcados en un ensayo inmunofluorescente indirecto (IFA) con anticuerpos monoclonales 8F4 a la membrana interna del ooquiste. ⁽²⁹⁾

Cuando se reciba una muestra que se sospeche contenga a *Cryptosporidium*, se aconseja darle el siguiente tratamiento: ⁽⁵¹⁻⁵⁵⁾



¿Qué hacer en lo futuro?

Desde que se conoce que *Cryptosporidium* tiene el potencial para infectar a muchas personas como resultado de un brote epidemiológico, se han realizado esfuerzos que pongan en claro muchas de las incógnitas que aun permanecen respecto a la enfermedad como son:

- Esclarecer la relación entre un “bajo” contenido de ooquistes en el agua potable y la frecuencia de infecciones criptosporidiales.
- Determinar la proporción de cuadros asintomáticos de *Cryptosporidium* en personas inmuno comprometidas y la probabilidad de que estos individuos puedan desarrollar un cuadro definido de Criptosporidiosis cuando su cuenta de células CD4⁺ desciende a niveles muy bajos.
- Calcular los riesgos relativos de infección al ingerir agua potable que pueda estar contaminada, por tener un contacto con animales, por realizar prácticas sexuales inseguras sin protección y por contacto en nosocomios entre pacientes y personal médico, a fin de determinar los focos de infección e implementar las medidas de prevención necesarias.
- Mejorar la comunicación entre los diferentes estados y regiones del país para realizar un adecuado reporte de casos de Criptosporidiosis e identificar posibles brotes.
- Continuar con el desarrollo de terapias efectivas que mejoren los síntomas de la Criptosporidiosis. ⁽³¹⁾

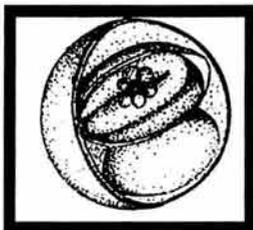
4.1.4 CICLOSPORIASIS

Cyclospora cayetanensis

Introducción

El primer organismo característico a este género aún no conformado fue realizado por Eimer en 1870 en el intestino de un topo.⁽⁵⁶⁾ El género se creó en 1881 por Schneider para *Cyclospora glomerica* la cual describió de un miriápodo., Las siguientes descripciones de especies de *Cylospora* fueron hechas en víboras, insectos, roedores y finalmente en humanos. El primer reporte hecho en humanos que se atribuyera a este género pudo haber sido en 1977 o 1979⁽⁵⁷⁻⁵⁸⁾ (hay discrepancia en el año exacto de acuerdo a distintos autores) cuando se aisló de tres pacientes de Papua, Nueva Guinea un parásito con las características morfológicas que se describen mas adelante pero que en ese momento se representó como una nueva especie de Isospora. De hecho se piensa que muchos reportes como este pasaron inadvertidos o se confundieron debido a que en muchos países en vías de desarrollo no se presta demasiado interés en el análisis parasitológico y el énfasis en el tamaño microscópico de las formas infectivas pasa a segundo término.⁽⁵⁹⁾

Fue en la década de los 80's cuando se confirmó la patogenicidad de *Cyclospora* para el género humano, en la década siguiente, el parásito fue referido por primera vez como *Cyclospora cayetanensis* en una publicación para la sociedad Americana de Medicina Tropical e Higiene en 1992.⁽⁵⁹⁾ Y finalmente fué descrito totalmente en 1994.⁽⁶⁰⁾



Subphyllum	- Apicomplexa
Subclase	- Coccidiasina
Orden	- Eucoccidiorida
Familia	- Eimeriidae

Figura 12. Representación gráfica de un Ooquiste esporulado de *Cyclospora cayetanensis*.⁽⁶¹⁾

Etimología; Su nombre se debe a una combinación de términos; El nombre de la Universidad donde la mayoría de los estudios de dicho parásito han sido realizados cayetan (Universidad de Cayetano Heredia, Lima, Perú), y la terminación ensis (que denota pertenencia).

Morfología y Ciclo Biológico

No se conocen con seguridad todos los estadios del ciclo de vida de este patógeno, pero lo que se ha observado son los ooquistes* de *C. cayetanensis* que están inmaduros al tiempo que son evacuados con las heces fecales y completan la esporulación después de 5 días hasta dos semanas a 25°C (condiciones experimentales son sales biliares y tauricolato de sodio) la ingestión de ooquistes maduros de 8 a 10 micras de tamaño produce infección en el duodeno. *Cyclospora* se localiza en el citoplasma de los enterocitos, usualmente por arriba del núcleo y dentro de vacuolas parasitofóricas. Se le conoce un desarrollo asexual del estudio de biopsias. Los merozoitos miden entre 1 a 2 x 6 micras y el trofozoito mide 2 x 4 micras; Los esquizontes varían en la cantidad de merozoitos entre 6 hasta 16 según diferentes estudios. ^(62, 63) En 1997 dos tipos de merontes y estados sexuales fueron observado en enterocitos del jejunio de pacientes que excretaban ooquistes, y esto confirmó que el ciclo muy probablemente pueda ser completado dentro de un solo huésped. Los quistes de *Cyclospora* pueden ser confundidos fácilmente con los de *Cryptosporidium* y otros artefactos fecales que se tiñen de manera positiva con la tinción ácida. *Cyclospora* se transmite fácilmente a través de comida y agua.

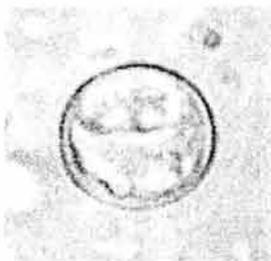


Figura 13

Ooquiste de *Cyclospora cayetanensis* excretado y que permanece sin esporular. La esporulación puede ser confirmada mediante la observación de dos esporozoitos dentro de cada ooquiste, con la ayuda del microscopio óptico. ⁽⁶⁴⁾

Distribución Geográfica y Epidemiología

Reportes de *Cyclospora* y de microorganismos parecidos a cianobacterias CLB (del inglés Cyanobacter-like body) ⁽⁶⁵⁻⁶⁶⁾ como anteriormente se le denominaba se han encontrado en Norte, Centro y Sur América; En la zona del Caribe, el sureste de Asia, el oeste de Europa, África y prácticamente en cualquier lugar que es investigado para su estudio. Haití es considerado como una zona endémica para este padecimiento, y de los estudios realizados, muchos de ellos refieren a San Juan de Miraflores en Lima, Perú.

Cuadro 5 ⁽⁵⁸⁾

Distribución de Casos Reportados.	Comentarios
Viajeros que regresan de países como Haití, India, México, Marruecos, Nepal, Pakistán, Puerto Rico, y el Sureste de Asia	Sintomáticos
Niños en Perú	6% de niños entre 1-1.5 años y 18% de niños entre 1.5-2.5 años (la mayoría de los casos no están asociados a diarrea)
Niños en Nepal	Niños mayores de 1.5 años 5% de niños con diarrea 2% de niños sin diarrea
Estados Unidos de Norte América y Ontario, Canada	Brotos secundarios al consumo de fresas y frambuesas contaminadas provenientes de Guatemala
Haití	11% de incidencia en pacientes con HIV
Chicago, USA	Brotos secundarios al consumo de agua contaminada en un dormitorio de un centro de salud.
Java, Indonesia	Importante causa de afecciones gastrointestinales en expatriados

Patrones de temporada han sido reportados en la literatura: ^(56, 58)

- En Nepal, la temporada de incidencia es de Abril a Noviembre (predominantemente de Junio a Agosto).

- En Perú, de Enero a Julio (predominantemente de Abril a Junio).
- Casos de viajeros y turistas en los Estados Unidos en los meses de Mayo a Octubre.

En los Estados Unidos, la infección brota primordialmente a finales de la primavera y principios de verano. En México se han realizado pocos estudios dirigidos a la búsqueda de este parásito en la población pediátrica, así como información de casos aislados. ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾

Frecuencia:

En regiones empobrecidas de Lima Perú, los niños presentan una prevalencia de infección por *Cyclospora* de 6-18%, y de estos valores entre un 11-18% con sintomatología clara. ⁽⁵⁸⁾

Mortalidad / Morbilidad:

- *Cyclospora* no es considerada normalmente como un padecimiento de curso fatal. El verdadero riesgo en los casos en los que se presenta es que ocurra una crítica deshidratación como resultado de una prolongada diarrea, particularmente en niños que no reciben un adecuado tratamiento de la importante pérdida de sales minerales y líquidos.
- Un cuadro diarreico de extensa duración, la deshidratación subsiguiente, así como la pérdida de peso llegan a producir una alta morbilidad. Si un paciente inmunosuprimido y afectado por *Cyclospora* no recibe de manera inmediata un tratamiento con trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ) como profilaxis, puede conducirse a un cuadro de diarrea crónica y debilitante.

Raza y Sexo: No se cuentan con datos reportados que indiquen una predilección étnica o de algún otro tipo. No se han encontrado evidencias que sugieran una predilección de tipo sexual en este tipo de infección.

Problemas no resueltos

Sin embargo existen algunos aspectos relacionados al estudio de este padecimiento que aún no pueden ser claramente entendidos por el hombre. Entre estos aspectos por esclarecer encontramos: supervivencia en el medio ambiente por parte del parásito, el modo de transmisión a los humanos y muy relacionado a este último, la epidemiología. Los límites de cada una de estas categorías usualmente se traslapan.

Sobrevivencia ambiental

Los tres puntos más importantes a tratar en esta categoría son la distribución, supervivencia y los tiempos de esporulación por parte de los ooquistes en constantes cambios en el medio ambiente. Todos estos factores afectan el modo de transmisión.

Debido a las limitaciones que ha mostrado la tecnología actual, los quistes de *Cyclospora* son obtenidos en muy pocas cantidades de vegetales y depósitos de agua.^(46, 70-72) Se sabe muy poco acerca de las condiciones que favorecen la supervivencia de *Cyclospora*. Estudios preliminares han mostrado que ooquistes bajo las siguientes condiciones, -20° C durante 24 horas y una exposición a 60 °C durante 1 hora son incapaces para inducir la esporulación. El resguardo de los ooquistes a 4° C o 37° C durante 14 días, retarda la esporulación.⁽⁷³⁾

El aspecto que más confunde es el tiempo de esporulación de un ooquiste. El reporte que confirma la identidad de *Cyclospora* indica que el organismo requiere de 1 a 2 semanas para completar su esporulación y convertirse en agente infeccioso bajo condiciones ambientales (25°C a 30°C).⁽⁶⁰⁾ Los ooquistes mantenidos a 4°C pueden esporular dentro de un período de 6 meses.⁽⁶⁵⁾ Estos tiempos son más prolongados que los reportados para la mayoría de los coccidios; y además la transmisión directa de persona a persona es improbable.

Transmisión entre Humanos

El punto clave a determinar es la dosis infectiva y la especificidad para este microorganismo. Para la mayor parte de los coccidios que afectan tanto a animales como a humanos (e.g., *Cryptosporidium* ^[45]), se presume que la dosis infectiva sea baja. ⁽⁷⁴⁾ Lo que hasta ahora sabemos acerca del modo de transmisión mediante fuentes de agua para *Criptosporidium*, son seguramente muy parecidas y ciertas para *Cyclospora*. ⁽⁷⁵⁾ Sin embargo, solo dos brotes de *Cryptosporidiosis* que involucran alimentos han sido reportados (uno de ellos involucró una bebida fermentada tipo sidra y el otro una ensalada de pollo). ^(76, 77) *Cryptosporidium* es infeccioso de manera inmediata una vez que pasa y se transmite de una persona portadora a otra que aún no lo es, y los quistes pasan usualmente en grandes cantidades si la persona es sintomática.

Contrario a lo reportado para *Cyclospora*, los ooquistes de *Cryptosporidium* son ubicuos en el medio ambiente y pueden contaminar fácilmente alimentos, en especial vegetales. En un estudio realizado, los ooquistes de *Cryptosporidium* fueron recolectados más frecuentemente de vegetales que los ooquistes de *Cyclospora*. ⁽⁴⁶⁾ Adicionalmente, *Cryptosporidium spp* en particular la que afecta a los humanos, presenta una gran variedad de huéspedes animales. ⁽⁷⁸⁾

Lo concerniente al o a los probables huéspedes potenciales para *Cyclospora* no ha sido resuelto. Organismos parecidos a este género han sido recolectados de patos, pollos, perros y primates. ⁽⁷⁹⁾

Para las otras especies animales mencionadas, los ooquistes recolectados, si es que efectivamente son ooquistes de *Cyclospora*, pueden haber estado pasando a través de estos hospederos.

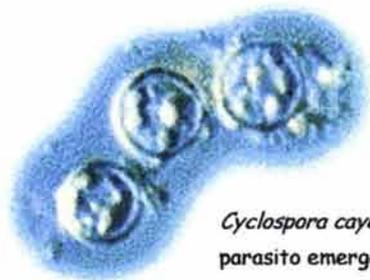
Algunos investigadores basándose en estudios moleculares, están firmemente convencidos que *Cyclospora* y *Eimeria* están estrechamente relacionados. ⁽⁸⁰⁾; diferentes autores han recomendado a los taxonomistas convencionales y moleculares, nombrar las especies en base de una combinación de características fenotípicas y genotípicas

Manifestaciones Clínicas

Después de la exposición al parásito, el período de incubación varía entre 1-11 días (7 en promedio). El comienzo de la enfermedad puede presentarse de manera abrupta así lo indican los pacientes en un 30% de los casos. Después de pocos días, las sintomatología aguda decae pero esta puede aparecer nuevamente (61% de casos) en una forma menguante y cerosa. El padecimiento puede durar entre 6 y 7 semanas, aunque se han reportado casos de 12 semanas de duración; en pacientes con VIH incluso perdura por varios meses.

Síntomas: ⁽⁵⁸⁾

- Diarrea acuosa (puede ser explosiva) con 6 evacuaciones por día. (algunos pacientes no presenta estos cuadros diarreicos).
- Anorexia
- Pérdida de peso (0.9-3.6 kg en un estudio)
- Fatiga pronunciada
- Calambres abdominales
- Eructos
- Inflamación abdominal
- Vómito
- Febrícula (25%)
- Flatulencia



Cyclospora cayetanensis un parásito emergente ⁽⁸²⁾

Figura 14

Patología

Un gran número de estudios histopatológicos se encuentran reportados, los cuales indican diversos cambios fisiopatológicos, entre ellos están: ⁽⁸³⁾

1. Deterioro en la absorción de D-xylosa. Esto compromete el funcionamiento del intestino delgado.
2. Biopsias del duodeno y yeyuno muestran atrofiadas las vellosidades con hiperplasia en las células de la cripta.
3. Inflamación de la lamina propia que va de suave a moderada, con un incremento en el número de las células plasmáticas.
4. Estudios realizados en Nepal han mostrado vacuolización céntrica, y cambio en las células epiteliales de columnares a cúbicas.
5. Los estudios realizados en Perú nos indican que ciertos cambios ocurren en: la última porción del duodeno y yeyuno, como un acortamiento y dilatación de las vellosidades, edema e infiltrado difuso de una mezcla entre mucosa y células inflamatorias. Parásitos sexuales y asexuales fueron observados en las vacuolas localizadas en el lumen terminal del epitelio del yeyuno.

Los signos vitales se presentan normales en la mayoría de los casos. La fiebre aunque escasa puede presentarse y si lo hace cursa más bien como febrícula de bajo grado. Si se presenta una deshidratación de moderada a severa, ocurren una serie de eventos que tienen como finalidad compensar al organismo, como por ejemplo una taquicardia y una presión sistólica menor a 90 mm Hg, y un decremento en el turgor de la piel lo que le da al paciente un semblante de debilidad y enfermedad.

Diagnóstico de *Cyclospora sp*

En el siguiente cuadro se enuncian las distintas patologías con que puede llegar a confundirse a la Ciclosporiasis de no hacerse un adecuado examen clínico que ponga de manifiesto las formas infectantes de esta parasitosis.

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ⁽⁵⁸⁾

- Criptosporidiosis
- Infecciones por *Escherichia Coli*
- Envenenamiento por alimentos
- Gastroenteritis Bacteriana
- Gastroenteritis Viral
- Giardiasis
- Isosporiasis
- Malabsorción
- Microsporidiosis
- Colitis pseudomembranosa

Diagnóstico de Laboratorio

- **Recuperación:** Son útiles las técnicas de concentración por flotación que usan como gradiente soluciones de sulfato de Zinc, sin embargo con estos métodos se puede producir deformación de la cubierta quística de *Cyclospora* con la subsecuente dificultad para la realización de la identificación morfológica. Las técnicas de flotación con gradiente de sacarosa también son efectivas, sin embargo el método más recomendable para concentración de los ooquistes es el de concentración por sedimentación-centrifugación en formol/acetato de etilo. ⁽⁶⁸⁾
- **Conservación:** El empleo de conservadores como formol, paraformaldehído, glutaraldehído o dicromato de potasio causan coalescencia de los gránulos que constituyen la mórula, dando lugar a un número variable de cuerpos irregulares mal definidos. La morfología interna de los ooquistes sólo se observa en materia fecal recién emitida, conservándose ésta, cuando las heces se mantienen en agua.

(68)

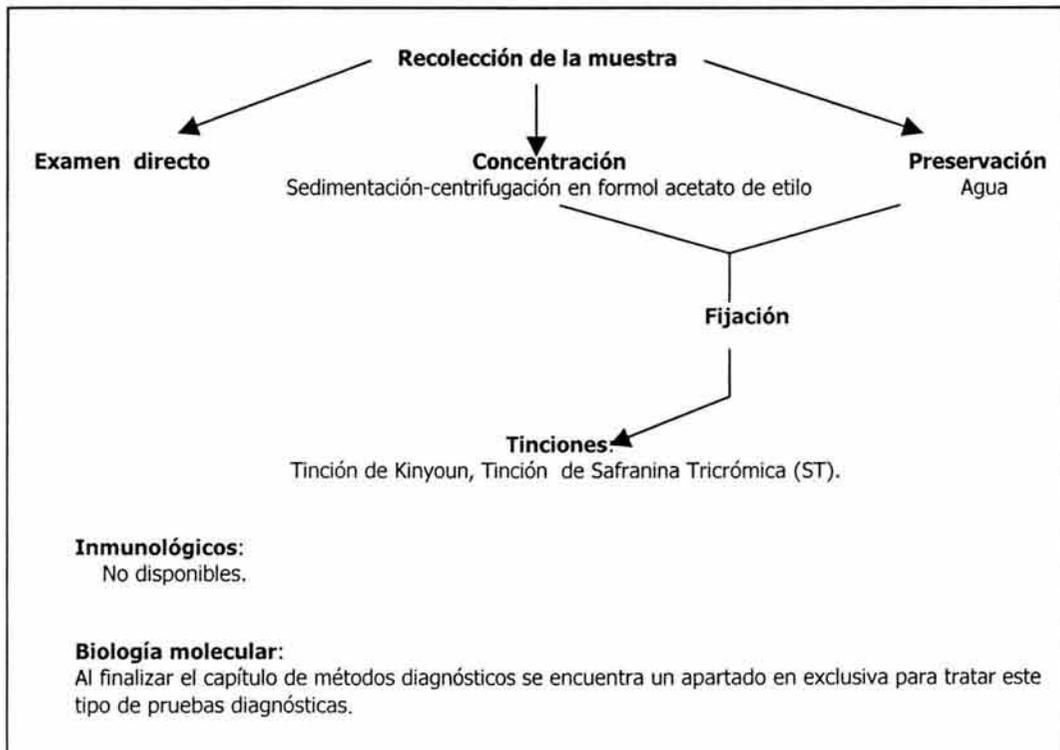
- **Exámen directo:** El examen directo en fresco de materia fecal es un método muy usado en la búsqueda de ooquistes de *Cyclospora*. En él las estructuras se observan de forma esférica de un tamaño superior a las de *Cryptosporidium* (8-10 versus 4-6 micrómetros de diámetro), en ellos se distingue una cubierta quística bien definida no refráctil, que ocasionalmente puede verse ligeramente dentada en uno de sus polos. ^(56, 60, 68)
- **Tinciones:** *Cyclospora cayetanensis* presenta una gran variabilidad tintorial, pudiendo observarse la presencia de abundantes ooquistes que no se tiñen o bien se tiñen débil o irregularmente sobre todo en infecciones intensas. Dentro de las tinciones utilizadas están la de Kinyoun, Ziehl-Neelsen o Safranina Tricrómica. Contraste de fases y Epifluorescencia ^(56, 60, 65, 68, 84, 85, 86) (la autofluorescencia es la habilidad de algunos organismos para emitir luz después de una excitación ultravioleta; *Cyclospora* presenta esta habilidad, en su caso, los quistes presentan una marcada autofluorescencia bajo la luz ultravioleta que rápidamente muestra las estructuras en el campo microscópico, presentando fluorescencia intensa de color azul-verdoso a nivel de la pared externa, sin presentarse esta en las estructuras internas; se ha reportado que el uso de una gota de yodo de Anthony en las preparaciones que van a ser sometidas a epifluorescencia, ayuda en la diferenciación de estructuras fluorescentes inespecíficas).
- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)** ha sido desarrollada como herramienta en la detección para este parásito. ⁽⁸⁷⁾
- Hasta el momento no se cuenta con un procedimiento o **técnica inmunológica** confiable que avale certeramente la detección de *Cyclospora*.
- Una determinación que arroje un valor negativo no es suficiente para el diagnóstico.

Otras pruebas:

- La Microscopía Electrónica ha sido utilizada para identificar a este organismo en muestras de biopsias del yeyuno y de algunos aspirados. Una biopsia distal duodenal así como una aspiración de especímenes revelan una aguda y crónica inflamación, hiperplasia de la cripta, desorden epitelial, y atrofia parcial de las vellosidades.

- **Técnicas de esporulación:** Debido a que *Cyclospora* puede ser confundida con diversos artefactos o algas verde-azules, se ha recomendado la esporulación de los ooquistes contenidos en heces mediante el uso de dicromato de potasio al 2.5% a temperatura ambiente, obteniéndose formas esporuladas en un período variable que va de 5 a 14 días. ^(56, 68) Los porcentajes de esporulación son muy variables, pudiendo ser menores del 50%. Mediante este procedimiento es posible observar la presencia de dos esporoblastos en el interior del ooquiste, los cuales contienen dentro de cada esporoblasto dos esporozoitos. Estos últimos son difíciles de observar ya que se encuentran firmemente adosados en el interior del esporoblasto. Los esporozoitos se pueden observar cuando se efectúa el desenquistamiento mediante inducción enzimática en un medio tamponado con tripsina y taurocolato. Esta metodología no es del todo práctica ya que el diagnóstico se retarda varios días y por lo tanto también el tratamiento específico. ⁽⁶⁸⁾

Para facilitar la comprensión de lo anteriormente expuesto se esquematiza en el siguiente esquema:



Prevención:

- El riesgo de adquirir Cyclosporiasis puede reducirse significativamente (mas no eliminarse) particularmente en los países en desarrollo si se adhieren las siguientes medidas a los hábitos de higiene de las personas:
 - Lavarse las manos con agua y jabón antes de consumir alimentos.
 - Beber únicamente agua purificada. No consumir agua de la llave o de algún otro depósito.
 - De no estar seguros de la calidad del agua a beber, hierva el agua para su consumo, aunque también puede recurrir a la cloración o utilización de yodo como método para desinfectar el agua, sin embargo no se asegura que todos los patógenos oportunistas puedan ser eliminados.
 - Lave sus frutas y verduras con agua purificada y cuando las pele hágalo después de haberse lavado perfectamente sus manos con agua purificada y jabón. Sin embargo cabe advertir que el solo lavado de frutas o verduras que no puedan ser peladas posteriormente no es capaz de remover la posible presencia de *Cryptosporidium* y *Cyclospora* por completo.
 - Las frambuesas y frutas parecidas a ella que se consumen en países en vías de desarrollo representan un riesgo constante para adquirir Cyclosporiasis y no pueden ser descontaminadas fácilmente.

4.1.5 ISOSPORIASIS

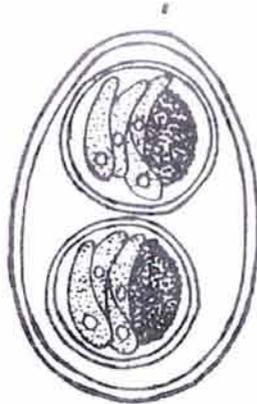
Isospora belli

Introducción

Las infecciones con *Isospora* se conocen desde 1860, y se ha estudiado a una gran variedad de especies de este género, ya que posee aproximadamente 200 especies. Fue descrito por primera vez en 1860 por Virchow, pero no fue denominado como tal hasta 1923; en 1915, se reportó el primer caso de infección en humano con *I belli*.⁽⁸⁸⁾

Sin embargo desde su reconocimiento hasta hoy día solo se conocen a dos especies como causantes de enfermedad en humanos *I belli* e *I hominis*.⁽¹⁸⁾

La característica de este género es que presenta dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoitos.



Representación gráfica de un
Ooquiste de *Isospora belli* ⁽⁸⁹⁾

Figura 15

Clasificación Taxonómica ⁽¹⁸⁾

Phylum: Apicomplexa

Clase: Coccidia

Orden: Eucoccidia

Familia: eimeriidae

Géneros: *Isospora* y *Cyclospora*

Morfología y Ciclo biológico

La infección se adquiere por ingestión del ooquiste esporulado a partir de agua y alimentos contaminados. El ooquiste se desenquista liberando esporozoítos en el intestino delgado que penetran a través de las células epiteliales de la mucosa intestinal del duodeno distal y de los enterocitos del yeyuno proximal donde se desarrollan en trofozoítos. Puede existir tanto una fase de desarrollo asexual como sexual en el interior de las células. Los trofozoítos por división nuclear dan lugar a esquizontes que sufrirán un proceso de endodiogenia para formar merozoítos los cuales invadirán nuevas células repitiendo el ciclo esquizogónico de multiplicación asexual. ^(18, 90)

Los merozoítos pueden sufrir una fase de desarrollo sexual dando micro y macrogamontes que producirán microgametos flagelados y macrogametos, que darán lugar al ooquiste. Esta fase se denomina gamogonia.

Los ooquistes formados son eliminados a través de las heces, madurando en el exterior en 2-3 días. La fase exógena del ciclo de vida de los coccidios se denomina esporogonia y corresponde a la producción de esporozoítos infectivos en el interior de los esporoquistes del ooquiste.

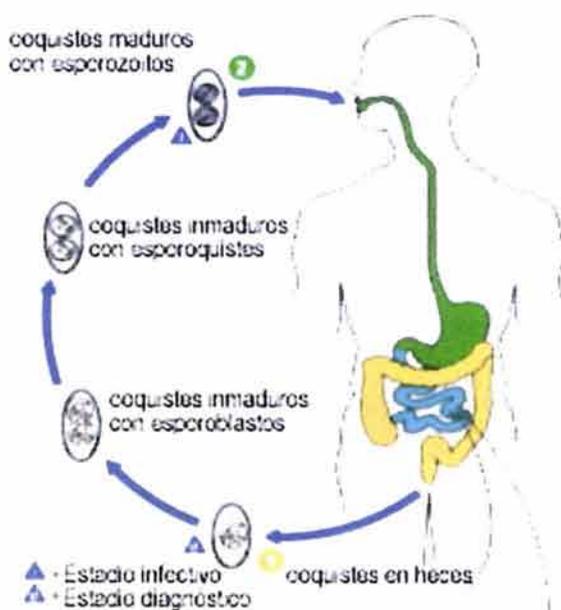


Figura 16. ⁽⁹¹⁾

El ciclo y las fases de desarrollo de *Isospora belli* pueden apreciarse en las figuras 16 y 17. ⁽⁹¹⁾

Excreción de un ooquiste inmaduro conteniendo un esporoblasto. ①. En una amplia maduración después de la excreción, el esporoblasto se divide en dos (el ooquiste ahora contiene dos esporoblastos); el esporoblasto secreta una pared quística que se convierte en esporoquistes, los cuales se dividen a su vez en dos para formar cuatro esporozoítos cada uno. ②. La infección ocurre tras la ingestión de esporoquistes conteniendo ooquistes.

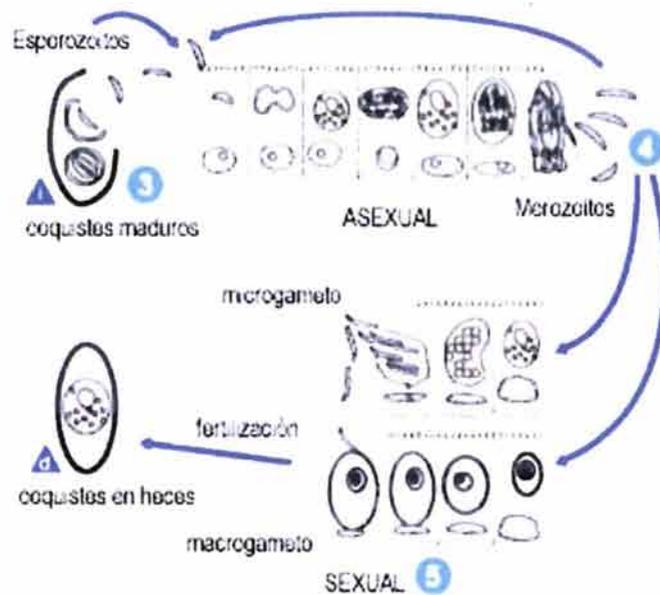


Figura 17 (91)

Los esporoquistes se desenvuelven en el intestino delgado liberando sus esporozoitos, los cuales invaden el epitelio celular e inician la esquizogonia. ③. Tras la ruptura de los esquizontes, los merozoitos son liberados e invaden nuevo epitelio celular, donde continúan la multiplicación de forma asexual ④. Los trofozoitos se desarrollan dentro de los esquizontes que contienen múltiples merozoitos.

Después de un período de por lo menos una semana, comienza la fase sexual de reproducción con el desarrollo de gametocitos sexuales. ⑤. La fertilización resulta en el desarrollo de ooquistes que son excretados al evacuar. ⑥. *Isospora belli* infecta tanto a humanos como a animales.

Todos los estadios, trofozoitos, esquizontes, merozoitos, gametocitos y ooquistes, son encontrados, desarrollándose de la misma manera en que lo hace *Cryptosporidium*. Aunque comparten similitudes, también encontramos diferencias entre estos dos parásitos *Isospora* y *Cryptosporidium*, como son: (18, 90)

- Isospora* se desarrolla en el citoplasma celular y como es más grande, se distiende deformando la forma de la célula.
- Isospora* se localiza por arriba, por debajo, o a un costado del núcleo.
- Al tiempo de la evacuación de las heces el ooquiste de *Isospora* no se encuentra esporulado y por lo tanto no es infeccioso.
- Isospora* requiere de una fase de desarrollo en el ambiente para adquirir su carácter infectante.

- e) Finalmente los ooquistes de *Isospora* miden poco mas de 33 μm , que es mas o menos siete veces el tamaño de *Cryptosporidium*. Al tiempo en que se evacúan las heces, los ooquistes de *I belli* presentan un único esporoblasto, la célula que desarrolla en dos esporoquistes en aproximadamente una semana a temperatura ambiente.

Los estadios de *Isospora* en los tejidos son más largos que en *Cryptosporidium*, y la morfología de estos estados de desarrollo son fáciles de determinar.

Los merozoitos son algunas veces, simples organismos únicos en el citoplasma celular midiendo aproximadamente de 2 x 5 μm , con un núcleo prominente. Los estadios de esporozoito para madurar a esquizonte y de merozoito a esquizonte son idénticos morfológicamente. Algunos merozoitos se desarrollan dentro de gametocitos.

Durante la esquizonogía, el organismo crece a un tamaño relativamente largo antes de comenzar su división nuclear, y en esquizontes maduros, los merozoitos son claramente delineados como estructuras elongadas con un único núcleo. El microgametocito contiene numerosos núcleos con cada uno correspondiendo a un microgameto. La identificación de uno o más de estos estadios es necesaria para el diagnóstico. ⁽⁹²⁾

Distribución Geográfica y Epidemiología

A lo largo de todo el mundo se han reportado infecciones por *Isospora* generalmente como casos esporádicos o como pequeños ramilletes de casos de estudios parasitológicos, pero debe aclararse que el interés en esta infección es pobre. ⁽⁹³⁻⁹⁷⁾

El hábitat de *Isospora belli* son las células epiteliales del intestino delgado. *Isospora* se adquiere del ambiente por ingestión de polvo o comida contaminada con polvo que contiene ooquistes. El agua puede jugar un papel importante en la transmisión pero epidemias por contaminación de agua potable con *Isospora* no han sido reportadas. *Isospora* es mas común en los trópicos que en zonas templadas y en áreas de pobreza donde la contaminación del ambiente con materia fecal humana es una práctica común.

Isospora es difícil de detectar en las muestras clínicas porque es sumamente delicada y traslúcida. Su detección requiere de una discreta iluminación del campo microscópico, el cual no se practica comúnmente en un análisis de rutina. Es por esta razón que no se le reporta en la mayoría de los estudios parasitológicos intestinales, se requiere de un especial interés y de una búsqueda especial antes de ser encontrado.



Ooquiste de *Isospora belli* con 2 esporoblastos. Imagen cortesía de la División de Enfermedades Parasitarias del Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas. (CDC), Atlanta, Georgia

Figura 18 ⁽⁹¹⁾

El interés de *Isospora* hoy día es por la prevalencia entre individuos afectados de VIH en quienes provoca una gastroenteritis crónica, en países en desarrollo se ha reportado en porcentajes de afectados entre 3 y 19 %. ⁽⁹⁶⁾

Ya que no ocurre una transmisión a través de las heces frescas, la diseminación del organismo entre la población gay u homosexual no ocurre.

I. belli es altamente específica con relación al huésped y no ha sido encontrada en el intestino de animales.

Manifestaciones Clínicas

Muchos pacientes son asintomáticos otros presentan manifestaciones que consisten principalmente en una diarrea autolimitada y suave, molestias abdominales, y febrícula que dura aproximadamente una semana.

En pacientes inmunosuprimidos, *Isospora* es una infección de carácter oportunista clínicamente indistinguible de la Cryptosporidiasis. Produce una enfermedad crónica con

diarrea que puede durar hasta un mes o más; dolor y calambres abdominales difusos, náusea, y pérdida de por lo menos 10 % del peso corporal en un período de 2 meses anterior al diagnóstico. ⁽⁹⁴⁾ El número de las evacuaciones varía entre 5 y 15 por día, después de las cuales puede ocurrir una severa deshidratación. Síntomas de una mala absorción pueden ser detectados en algunos pacientes bajo investigación. En algunos pacientes la enfermedad puede durar hasta 20 años con intermitencia.

La Isosporidiasis se tiene identificada como una infección crónica en individuos con el virus tipo I de leucemia de células T. ⁽⁹⁵⁾

Signos y Síntomas

- Diarrea profusa, acuosa, sin sangre, que puede llegar a contener algo de moco, y de olor penetrante.
- Calambres y dolores abdominales, vómito.
- Malestar generalizado, anorexia, pérdida de peso.
- Fiebre moderada.
- Esteatorrea en casos prolongados

Para algunos investigadores, los síntomas de Isosporiasis sugieren un mecanismo de infección mediado por una toxina, pero ningún elemento de este tipo ha podido ser identificado.

Diagnóstico Diferencial ⁽⁸⁸⁾

- Amibiasis y Giardiasis
- Cryptosporidiosis
- Diverticulitis
- Gastroenteritis esonoflica
- Inflamación intestinal
- Daño intestinal generalizado
- Síndrome del intestino irritable
- Strongyloidiasis
- Colitis Ulcerativa

Otros problemas relacionados:

- Linfoma Intestinal

Diagnóstico de *Isospora sp*

El diagnóstico se basa en una combinación de pruebas clínicas, epidemiológicas y de laboratorio.

El examen directo de las heces frescas o concentradas es el método de detección de la infección por *I. belli*, puesto que los ooquistes son visibles al microscopio óptico sin teñir. Es frecuente la aparición de cristales de Charcot-Leyden. ⁽¹⁸⁾

Los coccidios se identifican a nivel de especie por la estructura de su ooquiste esporulado. En las heces recién emitidas los ooquistes son ovalados, de 20-33 μm por 10-19 μm y, generalmente, contienen uno o dos esporontes inmaduros. El ooquiste maduro, que a su vez incluye dos esporoquistes con cuatro esporozoítos cada uno, aunque se desarrolla en el medio externo, puede ocasionalmente observarse en las heces, siendo la forma infecciosa para el hombre.

Los métodos de concentración son más sensibles que los exámenes directos sobre heces frescas, siendo el método de flotación de Sheater un método excelente para la detección de *I. belli*. Algunos conservadores como el alcohol polivinílico pueden deformar la pared del ooquiste siendo difícil de observar su estructura. ^(53, 55, 90, 98, 99)

Los métodos de tinción sobre frotis de muestras concentradas pueden ayudar a la detección de los ooquistes de *I. belli*. La tinción de ácido-alcohol resistente modificada (Ziehl-Neelsen modificado) tiñe los ooquistes de rosa y los esporontes o esporoblastos de rojo.

Técnicas de Tinción:

- Tinción fluorescente de Auramina-rodamina
- Tinción Kinyoun alcohol ácido-resistente modificada
- Tinción Safranina Tricrómica
- Microscopía ultravioleta autofluorescente

Los ooquistes también se tiñen mediante el método de la auramina-rodamina, apareciendo fluorescentes. Con la tinción de Giemsa los ooquistes y esporoblastos se tiñen de azul mientras que la tinción tricrómica es de poca utilidad para identificar *I. belli*. En la figura 19 se puede observar un ejemplo de tinción para preparaciones con *Isospora belli*.

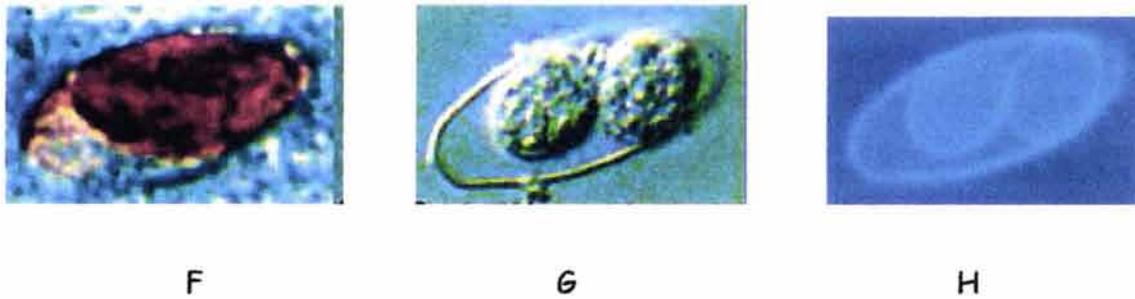
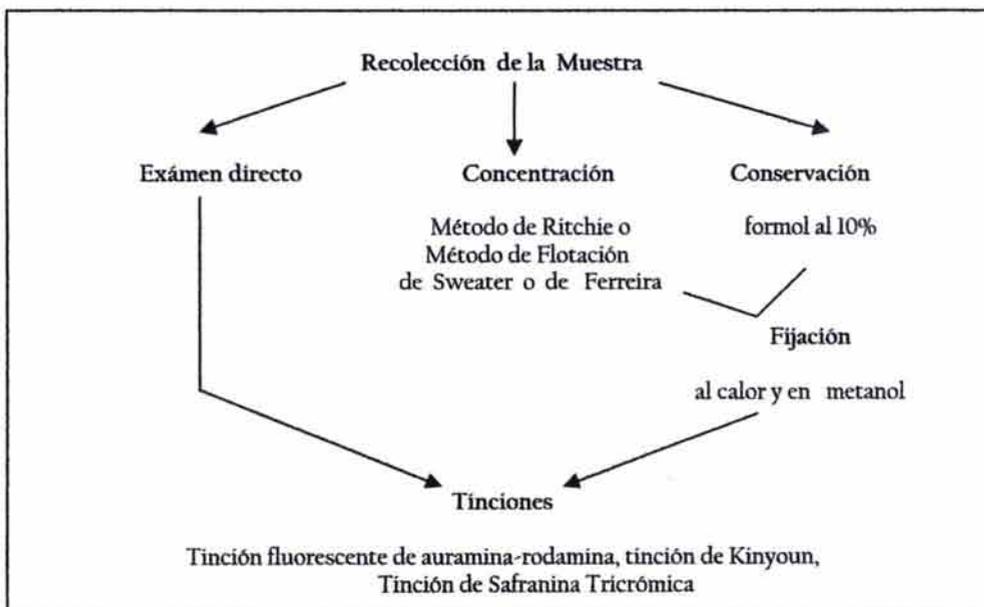


Figura 19. ⁽⁸⁸⁾

Ooquistes de *Isospora belli*, pueden ser visualizados mediante epifluorescencia en preparaciones en fresco como se muestra en la figura 2. Preparaciones teñidas con la tinción ácido resistente (2F), Sin teñir y observada bajo microscopia de contraste (2G) y Epifluorescencia (2H).

A continuación se muestra un esquema de indica cómo analizar las muestras que se sospechan contienen a *Isospora*. ^(53, 55, 90, 98-102)



En el cuadro 6 se hacen una serie de consideraciones relativas al diagnóstico de laboratorio.

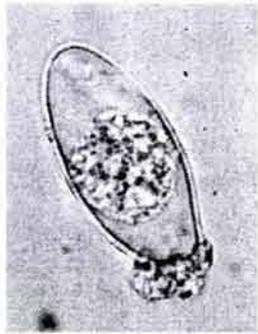
Cuadro 6

Consideraciones importantes en el diagnóstico de laboratorio de las infecciones por *Isospora belli*.

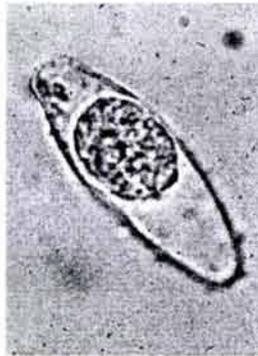
- Los ooquistes son más fácilmente reconocidos e identificados en los exámenes en fresco (ya sea con o sin concentración)
 - La fijación de las heces con alcohol polivinílico (APV) puede dificultar la identificación de los ooquistes de *I. belli*, por alteraciones en la pared.
 - La observación de ooquistes con tinción de auramina-rodamina, debe ser confirmada siempre mediante la observación de los ooquistes en fresco o tras tinción que demuestre la ácido-alcohol resistencia (Ziehl-Neelsen modificado, Kinyoun).
 - Cristales de Charcot-Leyden pueden ser observados en las muestras.
 - Leucocitos Polimorfonucleares (PMNs) no se han observado en muestras clínicas.
-

Los aspirados duodenales y las muestras de biopsia de intestino delgado pueden utilizarse cuando existe sospecha de infección por *I. belli* y los exámenes de las heces son negativos.

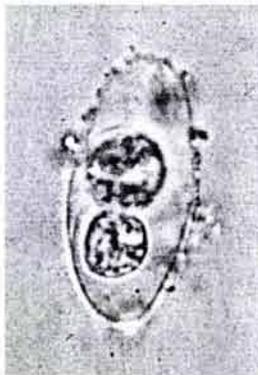
Los ooquistes de *I. belli* se observan en los aspirados duodenales, mientras que en las muestras de biopsia pueden identificarse distintas fases de desarrollo del parásito mediante tinciones histológicas, o bien observarse lesiones características. Los principales cambios microscópicos son la atrofia de las vellosidades y la hiperplasia de las criptas, pudiendo existir gran número de eosinófilos en la lámina propia, junto con células plasmáticas, linfocitos y leucocitos polimorfonucleares. No existen pruebas serológicas disponibles para diagnosticar la infección



A



B



C

Ooquistes de *Isospora belli*. Los ooquistes son largos (25 to 30 μm) y de típica forma elipsoidal. Cuando son excretados, lo hacen en forma inmadura conteniendo un esporoblasto.

(A, B). El ooquiste madura después de la excreción: el esporoblasto se divide en dos (C), el cual desarrolla una pared quística y se convierte en esproquiste, el cual eventualmente contiene hasta cuatro estporozoitos cada uno.

Figura 20 ⁽⁸⁸⁾

4.2 MICROSPORIDIOSIS

Introducción

Los reportes de la existencia de organismos pertenecientes a *Microspora* datan del siglo pasado, infecciones por microsporidios han sido reconocidas durante décadas. En 1857 fueron identificados en animales y no fue hasta 1959 ⁽¹⁰³⁾ que un microorganismo perteneciente a este género *Encephalitozoon sp* fue reconocido como patógeno potencial en humanos.

Todo el género ***Microspora*** esta compuesto de organismos obligatoriamente intracelulares. Se caracterizan por la presencia de diminutas esporas, dentro de las cuales se halla un dispositivo que expulsa las formas infectivas hacia el interior de la célula. Cuentan también con uno o dos núcleos rematados y contiguos, tienen ribosomas 70s y por lo menos un estrato de quitina en la pared de las esporas. ⁽¹⁰⁴⁾

Más de 900 especies pertenecen a este Phylum, y se sabe también que causan infecciones en la mayoría de los animales (abejas, peces, mosquitos, pulgas, saltamontes, roedores, conejos y una gran variedad de mamíferos).

La clasificación se basa en el tamaño, en el arreglo del núcleo, en el modo de división y en asociación de las formas proliferativas dentro de la célula hospedadora. Para una subclasificación de *Microspora* se ha acordado hacerlo en dos partes: una de ellas la *Microsporea* que contiene al orden *Microsporida*, que incluye todos los géneros y especies que afectan a los humanos. ⁽⁷⁰⁾ A su vez *Microsporidia* presenta dos grupos: uno en el cual las esporas están formadas de manera individual en la célula, el *Apansporoblastina*, y la otra en la cual las esporas se desarrollan en paquetes al interior de vesículas o membranas, la *Pansporoblastina*. ⁽¹⁰⁴⁾

Cuadro 7 ^(104, 105)

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA (Géneros de importancia médica)	
Reino Subreino Phylum Subphylum Orden Géneros	Protista Protozoa Microspora Microsporidea Microsporida <i>Encephalitozoon sp, Enterocytozoon sp,</i> <i>Nosema sp, Pleistophora spp</i>

Existen al menos 14 especies que han sido identificadas como patógenas para los seres humanos: *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis**, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Pleistophora sp.*, *Trachipleistophora hominis*, *T. anthropophthera*, *Nosema ocularum*, *N. algerae*, *Vittaforma corneae*, *Microsporidium ceylonensis*, *M. africanum*, *Brachiola vesicularum*, *B. Connori*

* *Encephalitozoon intestinalis* fué clasificado previamente bajo el nombre de *Septata intestinalis*, pero se le reclasificó como *Encephalitozoon intestinalis* en base a la similitud en morfología, antigenicidad y niveles moleculares con las otras especies de este género.

Actualmente (hasta el año 2000) los más reportados y que cobran notable importancia son los siguientes 6 géneros: ⁽¹⁰⁴⁾

- *Enterocytozoon* (*E. bieneusi*)
- *Encephalitozoon* (*E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*)
- *Pleistophora sp.*
- *Trachipleistophora* (*T. Hominis*, *T. Anthropophthera*)
- *Nosema* (*N. Connori*, *N ocularum*)
- *Vittaforma* (*V. corneae*)

La **morfología general** de la espora y **el ciclo de vida** de ***Microsporidia*** que afecta a los humanos es algo similar en todas las especies. ⁽¹⁰⁴⁾ Las esporas oscilan en tamaño entre 1 y 4 micras, son usualmente ovaladas y tienen una pared relativamente gruesa. Dentro de la espora la estructura más sobresaliente es el filamento polar espiralado, el cual se origina desde el disco de unión. El filamento polar está estrechamente enroscado, formando así numerosas curvas en una o dos hileras. Poseen también un aparato de extrusión constituido por un disco de anclaje, poseen un túbulo polar, un polaroplasto lamelar y un polaroplasto tubular. El esporoplasma se encuentra en

el polo opuesto al disco de unión, con uno o dos núcleos, dependiendo de la especie de que se trate. La presencia de un gránulo PAS-positivo en el extremo anterior de la espora también es característico de los microsporidios, pero no es muy fácil identificarlo en esporas muy pequeñas. ⁽¹⁰³⁾ Las esporas se forman y maduran intracelularmente. Cuando maduran las esporas, al ser expulsadas, se valen del filamento polar para atravesar y abrirse paso en la membrana celular de las células del huésped, así como en las células aledañas, y entran al citoplasma para transferir el esporoplasmo. Una vez que el esporoplasmo se localiza en una nueva célula, se transforma en un meronte y comienza a crecer. En algunas especies, el meronte está en contacto directo con el citoplasma celular, en otras crece dentro de una vacuola o una cisterna definida. El crecimiento y multiplicación del meronte se conoce como Merogonia, que es resultado de la producción de esporontes que se diferencian en esporoblastos y finalmente en esporas. ⁽¹⁰⁶⁾ Las Esporas maduras son eliminadas con las heces fecales y otras secreciones del huésped. Estas esporas están listas para entrar en otro huésped susceptible ya sea por la boca o por vía respiratoria o en contacto directo con superficies mucosas.

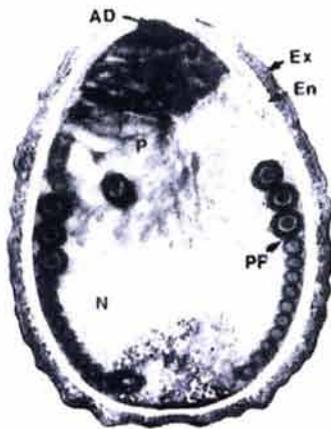


Figura 21 ⁽¹⁰⁷⁾

Micrografía electrónica de una espora de microsporidia que muestra las secciones transversales del tubo o filamento polar (PF). Entre otras notables estructuras están: el disco de anclaje (AD), polaroplasto (P), exospora (Ex), endospora (En), núcleo (N), y la vacuola posterior (Pv).

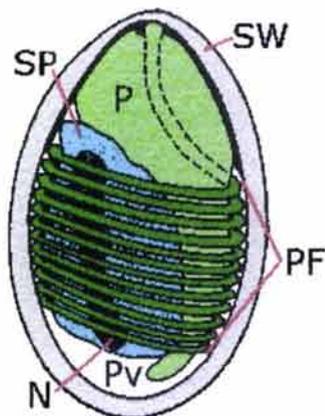


Figura 22 ⁽¹⁰⁷⁾

Representación esquemática de una espora de Microsporidia, que muestra al esporoplasmo (SP), núcleo (N), polaroplasto (P), filamento polar (PF), vacuola posterior (Pv) y pared de la espora (SW).

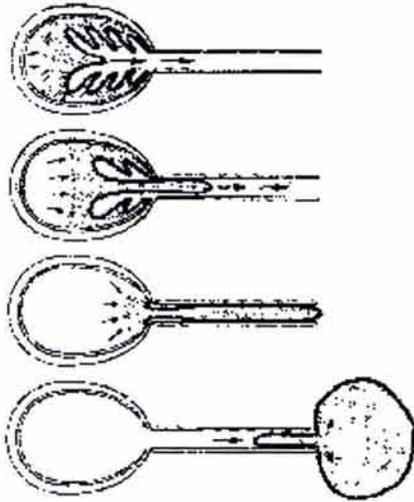


Figura 23 (107)

Representación esquemática de la germinación de la espora que nos muestra como el polaroplasto forma la membrana plasmática del esporoplasmo emergente y la posible participación de la presión osmótica.

Ciclo Biológico de *Microsporidium spp*

En la figura que a continuación se muestra, se esquematiza el ciclo biológico general para microsporidia, y que puede presentar variaciones según la especie. Pero fundamentalmente consta de tres fases: a) infectiva, b) proliferativa y c) esporogónica. (108)

a) La forma infectiva de *Microsporidia* es la espora, que es capaz de sobrevivir por largo tiempo en el ambiente. ❶. La espora pone al exterior su filamento polar que le permite asirse e infecta a la célula huésped, ❷. La espora inyecta el esporoplasmo al interior de la célula a través del tubo polar ❸.

b) Una vez adentro el esporoplasmo comienza una extensa multiplicación llamada Merogonia (fisión binaria) o Esquizogonia (fisión múltiple) ❹. Este desarrollo puede ocurrir en contacto directo con el citoplasma celular o dentro de una vacuola especial.

c) Los Microsporidios se transforman por Esporogonia en esporas maduras, ❺. Durante la esporogonia se forma una capa gruesa alrededor de la espora que le provee resistencia bajo condiciones ambientales adversas. Cuando la espora se incrementa en número y llenan el citoplasma celular, la membrana celular se rompe y libera las esporas hacia sus alrededores ❻. Estas esporas maduras tiene la capacidad de volver a infectar nuevas células y continuar con el ciclo.

Ciclo Biológico de *Microsporidium sp*⁽¹⁰⁸⁾

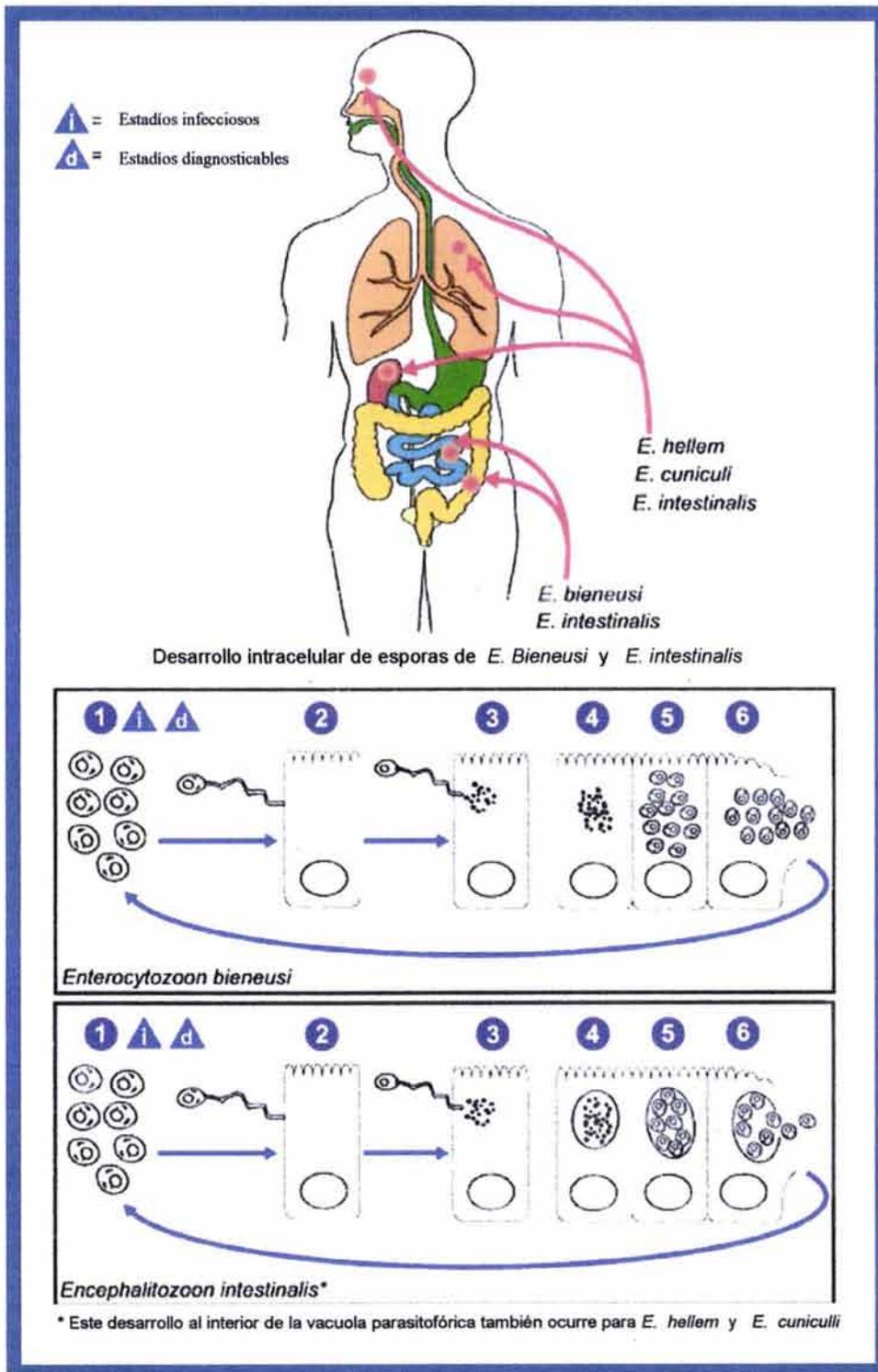


Figura 24

Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas que ocurren en la Microsporidiosis son diversas y varían de acuerdo al agente causal que las produce. De un modo general pueden resumirse en el cuadro ocho. ^(109, 110)

Cuadro 8

Especies de Microsporidios	Manifestaciones Clínicas
<i>Enterocytozoon bienersi*</i>	Diarrea, Colecistitis
<i>Encephalitozoon intestinalis</i> (syn. <i>Septata intestinalis</i>)	Infección en el tracto GI causando diarrea, y diseminación a los ojos, y al tracto genitorinario y respiratorio
<i>Encephalitozoon hellem</i> y <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	Keratoconjunctivitis, infección del tracto genitourinario y respiratorio, e infección diseminada.
<i>Vittaforma corneae</i> (syn. <i>Nosema corneum</i>), <i>Nosema</i> spp. (<i>N. connori</i> y <i>N. ocularum</i>)	Infección Ocular
<i>Trachipleistophora hominis</i> y <i>Pleistophora</i> sp.	Infección Muscular
<i>Microsporidium</i> (<i>M. ceylonensis</i> y <i>M. africanum</i>)	Infección de la córnea

Las vías de transmisión que se han propuesto para el parásito son principalmente el fecalismo y la vía respiratoria. Las edades afectadas con mayor frecuencia comprenden entre los 30 y 40 años predominando en varones homosexuales con SIDA o alguna otra inmunosupresión importante. ⁽¹⁰³⁾

Microsporidiosis ocular

De las 13 especies causantes de patología en el hombre, hasta el momento solo 7 han sido aisladas en pacientes con manifestaciones oculares presentes en el segmento anterior del ojo, en donde se producen lesiones superficiales o profundas de la córnea, estas especies son: ⁽¹¹¹⁻¹¹⁴⁾

- *Vittaphorma corneae*
- *Encephalitozoon cuniculi*
- *Microsporidium ceylonenesis*
- *Trachipleistophora homini*
- *Encephalitozoon hellem*
- *Nosema ocularum*
- *Microsporidium africanum*

En la infección ocular se postula un mecanismo de transmisión directa a través de las manos contaminadas con orina, heces o secreción nasal de pacientes que presentan microsporidiosis.

Frecuencia

En los Estados Unidos de Norteamérica la mayor parte de casos reportados de microsporidiosis se encuentran en adultos con alguna inmunosupresión, especialmente en paciente con HIV. De acuerdo a diversos estudios epidemiológicos *E. bienewisi* se le detecta entre un 15-34% de pacientes con SIDA y que presentan a la vez un cuadro crónico de diarrea.⁽¹¹⁵⁾ Sin embargo Norte América no es la única afectada, ya que se considera que Microsporidia posee una distribución mundial, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo encontrándose en poblaciones mixtas de inmunocompetentes e inmunosuprimidos en por lo menos en 4 de los 5 continentes (América, Asia, Europa y África).

4.2.1 *Encephalitozoon sp*

El género *Encephalitozoon* se desarrolla dentro de vacuolas en la célula, produce dos esporas de un esporante binucleado, y origina esporas con un solo núcleo. Las esporas varían de 1 a 1.5 μm y de 2 a 4 μm , dependiendo de la especie, y posee entre 5 o 6 roscas o espirales colocadas en una hilera de un tubo polar.⁽¹⁰⁵⁾ A este género pertenecen tres especies:

- ***E. cuniculi***
- ***E. hellem***
- ***E. intestinalis***

Las tres son idénticas bajo la luz del microscopio, y solo pueden ser diferenciadas gracias a técnicas moleculares. Las tres se consideran patógenas para el ser humano.

Encephalitozoon cuniculi

Se encuentra tanto en animales como en humanos, en las células epiteliales, lo que indica que presenta una baja especificidad. En animales la infección puede producir encefalitis y nefritis, pero el parásito puede ser encontrado en cualquier órgano, incluyendo la placenta.

Ciclo Biológico

Las esporas son eliminadas con la orina, heces y esputo. Una vez en el ambiente, estas son transportadas hacia otros huéspedes, aunque el modo exacto de transmisión aún se desconoce. La vía oral mediante la ingestión de comida contaminada por materia fecal u orina de animales enfermos, o los hábitos alimenticios carnívoros son las vías más probables en los animales. La infección en los humanos puede ser adquirida de modo similar, pero no hay datos registrados disponibles al respecto. Una vez que se hayan dentro del organismo, los parásitos llegan hasta el intestino, la forma en como lo hacen, no está bien determinada. Se ha sugerido que en la pared intestinal, los parásitos son fagocitados por macrófagos que fungen como transportadores hacia otros órganos. Experimentalmente se ha observado que cuando la ruta de entrada es la oral, el primer órgano afectado es el hígado. Por otro lado si la vía es intraperitoneal, probablemente las células del mesotelio son infectadas, ya que la ascitis es la principal y primer manifestación. ⁽¹⁰⁴⁾

Distribución geográfica y Epidemiología

La distribución geográfica de *E. cuniculi* es bastante amplia en animales, pero en humanos existen pocos datos documentados, la mayoría de estos reportes hacen referencia a los Estados Unidos de Norteamérica. ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾

Se han realizados estudios serológicos para detectar la prevalencia del parásito en cuestión, así las cosas, en Malasia se encontró una alta incidencia ante la infección, ⁽¹¹⁹⁾ y también en otras regiones de clima tropical. Sin embargo se han reportado casos en donde el clima tropical no es precisamente el factor común, sino otros, como individuos con VIH y homosexuales. ⁽¹¹⁶⁾ Lo que sugiere por el último, que una vía común de transmisión es la fecal – oral. Otros reportes indican un aumento de casos en aquellas personas que viajan constantemente a lugares tropicales desarrollan infecciones por microsporidiosis. ⁽¹²⁰⁾

Patogenicidad

La forma en la que el parásito desarrolla la enfermedad en el hombre, es incierta. Observaciones con microscopio electrónico revelan la destrucción celular. Pero se sabe también que en general los microsporidiosis presentan una baja virulencia, y todas la infecciones ocurren entonces en pacientes inmunosuprimidos.

Desde la identificación de este parásito, se le relacionó con diversas patologías, pero dadas las técnicas de análisis, no se podía corroborar la identidad del microorganismo en todas ellas. Actualmente con la metodología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se puede estar seguro de la identidad de este agente y su relación en pacientes con SIDA. ⁽¹¹⁷⁾

Nefritis Intersticial debida a
Encephalitozoon cuniculi



Imagen: Mark Collett
Massey University, Institute of Veterinary,
Animal and Biomedical Sciences.

Figura 25 ⁽¹²¹⁾

Nefritis con esporas de *Encephalitozoon cuniculi*

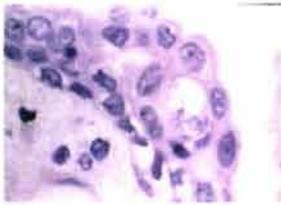
Tinción: Gram



Imagen Mark Collett
Massey University, Institute of Veterinary,

Figura 26 ⁽¹²¹⁾

La infección en pacientes inmunosuprimidos es general. Muestra de ello es el reporte de un paciente masculino de 34 años de edad, homosexual, inmunocomprometido y que presento cuadros de fiebre durante 4 meses, sudor nocturno, tos, y pérdida de peso. Presentaba una cuenta de linfocitos-T CD4⁺ de 15 células por mililitro cúbico. Además el paciente se quejaba de una pobre agudeza visual, congestión nasal, tos y ulceraciones en la lengua. De la biopsia que se le realizó se observó bronquitis y neumonía con numerosos microsporidios en las células epiteliales de los bronquios, así como infiltración de células polimorfonucleares. ⁽¹²²⁾ De igual forma se encontraron microsporidios en las fosas nasales, en las ulceraciones de la lengua, en la orina y esputo.



Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* en epitelio
Tinción: Hematoxicilina y Eosina
Imagen: Mark Collett .
Massey University, Institute of Veterinary, Animal
and Biomedical Sciences

Figura 27 ⁽¹²²⁾

Encephalitozoon hellem

Fué descrito por primera vez en 1991 de un tejido ocular de un paciente con SIDA. ⁽¹¹¹⁾ Morfológicamente es muy similar a *E. cuniculi*. Sin embargo es posible determinar una diferencia con ayuda del microscopio electrónico, una densa capa sobre la superficie tanto del esporonte, del esporoblasto y de la espora. Para el caso de *E. hellem*, esta capa se deposita paulatinamente de manera más gruesa a lo largo de los estadíos. Y en el caso de *E. cuniculi* las mismas deposiciones, comienzan hacerse discontinuas, angostas hasta que finalmente se fusionan. ^(104, 111, 123-124) Esta es la diferencia que permite distinguir entre estas dos especies.



Esporas de *Encephalitozoon hellem* de un cultivo celular que muestran el tubo polar expulsado y teñido mediante microscopia de fluorescencia indirecta que utiliza anticuerpos policlonales de conejo.

Figura 28 ⁽¹⁵⁶⁾

Patogenicidad

No se conocen a la fecha los mecanismos por los cuales *E. hellem* produce enfermedad en los seres humanos, tampoco se disponen de datos experimentales en animales. De hecho los únicos datos de infección reportados son en humanos VIH positivos e inmunosuprimidos. ^(112-113, 125)

Es en esos pacientes en donde se han encontrado cuadros como querato-conjuntivitis, queratitis, sinusitis.

La afección ocular es bilateral y compromete a las células epiteliales de la córnea y conjuntiva. Puede cursar de manera asintomático y ser detectada únicamente bajo un análisis rutinario oftalmológico. La afección se vuelve crónica y puede desarrollarse lentamente produciendo fotofobia, visión borrosa y malestar. Es entonces cuando el paciente acude al médico, el cual bajo exploración observa una cornea erosionada sin uveítis; y ocasionalmente pueden encontrarse infecciones bacterianas asociadas. ⁽¹¹⁴⁾

Cuando la enfermedad logra diseminarse en el organismo, podemos encontrar cuadros de bronquitis, daño a los riñones, uréteres, vejiga y glándula prostática con formación de abscesos.

De allí que las muestras para el análisis del laboratorio se recojan de orina, esputo, secreciones nasales y conjuntivales.

Encephalitozoon intestinalis

Este parásito se distingue por dos características: ⁽¹²⁶⁾

- a) por el desarrollo del mismo en el interior de vacuolas de enterocitos, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales, en las cuales cada estado se desarrolla dentro de una cámara separada por un septo;
- b) por el desarrollo de células binucleadas o tetranucleadas.

Las esporas en su estado maduro presentan las siguientes dimensiones: 2.0 por 1.2 μm , y el microtúbulo tiene de 4 a 7 roscas, comúnmente 5.

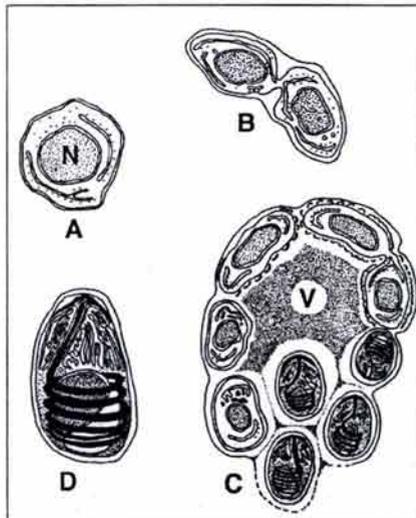


Figura 29

Encephalitozoon intestinalis. ⁽¹⁰⁹⁾

A y B. Estados monocucleares tempranos

C. Multiplicación del parásito (Merogonia) y producción de esporas (Esporogonia) ambas ocurren dentro de vacuolas parasitofóricas

D. Espora madura

Patogenicidad

A *E intestinalis* se le ha reportado junto con *E bienewisi* lo que indica que ambos parásitos cursan comúnmente en la misma infección. Sin embargo se considera que *E. intestinalis* es mucho más invasiva de ahí que se presenten cuadros diseminados que involucran la vesícula biliar, el tracto urinario y respiratorio. Se le ha aislado en prácticamente cualquier área del intestino en pacientes con SIDA que pueden presentar o no cuadros diarreicos. ⁽¹²⁷⁾

Puede originar nefritis, queratitis, enteritis colangitis, cistitis e infección diseminada, similar a la que se produce con otras especies del género *Encephalitozoon*. También se ha encontrado a este parásito en órganos más profundos y probablemente esto se deba a que los microorganismos viajan a través de monocitos en el torrente sanguíneo de la pared intestinal hacia otros órganos. ^(56, 128-130)

Las características histológicas más sobresalientes, son que cuando se trata de *E. intestinalis*, encontramos numerosos cuerpos eosinófilos de 1 a 2 micras al interior de vacuolas citoplásmicas que se tiñen adecuadamente con hematoxilina y eosina. Las células comúnmente afectadas son las del epitelio de cualquier porción del intestino, ductos biliares, túbulos renales, urotelio, bronquiolos pulmonares, córnea y conjuntiva. En la afección intestinal los parásitos se encuentran agrupados dentro de vacuolas localizadas en el citoplasma apical de enterocitos. ⁽¹³¹⁾

Síntomas

Diarrea crónica, fiebre, colangitis, sinusitis, bronquitis y conjuntivitis bilateral. Individuos que presenta un cuadro severo muestran una cuenta de linfocitos T CD4⁺ por debajo de 100 células por mililitro cúbico. (104, 109, 132, 133)

Diagnóstico

Observaciones cuidadosas del parásito bajo aceite de inmersión muestran birefringencia producida por la pared de las esporas y la vacuola de la espora en uno de sus polos.

El parásito se tiñe con Giemsa, Tinción Tricrómica, Tinción ácida de Schiff, Gram y metamina de plata. (104, 109)

4.2.2 Enterocytozoon sp

Enterocytozoon bienewisi

En 1984 se realizó la primera observación de este microorganismo, que aún no estaba clasificado, y ni siquiera nombrado. Fue hasta un año después que se creó el nuevo género y especie del mismo; se le reconoció como un enteroparásito que produce diarrea en pacientes con HIV⁽¹³⁴⁾, es en esos casos donde la prevalencia está por arriba de un 30%; sin embargo se han reportado otros, entre ellos a) Paciente adulto inmuno competente en un cuadro clásico de "diarrea del turista"⁽¹³⁵⁾, b) Paciente de origen africano, infantil (año y seis meses de edad) inmuno competente.

Enterocytozoon no ha sido encontrado en animales, y los esfuerzos para cultivarlo en condiciones de laboratorio se han logrado de un modo parcial. Este microorganismo ha sido reconocido gracias a la epidemia mundial de SIDA. Se encuentra bien adaptado a los humanos, presenta una baja virulencia, produciendo afecciones subclínicas o sintomáticas.

(136)

Ciclo Biológico

Es muy similar al de otros microsporidios, excepto por la forma de crecimiento y división de las esporas. *E. bienewisi* no se encuentra dentro de una vacuola, se desarrolla en estrecho contacto con la célula citoplásmica en los organelos.

Las esporas son de forma ovalada, aprox 0.5 micras de diámetros. Una vez que la espora inyecta el esporoplasmo al interior de la célula, el parásito comienza su división esporogónica, creciendo considerablemente hasta desarrollarse en una forma multinucleada conocida como el estado proliferativo de fase plasmodial. El trofozoito plasmodial está rodeado por la mitocondria y se localiza cerca del ápice terminal del núcleo, lo que produce una deformación que es característica de estos microorganismos y algunos otros del género *Encephalitozoon*. Conforme crece el parásito, el citoplasma muestra ribosomas, retículo endoplásmico y pequeñas cantidades de membrana. Al mismo tiempo los microtúbulos comienzan a crecer, los cuales se amontonan en dos hileras de tres roscas cada una, finalmente el parásito se separa, como individuo que continúa madurando en esporas. ⁽¹³⁷⁾

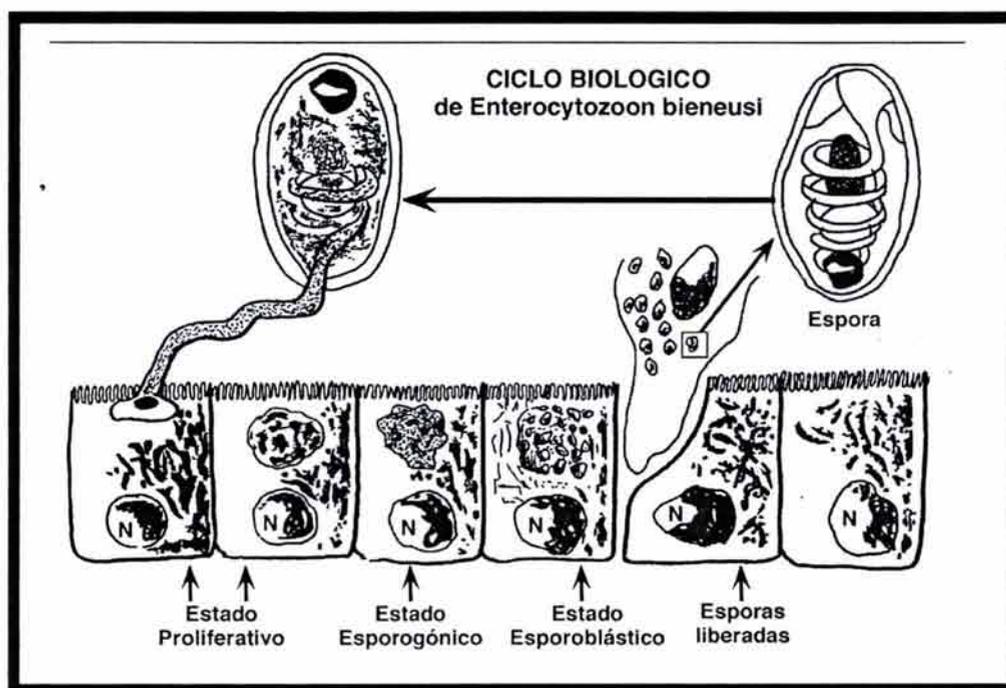


Figura 30 ⁽¹³⁹⁾

A *E. bienewisi* se le ha encontrado en cuadros diseminados en pacientes inmunosuprimidos donde se le investigue; incluso en individuos inmunocompetentes ha sido reportado en estudios serológicos, lo que sugiere que es una infección común en casi cualquier individuo ⁽¹¹⁸⁾, las diferencias las hacen la virulencia que presenta en estos dos grupos tan distintos.

Manifestaciones clínicas

- Diarrea inespecífica de carácter crónico en pacientes HIV positivos sin tratamiento efectivo.
- Daño pulmonar caracterizado por tos crónica con escaso esputo no purulento y respiración fatigada, disnea con ejercicio. ⁽¹³⁸⁾
- En vías urinarias se observa colangitis. Estudios radiológicos muestran pequeños infiltrados en el pecho.
- Los pacientes muestran una cuenta de linfocitos T CD4+ por debajo de 100 células por mililitro cúbico. ⁽¹³⁹⁾

Se le encuentra prácticamente en cualquier porción del intestino delgado, colon, ductos biliares y pulmón. ⁽¹⁴⁰⁾

Cuando la infección cursa de manera intensa, las células se encuentran atestadas, degenerando su forma por la presencia de parásitos. ⁽¹⁴¹⁾ Una sintomatología clara de este padecimiento son los cuadros diarreicos, sin embargo pueden no presentarse.



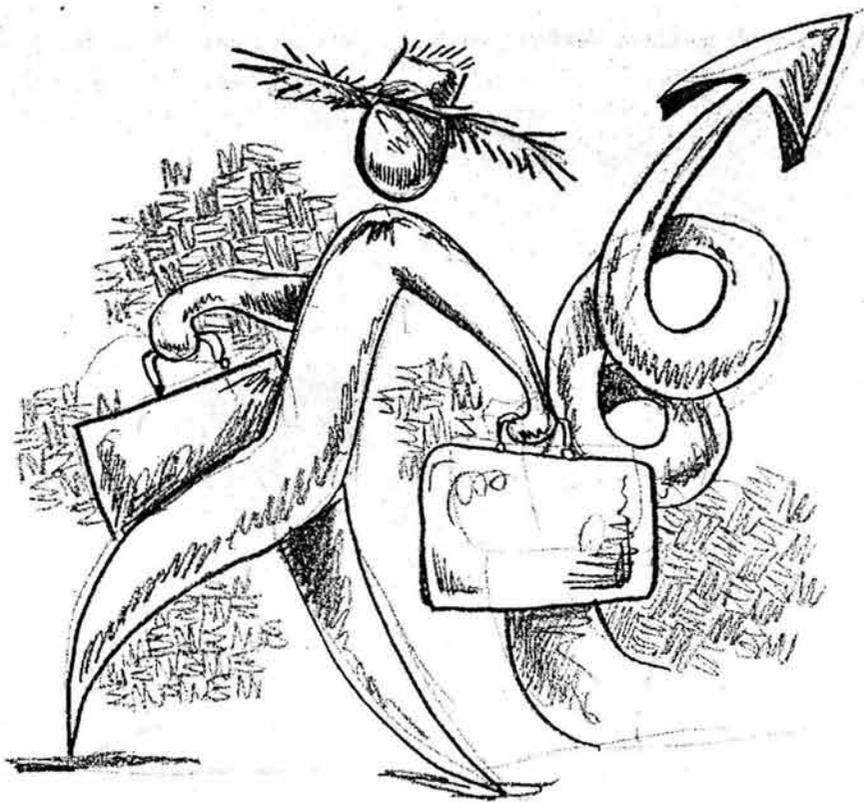
Figura 31

Enterocytozoon bienewisi
microsporidio al interior de un
enterocito proveniente de un
paciente con SIDA (12000x) ⁽¹⁴²⁾

Morbilidad /Mortalidad

La mayoría de los pacientes con microsporidiosis intestinal diseminada y que a su vez padecen del Síndrome de Inmunodeficiencia humana son personas con un severo compromiso de sus células $CD4^+$ ($<100/mm^3$), en estas personas la morbilidad es significativa. Las infecciones por *E. bienewsi* usualmente refieren en un cuadro diarreico en extremo debilitante que puede durar varios meses. El índice de mortalidad en estos pacientes es superior al 56%.⁽¹¹⁵⁾

Reportes de infección por *E. bienewsi* se incrementan año con año entre la población de viajeros que regresan de zonas tropicales. En estudios epidemiológicos entre turistas y residentes afectados por un cuadro de microsporidiosis intestinal, *E. bienewsi* se encuentra en porcentajes que alcanzan hasta un 90%.



4.2.3 *Vittaforma corneae*

(*Nosema connori*)

Fue descrito como organismo no clasificado por primera vez en 1973, pero fue hasta 1995, cuando después de estudiar varios casos similares y con la ayuda de múltiples técnicas se identificó y se creó el género y especie de *Vittaforma corneae*. Se distingue de otros microsporidios por el tamaño de sus esporas, 4.0 a 4.5 por 2.0 a 2.5 μm y la presencia de dos núcleos. Únicamente se ha reportado en biopsias de corneas en su curso natural. Bajo condiciones experimentales puede afectar al hígado al inyectarse intraperitonealmente en ratones. La microscopía electrónica permite distinguir la presencia de dos núcleos abultados en el interior de este parásito. El número de túbulos enroscados varía de 0 a 2. ^(194, 143)

Todos los estados del ciclo vital crecen en una cisterna hecha por la membrana del retículo endoplásmico del huésped, y los merontes producen de 4 a 8 esporoblastos acomodados de manera lineal.



Micrografía electrónica (x 30,000)
de *Nosema connori* que muestra el
filamento polar enroscado. ⁽¹¹⁵⁾

Figura 32

4.2.4 *Pleistophora sp*

Las especies del género *Pleistophora* son generalmente parásitos de los músculos de artrópodos de vertebrados como peces, anfibios y reptiles. Los únicos reportes referentes a mamíferos, son en el hombre. ⁽¹⁰⁴⁾

Ciclo biológico

El ciclo de vida de este género es parcialmente similar a otros microsporidios. La multiplicación procede del esporoplasmo a un esporonte, pero le siguen diferentes rutas. El esporonte, en vez de formar un esporoblasto, pasa por múltiples divisiones que al mismo tiempo que la membrana se adelgaza para formar vesículas que varían en el número de esporoblastos en donde maduraran las esporas.

Las esporas están contenidas en un saco cuyo nombre se conoce como vesícula esporofórica que mide de 3 a 4 μm , con un sólo núcleo. Este género posee por lo general 8 esporas por cada vesícula. Otra particularidad es que en los primeros estadios del parásito el desarrollo ocurre en estrecho contacto con citoplasma celular y con el retículo endoplásmico que cubre al mismo tiempo la vesícula esporofórica y la cisterna que se forma. ⁽¹⁰⁴⁾

Hasta ahora se conocen por lo menos tres infecciones de éste género en individuos inmunosuprimidos en su mayoría

4.2.5 *Trachipleistophora sp*

Trachipleistophora hominis

Este nuevo género se creó para acomodar a los microsporidias encontrados en pacientes con SIDA en Australia y Europa. Estos individuos presentaron junto a un cuadro severo de miocitis, fiebre y pérdida de peso, o con infección generalizada incluyendo el cerebro. ⁽¹⁰⁶⁾ La característica de este nuevo género en cultivos del parásito son parecido a los de *Pleistophora*, excepto por la apariencia de una superficie que cubre y rodea todos los estados de desarrollo (merontes, esporontes, y esporoblastos). Esta capa en contraste con *Pleistophora*, es rugosa. ^(146,149)

Las vesículas esporofóricas de *T hominis* contienen de 2 a 32 esporas. Las cuales son uninucleadas, midiendo entre 4 y 2 µm, presentando cerca de roscas por túbulo. Se le ha aislado de la córnea, músculo esquelético y secreciones nasales. ⁽¹⁴⁵⁾



Figura 33

Trachipleistophora hominis ⁽¹⁴⁴⁾



Figura 34

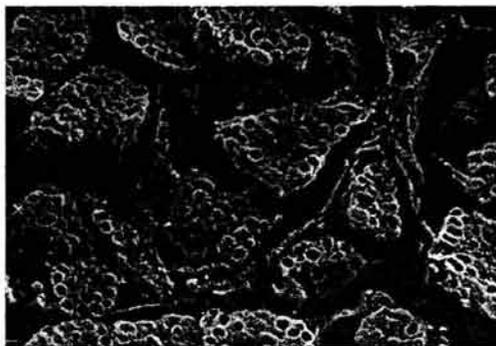
Esporas de *Trachipleistophora hominis* que muestran su tubo polar que le permite inyectar el esporoplasma al interior de la célula hospedera ⁽¹⁴⁴⁾

Trachipleistophora anthropophthera

En contraste con *T. hominis* tiene un doble desarrollo, con dos tipos de vesículas esporfóricas y sus esporas. ⁽¹⁰⁴⁾

- Las del tipo I presenta 8 esporas (entre 2.7 y 2.0 μm) un endosporo delgado y un filamento polar con siete roscas y dos terminales.
- Las del Tipo II presenta pequeñas vesículas con solo dos esporas generalmente redondas (2.2-2.5 por 0.8-2.0 μm). Y cerca de cuatro o cinco roscas en el filamento polar. ⁽¹⁴⁶⁾

Se le ha aislado del cerebro, riñones, páncreas, tiroides, paratiroides, corazón, hígado, bazo, nodos linfoides y médula espinal



Micrografía electrónica de macrófagos humanos en cerebro infectados con *T. anthropophthera* ⁽¹⁴⁶⁾

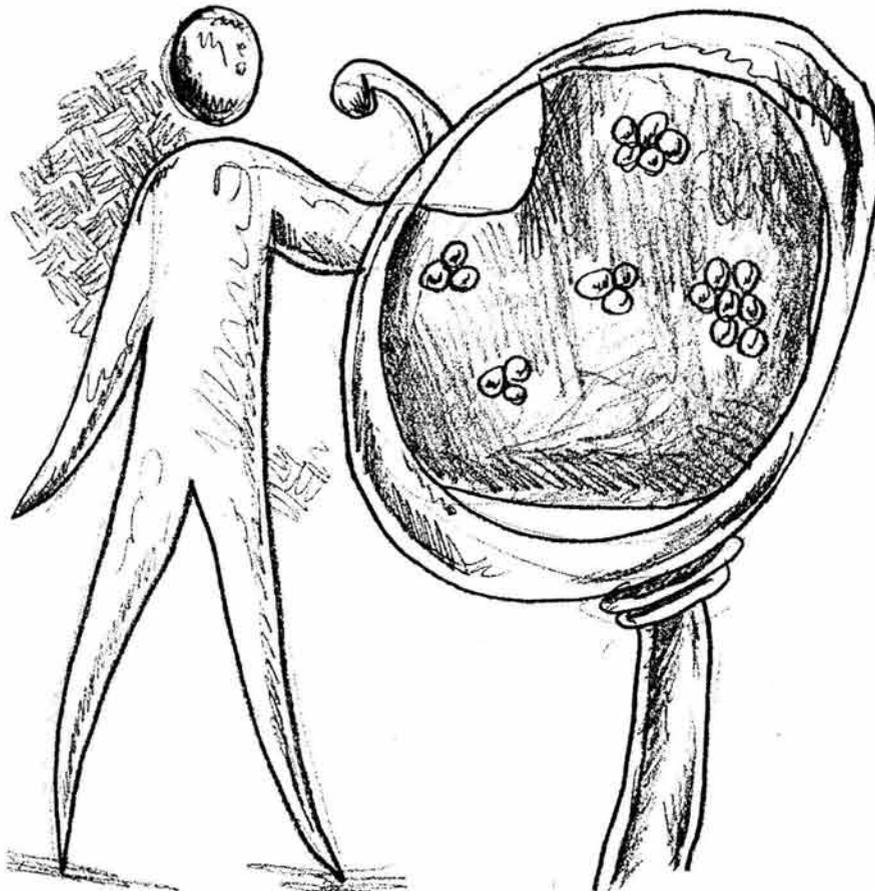
Figura 35

Thelohania-Pleistophora

El genero *Thelohania* esta muy cercano a *Pleistophora*, compartiendo la mayoría de sus características. La diferencia es el número de roscas del tubo polar, 6 o 7 en *Thelohania* y 9 a en *Pleistophora*. ⁽¹⁰⁴⁾ Además *Thelohania* presenta dos roscas extremadamente delgadas, y peculiarmente puede hallársele en el Sistema Nervioso Central, mientras que *Pleistophora* se restringe a los músculos. ⁽¹⁴⁷⁾

4.2.6 *Brachiola vesicularum*

La especie *B vesicularum* fué encontrada en un paciente con SIDA asociado a miositis. En las esporas maduras de este organismo, el tubo polar forma dos hileras de rollos cada cual con 8 a 10 enroscamientos, aunque también pueden agruparse en una sola fila o en un triplete de las mismas. Parece ser que este patógeno infecta en particular a las células del músculo esquelético. El desarrollo de las esporas toma lugar en un estrecho contacto con el citoplasma de la célula hospedadora. ⁽¹⁴⁸⁾ Este microorganismo aún no ha sido mayormente reportado, pero se espera que con el avance de técnicas de estudio pronto pueda detectarse en un mayor número de casos.



DIAGNOSTICO DE LA MICROSPORIDIOSIS

Los síntomas que se encuentran en un cuadro de microsporidiosis pueden usualmente confundirse con otras patologías y de ahí la importancia de poner de manifiesto al agente causal que lo produce a fin de poder implementar un adecuado tratamiento.

Entre las diversas patologías con que puede confundirse a esta enfermedad encontramos:
(103, 115)

(Diagnostico Diferencial)

- Cryptosporidiosis
- Infecciones con CMV
- Gastroenteritis Bacteriana
- Gastroenteritis Viral
- Giardiasis
- Isosporiasis
- Enfermedad inflamatoria intestinal

La importancia de que se cuente con un método específico, radica en que la terapéutica necesaria para erradicar este padecimiento es diferente dependiendo de la especie responsable, por ejemplo, *E intestinalis* responde favorablemente al tratamiento con albendazol, pero no se reportan grandes beneficios cuando se desea con este mismo fármaco combatir a *E bienersi*.

Es muy importante recalcar la importancia de hacer un análisis completo del historial del paciente y hacer un adecuado examen físico que junto con las pruebas de laboratorio integren clara y detalladamente un buen expediente del individuo y cada detalle sea tomado en cuenta para el diagnóstico final.

Cuadro 9 ⁽¹⁴⁹⁾**Revisión General del Paciente****Examinación Superior**

(*Cabeza, *ojos, *oídos, *nariz, y *garganta.)

Pacientes con una afección ocular debida a *Encephalitozoon sp* pueden mostrar hiperemia en la conjuntiva, lo que puede ponerse de manifiesto en la oscultación con un lampara que revelara una queratoconuntivitis la cual se caracteriza por una difusa, superficial y punteada queratopatía.

La infección es frecuentemente bilateral. La ulceración de la cornea es rara en pacientes con SIDA, y no se ha reportado afección de la retina.

Aquellos que tengan comprometida las fosas nasales pueden mostrar costras o purulencia y adelgazamiento y/o apariencia granular de la mucosa.

Examinación abdominal

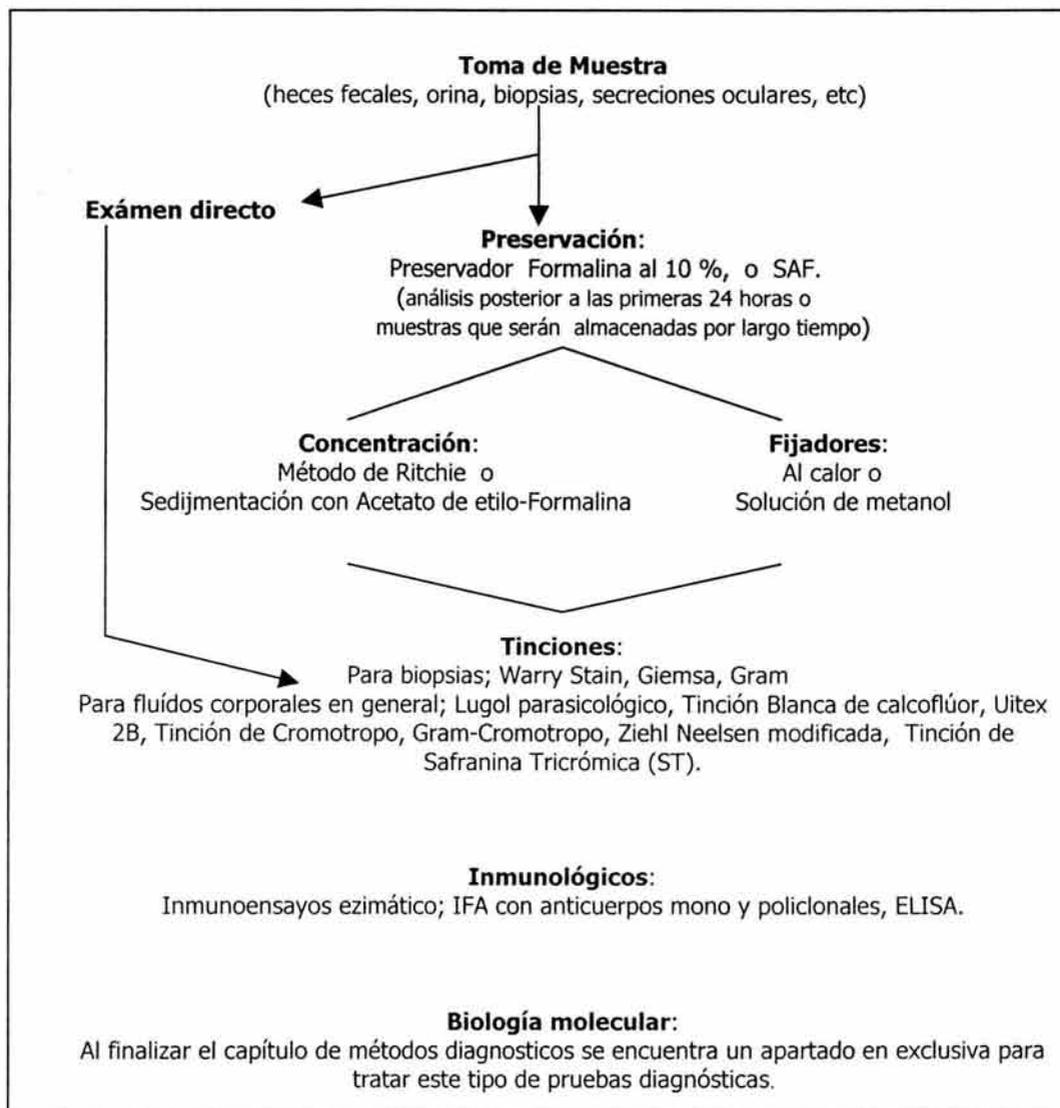
Delicadeza abdominal, puede observarse ictericia esto es poco frecuente, pero no descartable

Examinación músculo-esquelética

Los músculos se observan débiles y delicados, la piel puede llegar a mostrar nódulos o lesiones necróticas.

Estudios de Laboratorio

A reserva de que en el presente trabajo se menciona un apartado especial para el diagnóstico de cada una de las parasitosis, baste por el momento mencionar los diferentes análisis que pueden realizarse para lograr un diagnóstico adecuado. (51, 53, 55, 104, 150-160)



Microscopia Electrónica de Transmisión

El diagnóstico definitivo para la microsporidiosis depende de que se logre poner de manifiesto al parásito ya sea en un tejido de biopsia o en algún fluido corporal (orina, aspirado nasal, biliar, líquido cerebral, fluido espinal) o en una evacuación que sea examinada por medio de microscopia electrónica de transmisión (TEM; del inglés transmisión electron microscopy).

Al parásito se le distingue por su morfología. Todos los estadíos de su ciclo de vida pueden ser encontrados en diferentes tejidos, pero solo las esporas pueden observarse en fluidos corporales y en las evacuaciones. El tamaño y la ultra estructura de la espora, en particular la configuración del tubo polar, distingue bien *E. bienewsi* de *Encephalitozoon spp.* (Figuras 36 y 37)



Figura 36

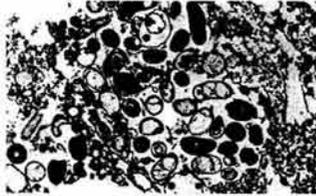
Micrografía electrónica de Transmisión de una espora de *Enterocytozoon bienewsi* en una muestra fecal que muestra el arreglo característico del tubo polar con seis vueltas en dos hileras. ($\times 28,500$).⁽¹⁵⁶⁾



Figura 37

Micrografía electrónica de Transmisión de una espora de *Encephalitozoon intestinalis* de un cultivo celular que muestra el tubo polar y de 4 a 7 espirales en sencillas hileras que es típico del género *Encephalitozoon*. ($\times 28,500$).⁽¹⁵⁶⁾

Existen algunas características que descartan muchas veces a este método diagnóstico como el elegido en la rutina de detección. Se requiere un método invasivo para obtener la muestra, demasiada laboriosidad en la técnica para preparar las muestras y realizar el examen.



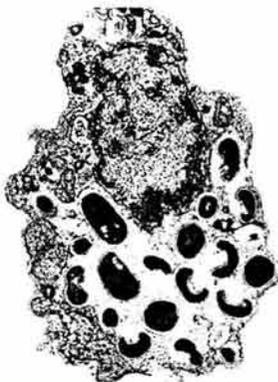
A. Micrografía electrónica de Transmisión de una célula huésped de un cultivo celular parasitado por *Encephalitozoon intestinalis*. Tanto la forma vegetativo como las esporas pueden observarse dentro de la vacuola parasitofórica. (x5,200) ⁽¹⁵⁶⁾



B. Micrografía electrónica de Transmisión que muestra el tubo enroscado dentro de una espora de *Encephalitozoon intestinalis* de un cultivo celular. Esta estructura única es básica en el diagnóstico microsporidiosis. (x28,500) ⁽¹⁵⁶⁾



C. Micrografía electrónica de Transmisión de un cultivo celular derivado de *Encephalitozoon intestinalis* que muestra la espora con su tubo polar en el proceso de extrusión. El arreglo en rosca del tubulo dentro de la espora se haya claramente demostrado (x39,000) ⁽¹⁵⁶⁾



D. Micrografía electrónica de una célula eucariótica con esporas de *Encephalitozoon intestinalis* que desarrollan formas dentro de la vacuola parasitofórica. Esta es una característica muy particular de las especies de microspora ⁽¹⁶¹⁾

Figura 38

TEM sigue siendo la metodología considerada de "oro" para lograr la identificación de las especies de microsporidia. Sin embargo resulta costosa, involucra numerosas etapas lo cual invierte mucho tiempo en su desarrollo, haciéndola poco práctica para un análisis rutinario



A: Micrografía electrónica de una espora de *Enterocytozoon bienewsi*. Las flechas señalan la doble hilera del túbulo polar enroscado en una sección cruzada la cual es característica de la espora de *E. bienewsi*.⁽¹⁶¹⁾

Figura 39

Microscopia óptica y de Fluorescencia

El examen histológico de especímenes para biopsia permiten diagnosticar la infección por *Microsporidia* pero no indica con precisión el género o la identificación de la especie. Las tinciones de tejidos que facilitan la identificación de microsporidios incluyen a la Hematoxilina y Eosina, Tinción de Gram, Giemsa Warthin-Starry y Cromotrope 2R. El pequeño tamaño de estos organismos y la falta de una notable respuesta de inflamación al tejido dificultan la detección de microsporidios. Una vez más, el procedimiento invasivo requerido para la obtención de los especímenes y el largo tiempo que se necesita en el procesamiento de los mismos representan las mayores desventajas del método.^(150, 144, 138)

Diferentes técnicas de tinción pueden usarse para demostrar la presencia de las esporas de microsporidios en muestras clínicas.⁽¹⁵²⁻¹⁵⁴⁾ Las esporas aparecen como estructuras entre ovaladas y redondas con dimensiones que oscilan entre 1 a 4 μm (dependiendo de la especie). Algunas tinciones como la de Gram, Cromotrope 2R (Figura 40 [A]), y la tinción rápida y en caliente de Gram-Cromotrope (Figura 40 [B]) destacan una característica particular, la forma de un "cinturón" en el plano ecuatorial de la espora.⁽¹⁶¹⁾

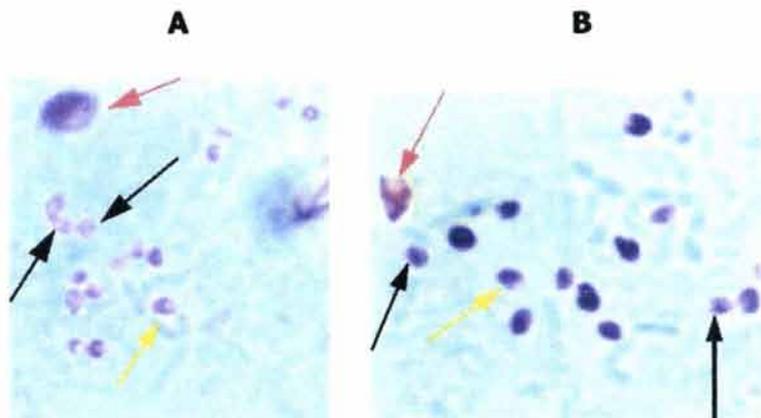


Figura 40

A: Frotis de una muestra fecal teñida con Cromotropo 2R, B: Frotis de una muestra fecal teñida con la tinción rápida y caliente de Gram-Cromotropo que contiene esporas de *Enterocytozoon bieneusi*.

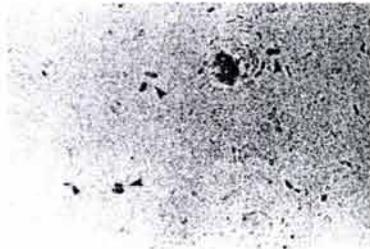
Las flechas negras indican esporas de *E. bieneusi* con su característico cinturón, acentuado en su diámetro ecuatorial. Las flechas rojas indican una levadura no identificada. Las flechas amarillas señalan una espora vacuolada. ⁽¹⁶¹⁾

El diagnóstico de una infección por microsporidios mediante microscopía óptica de especímenes obtenidos mediante técnicas no invasivas constituye un cambio radical para el laboratorista. Las esporas de *Microsporidia* no son observadas en los exámenes tradicionales de laboratorio y los parásitos pasan fácilmente inadvertidos en preparaciones teñidas con Gram de muestras fecales debido a su pequeñísimo tamaño, su forma y sus características de tinción que son muy parecidas a las que podemos encontrar en muchas bacterias entéricas. La modificación de Weber a la tinción de tricromo ha permitido una mayor identificación de *Microsporidia* por medio de la microscopía óptica. ⁽¹⁵⁴⁾ Con esta tinción, las esporas de microsporidia adquieren una coloración entre rosa y rojo claro y la mayoría tienen una característica línea diagonal o ecuatorial que permite diferenciar fácilmente a microsporidia de bacterias presentes en la muestra.

La sensibilidad y especificidad de esta tinción modificada no han sido aún claramente establecidas.

Un estudio permitió comparar entre este método diagnóstico (tinción tricromo modificada) en muestras fecales y la examinación por TEM de especímenes de biopsias duodenales de pacientes infectados por VIH, se encontró que para *E. bieneusi*, sus esporas

fueron detectadas en muestras fecales en 9 de 9 pacientes que presentaron de moderados a abundantes parásitos en tejidos y en 8 (57%) de 14 muestras fecales de pacientes que contenían una baja cantidad de parásitos en sus tejidos. ⁽¹⁵¹⁾ Esto ilustra que las esporas de *Microsporidia* pueden no ser observadas en muestras fecales por medio de este método diagnóstico (tinción tricromica modificada) en algunos pacientes infectados.



Esporas de *Encephalitozoon intestinalis* en una muestra fecal teñida con Tricromo modificado, Note la característica línea ecuatorial en una de las esporas. Ampliación original, x1,000. ⁽¹⁵⁶⁾

Figura 41

Varios abrillantadores quimiofluorescentes como el Calcofluor blanco y el Uvitex 2B. Originalmente designada para darle brillo a materiales en la industria textil, como la celulosa o fibras de poliamida, Uvitex 2B es un fluorocromo que se une a la quitina en la pared celular de los hongos y a la capa de la endospora de la pared celular de las esporas de microsporidios, y permite que la espora sea detectada rápida y fácilmente en frotis de especímenes examinados bajo el microscopio de fluorescencia. ⁽¹⁵⁵⁾ Anticuerpos monoclonales, policlonales y marcados fluorescentemente han sido desarrollados para la detección y especiación de *Microsporidia*. ^(119, 156)

Distintos investigadores han realizado estudios donde comparan la tinción tricromo modificada, calcofluor blanco y anticuerpos fluorescentes policlonales como métodos diagnóstico en ellos han observado que el método de anticuerpos policlonales es un método sensible para la detección de microsporidia en muestras fecales, de orina y lavados duodenales. ⁽¹⁵⁹⁾ De lo más destacado de todos esos estudios es que, proponen iniciar una búsqueda de organismos con la tinción blanca de calcoflúor y confirmar los frotis positivos utilizando la tinción tricrómica modificada. Sin embargo, dicha tinción y el calcofluor blanco no permiten la identificación de la especie de *Microsporidia*; por lo tanto anticuerpos especie-específicos deben ser usados a fin de proveer la identificación definitiva. Anticuerpos monoclonales específicos para *E.intestinalis* han sido usados en ensayos inmunofluorescentes para la detección de esporas en orina, evacuaciones,

biopsias bronquiales, lavados bronco alveolares y muestras obtenidas de tapones nasales.
(^a) Anticuerpos específicos para *E. bienewisi* no han podido ser desarrollados hasta que no pueda mantenerse exitosamente un cultivo por tiempo prolongado de este parásito.

Inmunofluorescencia

IFA: Utiliza anticuerpos monoclonales o policlonales para la identificación de microsporidios en muestras clínicas. En la figura 42 se muestra un ejemplo de Identificación de *Encephalitozoon hellem* por ensayo inmunofluorescente con anticuerpos monoclonales. (¹⁶¹)

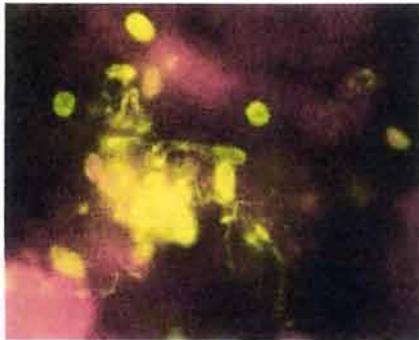


Figura 42

Las esporas se encuentran en una muestra de un lavado broncoalveolar de un paciente con Sida de 30 años de edad. Note el brillo fluorescente de la espora, el cual presenta el túbulo polar de forma exterior. (¹⁶¹)

Cultivo Celular

Microsporidia ha sido aislada de una variedad de especímenes y de una variedad de líneas celulares. (^{132, 140, 143, 157}) *E. hellem*, *E. intestinalis*, y *Vittaforma corneae* han sido aisladas de especímenes humanos y mantenidas en subsecuentes cultivos. A *E. bienewisi* se le ha podido cultivar in vitro por un corto período (6 meses). La detección de *Microsporidia* en cultivos celulares infectados puede tomar de 3 a 10 semanas. (^{143, 144})

El aislamiento de *Microsporidia* en cultivos celulares como un método diagnóstico de la infección, resulta laborioso, prolongado y es propenso a fallar con especímenes que provienen de sitios no estériles. Por lo tanto, el cultivo celular no es recomendado como método rutinario de diagnóstico para la microsporidiosis.

Serología

Entre los ensayos serológicos usados en la detección de anticuerpos de microsporidisa en suero humano encontramos Inmunofluorescencia, Inmunoperoxidasa, ELISA y Western blot. ^(119, 116, 117, 125, 157) La sensibilidad y especificidad de estos métodos para la detección de anticuerpos antimicrosporidia no se conoce ya que no se cuenta a la fecha con estudios comparativos publicados.

Estudios epidemiológicos han demostrado incrementos en la seropositividad para *E. cuniculi* en personas que viven en zonas tropicales y presentan enfermedades propias de su medio. ⁽¹⁵¹⁾ El más notable presenta cifras de seropositividad para *E. cuniculi* en rangos de 4.7% en pacientes con malaria y 9.1% en pacientes con schistosomiosis. Un estudio entre población masculina homosexual en Suecia mostró que 10 (33%) de 30 fueron seropositivos para anticuerpos de *E. cuniculi*, y todos los pacientes seropositivos mas la mitad de los pacientes seronegativos habían visitado en alguna ocasión países de regiones tropicales.

Estudios para detectar anticuerpos de microsporidia en pacientes infectados o no con VIH han demostrado que los individuos con SIDA pueden montar una respuesta inmune contra estos parásitos; sin embargo, los métodos serológicos no son herramientas útiles de diagnóstico ya que estos estudios han demostrado que por lo menos la mitad de los sueros como especímenes de personas sin una historia de infección por microsporidios previa, muestran títulos positivos.

Algunos de los problemas con las pruebas serológicas incluyen la pobre respuesta ante el cambio de antígeno en personas inmunosuprimidas, la probabilidad de que diferentes tipos de microsporidios (patógenos y no patógenos) contengan antígenos comunes que den reacciones cruzadas ^(114, 125, 127) y la falta de reactivos especie-específicos, en parte porque *E. bienewisi* no puede hacerse crecer o cultivarse de manera continua.

También es importante hacer notar que los microorganismos pertenecientes a *Microsporidium* suelen encontrarse en asociación con otros patógenos y es importante considerar esto último al realizar los exámenes pertinentes. En el Cuadro 10, se enlistan estos organismos que pueden estar asociados:

Cuadro 10 ⁽¹⁰³⁾

Organismos con los que los microsporidios suelen encontrarse asociados

- Bacterias
 - *Mycobacterium tuberculosis*
 - *Mycobacterium avium*
 - *Salmonella spp.*
- Virus
 - *Citomegalovirus*
 - *Herpes Simples*
 - *VIH*
- Otros parásitos
 - *Giardia lamblia*
 - *Cryptosporidium spp*
 - *Pneumocystis carinii*
 - *Toxoplasma gondii*
 - *Acanthamoeba spp.*
 - *Naegleria spp.*
- Helmintos
 - *Echinococcus multicolularis*
- Hongos
 - *Candida albicans*
 - *Cryptococcus neoformans*
 - *Aspergillus spp.*

4.3 BLASTOCISTOSIS

Blastocystis hominis

Introducción

B hominis, es un protozoo patógeno para el humano que se localiza en colon y se adquiere posiblemente por fecalismo. Desde la primera descripción de *B hominis* por Perroncito en 1899, se consideró una levadura inocente pero a partir de los estudios de Zierdt en 1967 cuando se caracterizó morfológica y fisiológicamente como un protozoario, se le ha encontrado implicado en alteraciones gastrointestinales en humanos. ⁽¹⁶²⁾

Se acepta que la primera descripción fue la realizada en 1911 por Alexieff quien lo denominó *Blastocystis enterocola* considerándolo un quiste de protozoario; pero fue Brumpt, en 1912 quien lo redefinió como levadura no dañina frecuente en las heces del hombre y otros primates y le dio el nombre de *Blastocystis hominis*. ⁽¹⁶²⁾

En 1920 varios autores citados por Jonson y colaboradores confirmaron su clasificación como levadura perteneciente al género *Schizosaccharomyces* hasta que en 1967 los estudios realizados por Zierdt y colaboradores sobre su morfología y fisiología lo reubicaron como protozoario perteneciente al subphylum Sporozoa; a pesar de ser ampliamente aceptada su descripción como protozoario no lo fue su ubicación como esporozoo. En 1988 Zierdt, C.H. basándose esencialmente en las características del parásito, lo clasificó utilizando el esquema de Levine y colaboradores de la siguiente manera: ⁽¹²⁰⁾



Figura 43 ⁽¹⁶³⁾

Clasificación Taxonómica

- **Reino:** Protista
- **Subreino:** Protozoa
- **Phylum:** Sarcomastigophora
- **Subphylum:** Sarcodina
- **Superclase:** Rhizopoda
- **Subclase:** Gymnamoeba
- **Orden:** Amoebida
- **Suborden:** Blastocystina

Morfología

Para diferenciar a *B. hominis* de otros protozoarios se han hecho numerosas observaciones de sus características morfológicas y fisiológicas, y se observa al trofozoito bajo tres formas distintas: ⁽¹⁶⁴⁾

- a) Forma vacuolada: predomina en muestras fecales y cultivos recientes, tiene forma esférica, oval o elipsoidal, mide de 4 a 15 μm , posee una gran vacuola central, que ocupa un 80% de la célula rodeada por una capa de citoplasma que contiene los núcleos. En las preparaciones con Lugol, no se tiñe la zona central aunque la capa periférica adquiere un color amarillo y se observa con claridad la posición periférica de uno a cuatro núcleos. Cuando se utilizan coloraciones permanentes (Tricrómica, Hematoxilina férrica) el material central se puede teñir intensamente, poco o nada y los núcleos se observan de color oscuro.



Figura 44

B. hominis: forma vacuolada, que mide entre 5-30 μm con una vacuola central y citoplasma periférico que contiene algunos granulos de dos a tres núcleos. (Preparación en fresco). ⁽¹⁶³⁾

- b) Forma amebode: se encuentra generalmente en cultivos, raramente en muestras de heces, su contorno es irregular, mide de 10 a 25 micras, contiene uno a dos núcleos centrales; puede emitir pseudópodos que la hacen progresar poco. El diagnóstico se dificulta por su semejanza con los leucocitos, pero existen ciertas características morfológicas y tintoriales que permiten diferenciarlos.
- c) Forma granular: se observa con mayor frecuencia en cultivos con elevada concentración de suero o envejecidos, tiene forma esférica, mide de 10 a 20 μm , contiene en su interior pequeñas granulaciones.

Estudios con el microscopio electrónico observaron que *B hominis* carece de pared celular, la membrana plasmática tiene vesículas o poros, posee aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso, mitocondrias y los núcleos son eucarióticos. Poseen pseudopodios de locomoción y de alimentación.

No se han descrito formas quísticas, no se conoce su ciclo evolutivo ni de existencia de hospederos intermediarios

Ciclo Biológico de *Blastocystis hominis*

B hominis es estrictamente anaeróbico, presenta cuatro formas de reproducción asexual: bipartición, plasmotomía, esquizogonia y por endodiogenia. La reproducción más frecuentemente observada en el huésped es por bipartición, la forma de amiba puede reproducirse por plasmotomía que consiste en extensiones circulares de la célula que se separan de la célula madre con uno o más núcleos pero también fuera del cuerpo central. La esquizogonia (o esporogonia) ocurre en el cuerpo central formando gran cantidad de progenie (esquizonte) hasta que la célula se rompe liberando a los organismos. La endodiogenia es menos frecuente produciendo dos grandes organismos dentro de la célula madre. (17, 162, 163, 165)

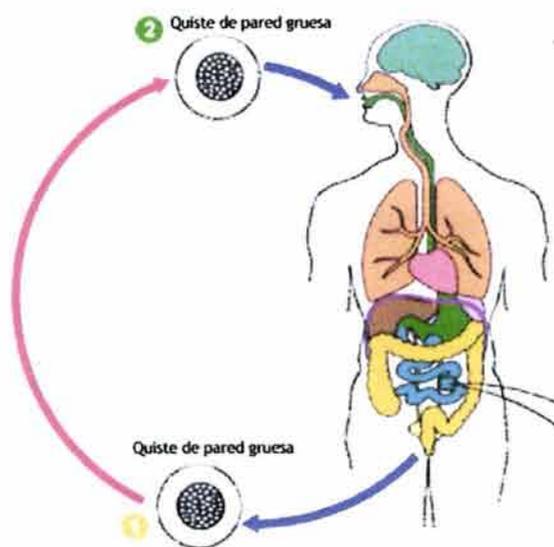


Figura 45

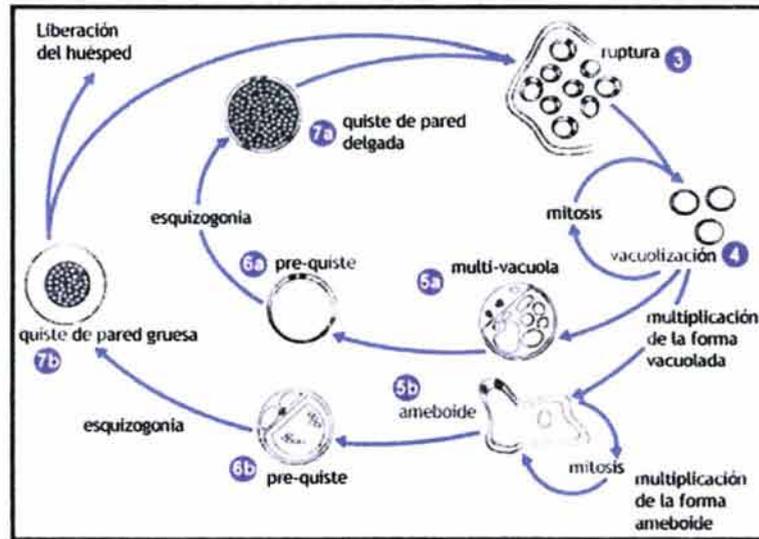


Figura 46

La forma comúnmente encontrada en las evacuaciones humanas es el quiste, el cual varía considerablemente su tamaño, desde 6 hasta 40 μm (1). Se piensa que este quiste de gruesa pared es el responsable de la transmisión externa, probablemente a través de la ruta fecal-oral mediante la ingestión de agua y alimentos contaminados (2). El quiste infecta las células epiteliales del tracto digestivo y se multiplica asexualmente. (3, 4). La forma vacuolar del parásito da origen a múltiples formas igualmente vacuoladas y ameboides (5b); Estas múltiples formas se desarrollan dentro de un pre-quiste que da origen a una delgada pared quística (7a), que se postula es la forma responsable de la auto-infección. La forma ameboidal da origen al pre-quiste (6b), el cual desarrolla la pared quística gruesa mediante esquizogonia (7b). Esta pared quística gruesa es excretada en las heces (1).

Distribución Geográfica y Epidemiología

La incidencia con que se presenta este organismo, parece ser más alto de lo que se sospecha, ya que conforme se hacen estudios tendientes a su identificación en varios países del mundo, se reporta su presencia. A partir de 1980 se incrementaron los reportes de *B hominis* tanto en individuos inmunocompetentes como inmunocomprometidos. En la actualidad la frecuencia de portadores crónico asintomáticos es desconocida.

Para muestra baste con referir los siguientes datos; la frecuencia en los Centros del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica, fue de 18% en 1983 y de 6% en 1985. Otros estudios han mostrado frecuencias muy similares a esta última como la reportada por O'Gorman en 1993, que encontró el 3% de *Blastocystis hominis* en la población pediátrica de un Hospital de Pittsburg, Pennsylvania. Un estudio parasitológico efectuado en dos comunidades indígenas de la Sierra de Perijá, Estado Zulia encontraron en la población de Santa Ana de Wasama una prevalencia para *B hominis* del 2.4% en 41 pacientes estudiados. Núñez, MT en otra investigación efectuada en un centro gerontológico del Municipio de Maracaibo del Estado Zulia (Venezuela) en ancianos mayores de 65 años, observó una prevalencia de 23.9% para *B hominis* encontrando un 54.5% en el sexo femenino. ⁽¹⁶²⁾

En el Hospital Pediátrico de Iztacalco de la ciudad de México, se encontró una frecuencia del 2.19% en pacientes con síntomas gastrointestinales, sin diarrea y del 2.06% en pacientes con diarrea, con una frecuencia global del 2.17%. ⁽¹⁶⁶⁾

Los datos anteriores confirman lo primeramente dicho en cuanto a que en donde se busque a este parásito, existe la certeza de que se le encontrará.

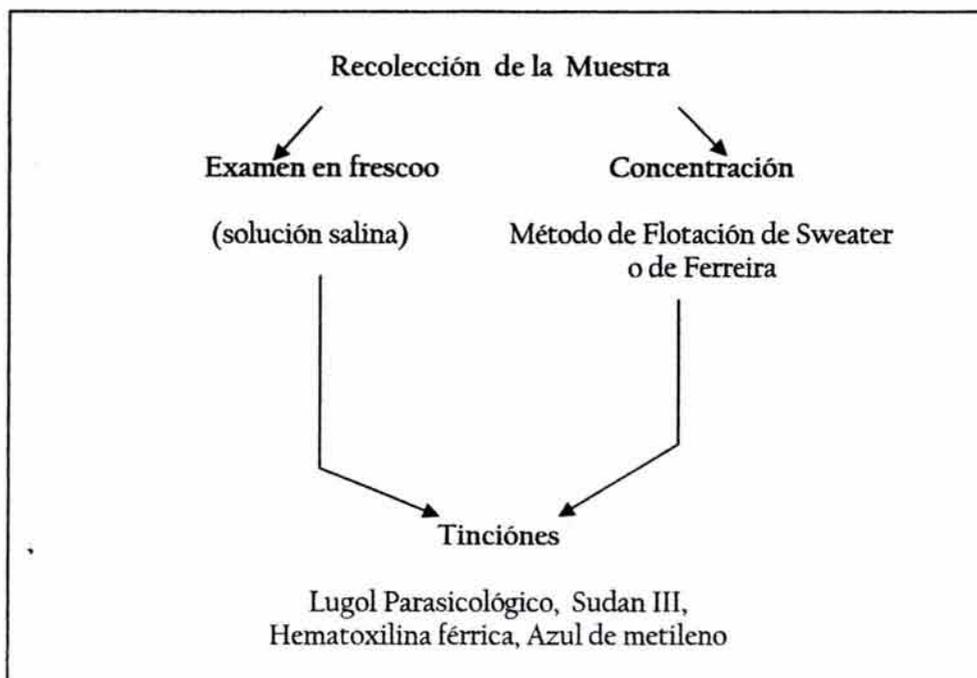
Manifestaciones Clínicas

La patogenicidad puede depender del número de parásitos presentes en las muestras de heces. Cuando este organismo está presente en gran número en ausencia de otros parásitos, bacterias o virus, puede ser evidencia suficiente para considerar su papel patógeno en pacientes con diarrea, dolor abdominal, flatulencia, náusea, vómito, anorexia y fiebre. Para algunos investigadores el número de *B hominis* no asegura la presencia de la enfermedad intestinal, consideran que hasta que no se conozca más sobre la virulencia del organismo y la respuesta inmunológica del hospedador, la simple cuantificación no es un marcador adecuado de su patogenicidad. Los síntomas duran habitualmente de 3 a 10 días, pero en ocasiones persisten por semanas o meses. ⁽¹⁶⁷⁾

Vía de Transmisión

El hábitat de *B hominis* es el intestino grueso, principalmente a nivel de ciego y puede encontrarse asociado con otros parásitos entéricos. Algunos investigadores sostienen que el consumo de agua, frutas o vegetales contaminados con heces, pueden ser la forma de transmisión; sin embargo la vía urogenital también es posible.

Diagnóstico de *Blastocystis hominis* ^(162, 164, 166, 167)



Los procedimientos buscan al parásito en su forma quística vacuolar, la cual puede ser muy pleomórfica pero que en general mide de 4 a 6 μm de diámetro; es refractil a la luz; tiene de uno a cuatro organelos colocados en la periferia, acomodados sobre una banda semilunar adosada a la membrana citoplasmática. Esta banda también puede rodear toda la membrana y adquiere forma anular. ⁽¹⁶⁴⁾

Los quistes poseen un cuerpo central denominado vacuola, que generalmente lo llena en su totalidad. La fase de trofozoito es muy difícil de identificar por el técnico poco experimentado ya que se puede confundir con leucocitos.

El examen de las formas quísticas se puede realizar mediante tinciones como la de Geulegen que delinea los núcleos mejor que otras tinciones. También es recomendable el tricrómico de Gomori,⁽¹⁶⁷⁾ Giemsa, o bien la mas usual, con lugol parasitologico en preparaciones montadas en fresco.

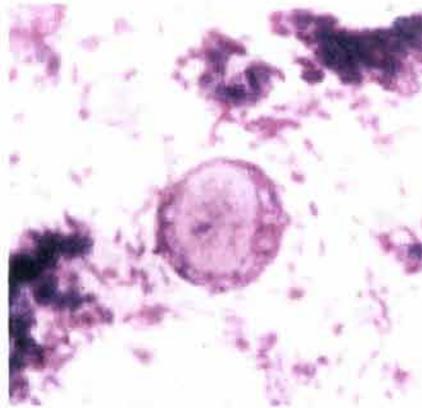


Figura 47

Forma quística vacuolada de *Blastocystis hominis* teñido con

Tinción de Romanowski⁽¹⁶⁵⁾

4.4 AMIBAS DE VIDA LIBRE

Naegleria spp, Acanthamoeba spp, Balamuthia spp.

Acanthamoeba, *Naegleria*, y *Balamuthia* pertenecen al grupo de las denominadas Amibas de Vida Libre, las cuales se distinguen de otros protozoarios patógenos, por su existencia libre en la naturaleza, por no contar con un insecto vector y por la limitada relación entre ciertas condiciones de higiene con la propagación de la infección.

Clasificación Taxonómica ⁽¹⁶⁸⁾

Reino: Protista

Subreino: Protozoo

Phyllum: Sarcomastigophora

Subphyllum: Sarcodina

Superclase: Rizopoda

Class: Lobosea

Subclase: Gymnamoebia

Orden: Amoebida

Suborden: Acanthopodina

Género: *Acanthamoeba*

Orden: Schizopyrenida

Género: *Naegleria*

Acanthamoeba y *Balamuthia mandralis* son los agentes responsables de un padecimiento conocido como Encefalitis Amibiana Granulomatosa (GAE; del inglés, granulomatous amebic encephalitis) nombre propuesto por Martínez en 1980, ⁽¹⁶⁹⁾ para distinguirla de la afección rápida y fatal ocasionada por *Naegleria fowleri*. GAE se caracteriza por ser una afección progresiva que afecta al cerebro en pacientes inmunocomprometidos, como por ejemplo individuos afectados de SIDA, personas con cáncer sometidas a quimioterapia,

o pacientes afectados por enfermedades debilitantes como el Lupus Eritematosos Sistémico, Diabetes o Alcoholismo. *Balamuthia* provoca cuadros más severos ocasionando una necrosis hemorrágica en el cerebro.

Por su parte *Naegleria fowleri* provoca otra enfermedad no menos importante conocida como Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MAP) que igualmente si no se diagnostica oportunamente y se asiste con la terapia adecuada es de curso fatal.

Una de las dificultades más grandes de estos padecimientos es la falta de métodos que permitan detectar al organismo responsable y la facilidad con que se suelen confundir los síntomas con alguna otra enfermedad, esto lleva a que la mayoría de las afecciones se diagnostiquen postmortem.

Ciclo Biológico

Las amibas de vida libre que pertenecen a los géneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, y *Naegleria* son responsables de importantes padecimientos tanto para humanos como para otros animales. *Naegleria fowleri* produce un daño agudo y usualmente letal al sistema nervioso central (SNC) padecimiento conocido como Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MAP).

N. fowleri presenta tres estadios como parte de su ciclo biológico:

quistes ❶

trofozoitos ❷

formas flageladas ❸

En él, los trofozoitos se replican mediante una promitosis (la membrana nuclear permanece intacta) ❹. *Naegleria fowleri* se haya en fuentes de agua natural, tierra, descargas de agua de plantas hidroeléctricas, piscinas termales, piscinas medicinales y de hidroterapia, acuarios y aguas negras. ⁽¹⁷⁰⁾

Los trofozoitos pueden intercambiar a formas flageladas de manera temporal que regresan nuevamente al estado trofozoico. Los trofozoitos infectan a los humanos o animales a través del neuroepitelio olfatorio ❶ y de ahí alcanzar el cerebro. Los trofozoitos de *N. fowleri* se encuentran en el líquido cerebroespinal (CSF) así como el tejido vecino, mientras que las formas flageladas prefieren únicamente el CSF. ⁽¹⁷⁰⁾

Por su parte *Acanthamoeba spp.* y *Balamuthia mandrillaris* son las responsables de provocar Encefalitis Amibiana Granulomatosa (GAE; del inglés granulomatous amebic encephalitis) en individuos cuyo sistema inmune esta comprometido.

Acanthamoeba spp. Ha sido encontrada en el suelo; manantiales salinos y agua de mar, aguas negras; piscinas de recreación, equipo de lentes de contacto, piscinas medicinales, unidades de tratamiento dental, máquinas para diálisis, sistemas de aire acondicionado, cultivos celulares de mamíferos, vegetales, fosas nasales y garganta humanas; y cerebro tanto animal como humano, piel y tejido pulmonar.

B. mandrillaris por su parte, no ha sido aislada del ambiente pero si de especímenes de autopsia de animales y humanos infectados.

Contrario a *N. fowleri*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia* presenta únicamente dos estadios en su ciclo biológico:

quistes ❶

trofozoitos ❷

El trofozoito se replica mediante mitosis (la membrana nuclear No permanece intacta) ❸

Los trofozoitos son las formas infectivas y se cree que ingresan al organismo mediante el tracto respiratorio bajo, piel dañada o ulcerada y de ahí invaden el SNC por diseminación hematogena ❹. Los quistes y trofozoitos de *Acanthamoeba spp.* y *Balamuthia mandrillaris* han sido encontrado en tejidos. ⁽¹⁷⁰⁾

Ciclo Biológico para las Amibas de vida libre *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba spp* y *Balamuthia mandrillaris*

(170)

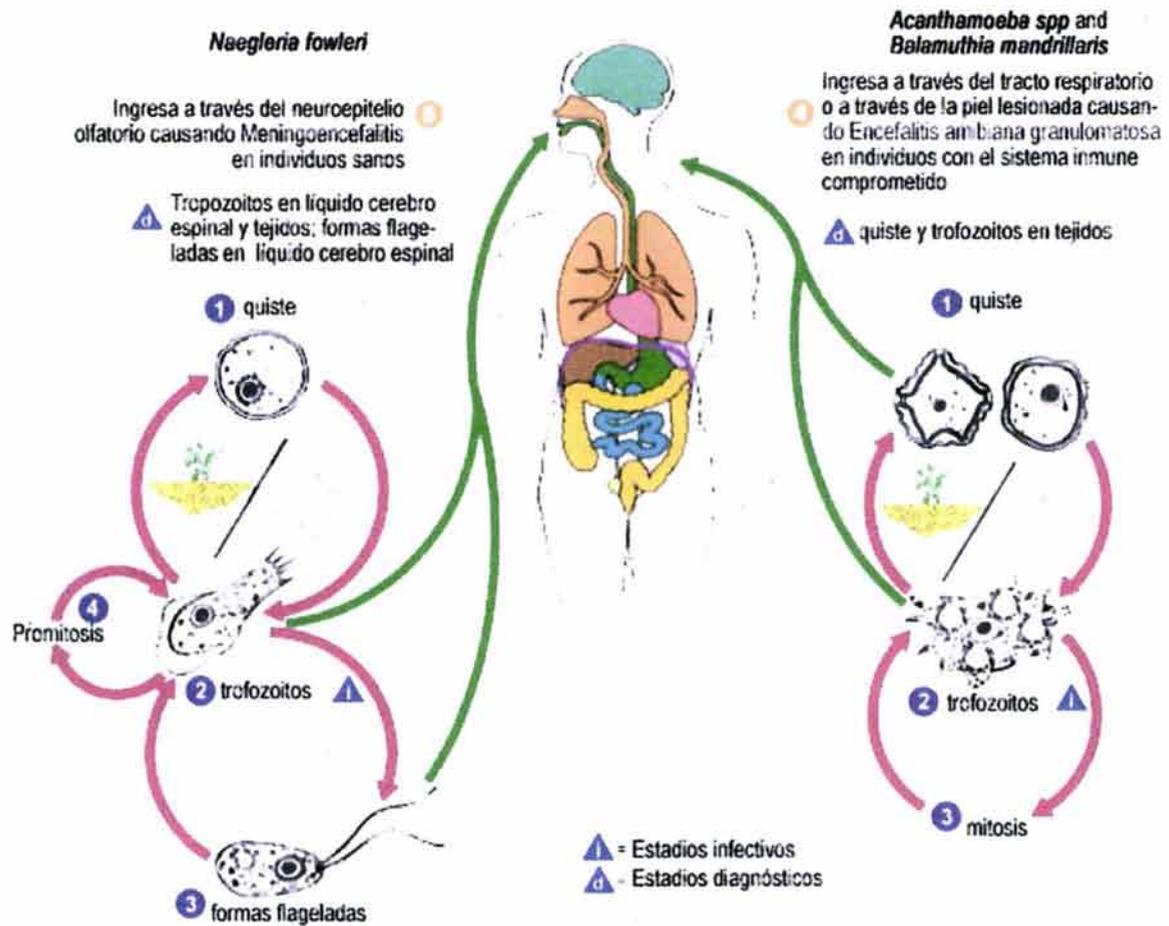


Figura 48

4.4.1 ACANTAMIBIASIS

Acanthamoeba spp

Morfología

A *Acanthamoeba* spp lo caracteriza su trofozoito activo y replicante, el cual, bajo condiciones adversas puede formar un quiste en estado latente. Los trofozoitos miden entre 24 a 40 μm de longitud y los quistes entre 15 y 28 μm dependiendo de la especie. Los trofozoitos de *Acanthamoeba* pueden reconocerse de los de otros géneros por la presencia de unas delgadas y puntiagudas extensiones sobre la cubierta denominadas acanthopodia. (169-171)

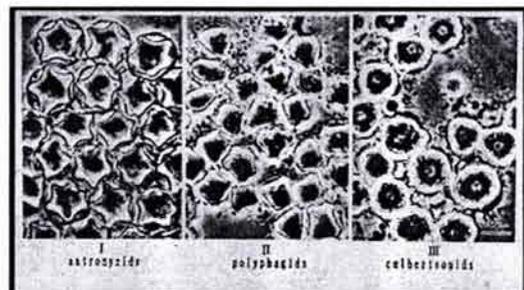


Figura 49

Tres grupos de *Acanthamoeba*,⁽¹⁷²⁾

Características Bioquímicas

Acanthamoeba es un organismo aeróbico y como tal no puede existir como trofozoito en el ambiente con bajo contenido de oxígeno. Sin embargo, los quistes de *Acanthamoeba* han sido aislados de material anaerobico como heces fecales, aguas negras y otros hábitats con bajo contenido de oxígeno. Los quistes han sido recuperados de agua de mar, aún cuando los trofozoitos son destruidos por las altas concentraciones de sal superiores a 1% (m/v). En el ambiente, *Acanthamoeba* se alimenta de una gran variedad de bacterias gram negativas, algas verde azules y levaduras.

Características del Cultivo



Figura 50⁽¹⁷²⁾

Los trofozoitos de *Acanthamoeba* presentan una temperatura de crecimiento en el rango de 12°C a 45°C dependiendo de la especie. Todas las especies patógenas crecen entre 36°C a 37°C con una temperatura óptima de 30°C. Los quistes permanecen viables de -20°C hasta los 56°C. (171)

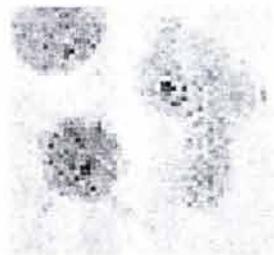
Trofozoíto de *Acanthamoeba sp*

Los quistes de *Acanthamoeba* son formas altamente resistentes capaces de soportar extremos de temperatura, agentes desinfectantes y condiciones de desecación. Esto explica la presencia del microorganismo en prácticamente todo suelo, estanques naturales o hechos por el hombre e incluso la atmósfera. Cuando las condiciones favorables se presentan, como por ejemplo un abastecimiento rico de bacterias y una temperatura adecuada, los quistes se desintegran y los trofozoitos emergen para alimentarse y replicarse.

Acanthamoeba es la causante de dos síndromes clínicos distintos. El primero, provoca cuadros de Queratitis ya sea crónica o aguda, en usuarios de lentes de contacto y la segunda, provoca Encefalitis Amibiana Granulomatosa (GAE). Incluso, esta ameba es ocasionalmente recogida de la faringe de personas sanas. ⁽¹⁷³⁻¹⁷⁵⁾

Hasta ahora no se cuentan con estrategias terapéuticas adecuadas y eficaces para evitar una infección sistémica, por lo que de sobrevenir un cuadro así, usualmente el curso es fatal.

Actualmente se conocen 16 especies de *Acanthamoeba* entre ellas podemos mencionar a algunas como *A castellani*, *A culberstoni*, *A polyphaga*, *A zhyssodes*, *A hatchetti*, *A astronyxis*, *A palestinensis* y *A healyi*, las que están subrayadas son las asociadas a las infecciones encontradas en humanos. ⁽¹⁷⁶⁾



Trofozoitos de
Acanthamoeba spp
en Tinción tricrómica
⁽¹⁷⁷⁾

Figura 51

Epidemiología

La queratitis ocasionada por *Acanthamoeba* ocurre en individuos en términos generales sanos, usualmente en aquellos que acostumbran utilizar lentes de contacto. La queratitis ha sido asociada al uso de lentes de contacto no desechables, al uso de soluciones de cloruro de sodio hechas en casa para limpiar los lentes, y al uso de los lentes mientras se está nadando. ⁽⁷⁸⁻¹⁷⁹⁾

El aislamiento de *Acanthamoeba* del agua proveniente de piscinas no es usual. Pero no existe una correlación entre la presencia de este parásito en las albercas o piscinas de recreo con la calidad bacteriológica del agua de las mismas. Los quistes de *Acanthamoeba* son altamente resistentes al cloro. Un alto porcentaje de aislados de albercas son patogénicos al igual que aquellos aislados de fuentes naturales de agua.

GAE ocurre usualmente en pacientes que cursan cuadros como una afección en el hígado, pacientes que han recibido el transplante de un órgano, diabetes melitus y SIDA. La infección diseminada en pacientes con SIDA ocurre cuando su cuenta de células CD4+ está por debajo de 200 células/ μ L.

Frecuencia:

- En los Estados Unidos de Norte América: La queratitis ocurre en 1.65-2.01 personas por millon usuarias de lentes de contacto. Un cuadro de GAE es poco común. ⁽¹⁷⁷⁾

Mortalidad/Morbilidad:

- La queratitis no se disemina hasta provocar una infección sistémica o la muerte, lo que si puede suceder es que se complique el cuadro si hay presencia de cataratas, una elevada presión intraocular.
- De presentarse GAE muestra un alto porcentaje de mortalidad.

Rutas de transmisión:

Para un cuadro de queratitis, generalmente ingresan por que los lentes de contacto se hayan contaminados o el estuche donde se suelen guardar estos. La fuente primaria de infección es el empleo de agua corriente y de la llave. Si el contenedor de los lentes de contacto no es lavado y desinfectado de manera adecuada, se favorecen las condiciones para la sobrevivencia y replicación por parte de los trofozoitos de *Acanthamoeba*. La presencia de bacterias, levaduras y otros microorganismos pueden representar una rica fuente de nutrientes, y dada la susceptibilidad que presentan para adherirse a algunos polímeros utilizados en la manufactura de los lentes de contacto, pueden ser transferidos al ojo e iniciar un proceso de infección. (175-176)

Prevalencia en el ambiente

Acanthamoeba puede encontrarse en cualquier ambiente acuático, incluyendo las albercas que suelen estar cloradas y el agua considerada potable. El agua de los tanques de almacenaje (tinacos) puede estar expuesta a la contaminación del aire, y el acumulamiento de polvo y moho puede resultar en condiciones favorables para numerosos microbios, incluyendo a *Acanthamoeba*. Aún no logra establecerse el modo de como *Acanthamoeba* ingresa y se establece en estos contenedores de agua, si lo hacen directamente de la atmósfera o del abastecimiento local del agua.

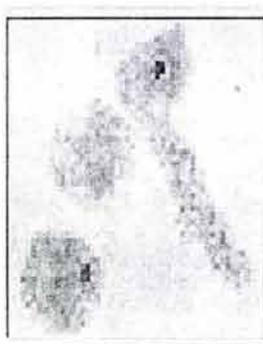


Figura 52

Acanthamoeba spp.: el trofozoito presenta una forma irregular, que puede medir entre 15-45 μm . Posee micropseudópodos llamados acanthopodia.

(170)

Fuentes de exposición

Se piensa que la fuente primaria de infección en la córnea para *Acanthamoeba* en aquellos usuarios de lentes de contacto, es el uso de agua corriente de la llave para limpiar los estuches contenedores de los lentes, o las preparaciones de soluciones caseras para el mismo fin. Sin embargo, no debemos olvidar el hecho de que *Acanthamoeba* se encuentra también en el polvo y alrededor de piletas de agua sucia, tubos calientes y como ya dijimos de albercas en general. ⁽¹⁸⁰⁻¹⁸²⁾

Susceptibilidad de remoción o inactivación mediante procesos convencionales de tratamiento de aguas

Los quistes de *Acanthamoeba* son definitivamente largos, y deberían ser removidos satisfactoriamente mediante un proceso de filtración. Los quistes, mas no los trofozoitos, resisten el proceso de cloración.

Patogenicidad

Algunos estudios han mostrado que *Acanthamoeba* posee la capacidad para destruir células gracias a una citólisis de contacto mediante unas proyecciones como dedos que aparentemente insertan factores citolíticos en la célula objetivo. La célula afectada puede seguir dos rutas, la apoptosis o la necrosis. ⁽¹⁷⁶⁾

Sintomatología:



Acanthamoeba
spp.: trofozoitos
vistos bajo un
microscopio de
contraste de
fases. ⁽¹⁷⁷⁾

• Queratitis ^(181, 183)

- Sensación de cuerpo extraño.
- Dolor intenso
- Fotofobia
- Lagrimeo
- Beflaroplasmo
- Conjuntivitis
- Visión borrosa

Figura 53

- **Encefalitis amibiana granulomatosa** ^(169, 171, 175, 180)
 - Cambios en el estado mental 86%
 - Ataques apopléticos 66%
 - Hemiparesis 53%
 - Meningitis 40%
 - Disturbancias visuales 26%
 - Ataxia 20%
 - Fiebre
 - Dolor de cabeza
 - Lesiones en piel (ulceras, nodulos o absesos subcutáneos)
 - La enfermedad es mortal y una vez que se manifiesta puede durar de 7 a 120 días, 39 como promedio.

Factores Predisponentes:

- Queratitis ^(181, 183)
 - Uso de lentes de contacto
 - Empleo de soluciones de cloruro de sodio hechas en casa.
 - Uso de lentes de contacto mientras se esta nadando
 - Una pobre limpieza o poco frecuente hacia los lentes y accesorios, menor a la recomendada por el fabricante.



Figura 54

Empleo de esteroides *Acanthamoeba spp.* quistes teñidos con el método de hierro de Heidenhain ⁽¹⁸⁴⁾



Figura 55

Acanthamoeba spp. grandes lesiones de ulceración central y necróticas en la pierna de un paciente afectado ⁽¹⁸⁴⁾

- Encefalitis amibiana granulomatosa ^(169, 171, 175)
 - Diseminación hematogena a partir de la piel, pulmones o sínuses. (Figura 55)
 - SIDA
 - Enfermedad en el Hígado
 - Transplantes de médula ósea o renales
 - Diabetes mellitus
 - Lupus eritematosos sistémico
 - Embarazo
 - Alcoholismo

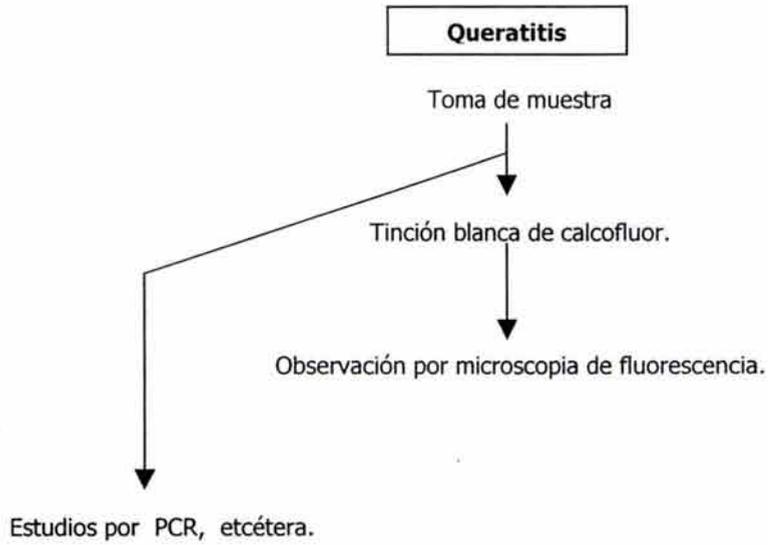
Diagnóstico de *Acanthamoeba sp*

Cada padecimiento es susceptible de ser confundido con algun otro de acuerdo a los síntomas que muestre el paciente y es por ello que siempre es importante considerar el diagnóstico diferencial al momento de estudiar cada caso clínico. Para el caso de la Acanthamibiasis el diagnóstico diferencial es el siguiente: ⁽¹⁷²⁾

- Coccidioidomicosis
- Cytomegalovirus
- Herpes Simple
- Histoplasmosis
- Toxoplasmosis
- Tuberculosis

Otros problemas a considerar son: Queratitis bacteriana, Viral, Fúngica, Epilepsia y Tumores cerebrales

Para realizar un diagnóstico adecuado debe tratarse cada padecimiento de manera diferente: (127, 128,133, 136,137)



Estudios por Imagen:

Obtención de la muestra:

- Queratitis: Obtenga un raspado ocular.
- Encefalitis amibiana granulomatosa: Obténgala por punción lumbar, biopsia de tejido dérmico o cerebral. La punción lumbar está contraindicada si se observan signos de una elevada presión intracraneana.

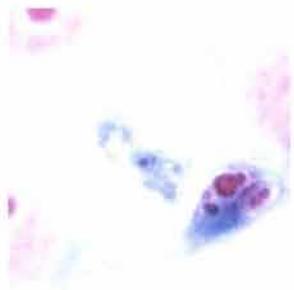


Figura 56

Trofozoito de *Acanthamoeba polyphaga* en cultivo de tejido, tinción tricrómica ⁽¹⁷²⁾

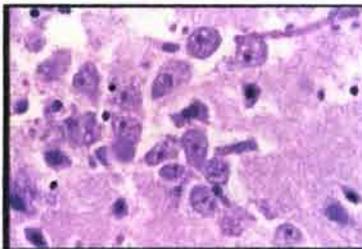


Figura 57

Trofozoitos de *Balamuthia mandrillaris* en tejido cerebral ⁽¹⁷²⁾

Estudios Histológicos:

En un cuadro de Queratitis los quistes y trofozoitos se localizan en la córnea. Un infiltrado inflamatorio agudo puede contener células gigantes, así mismo, puede llegar a ocurrir una revascularización en la córnea. ⁽¹⁷²⁾

Los pacientes con GAE presentan un edema cerebral que va de moderado a severo. Los granulomas con necrosis contienen trofozoitos perivasculares y quistes que se localizan

frecuentemente en el cerebelo, mesencéfalo y tallo cerebral. Células gigantes multinucleadas pueden estar presentes dentro de granulomas.

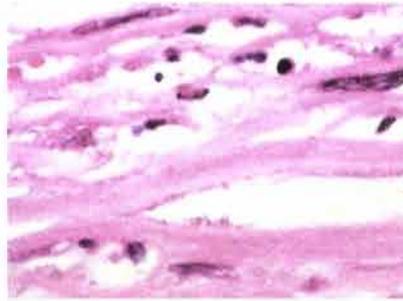


Figura 58

Acanthamibiasis / Queratitis.

Biopsia de córnea que muestra un trofozoito. ⁽¹⁷⁷⁾



Figura 59

Acanthamibiasis / Queratitis.

Quiste con su forma radiada característica en un raspado de córnea. ⁽¹⁷⁷⁾

4.4.2 NAEGLERIASIS

Naegleria fowleri

Naegleria fowleri debe su nombre al Doctor Malcolm Fowler de Australia; este parásito fue reconocido por vez primera como patógeno humano en el año de 1965 y desde entonces se han reportado en la literatura científica cerca de 179 casos. ⁽¹⁸⁵⁾



Figura 60 ⁽¹⁸⁷⁾

Trofozoito de
Naegleria fowleri

Naegleria fowleri provoca cuadros de encefalitis agudos, en su mayoría fatales. *Naegleria fowleri* como ya se dijo es el agente causal de la Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MAP), la enfermedad afecta normalmente a niños y gente joven adulta. En la mayoría de los casos las víctimas entran en contacto con las amebas al nadar en aguas contaminadas. Las amebas alcanzan el cerebro cuando entran por el tracto respiratorio después de una inhalación profunda o al contacto de sumergirse en las aguas mencionadas y poner en contacto a la mucosa de la nariz con la fuente de infección. ^(173, 186)

El período de incubación presenta un rango que varía en uno tan corto como de 2 a 3 días a uno prolongado de entre 7 y 15 días, dependiendo del tamaño del inóculo y de la virulencia de la cepa. El período de incubación en animales infectados experimentalmente con *N. australiensis* o con una cepa virulenta de *N. fowleri* ha sido reportado tan largo como de 3 a 4 semanas. ^(185, 187-189)

Fases de desarrollo del parásito

Naegleria fowleri puede encontrarse en forma de trofozoito, quiste y organismo flagelado. El trofozoo es alargado, mide de 15 a 30 μm de diámetro y carece de cromatina periférica. El cariosoma es grande y se observa rodeado de un halo; el citoplasma presenta granulaciones irregulares en tamaño. El quiste es esférico y presenta una doble pared con dos a tres poros.

El organismo flagelado es un estado transitorio que adopta el parásito en cultivo o cuando se suspende en solución salina isotónica estéril. Es alargado y presenta dos flagelos, que emergen de su porción anterior. ⁽¹⁹⁰⁾

Naegleria fowleri aislada de humanos es morfológicamente idéntica a las amebas no patógenas *N. gruberi* y *N. australiensis*. Los trofozoitos están activos y en constante cambio en tamaño y forma. Cuando son redondos miden cerca de 10 a 15 μm en diámetro. El citoplasma es finamente granular y contiene un conspicuo y claro núcleo acompañado de un denso nucleolo central. Numerosas vacuolas son usualmente visibles en el citoplasma. El trofozoito viaja mediante un amplio proceso de movimientos conocido como lobopodia. Bajo condiciones adversas, el trofozoito se enquista. El quiste es esférico de 8 a 12 μm de diámetro, con una pared lisa en su exterior. Cuando se expone en agua destilada, el trofozoito puede convertirse en pocos minutos en la forma flagelada.

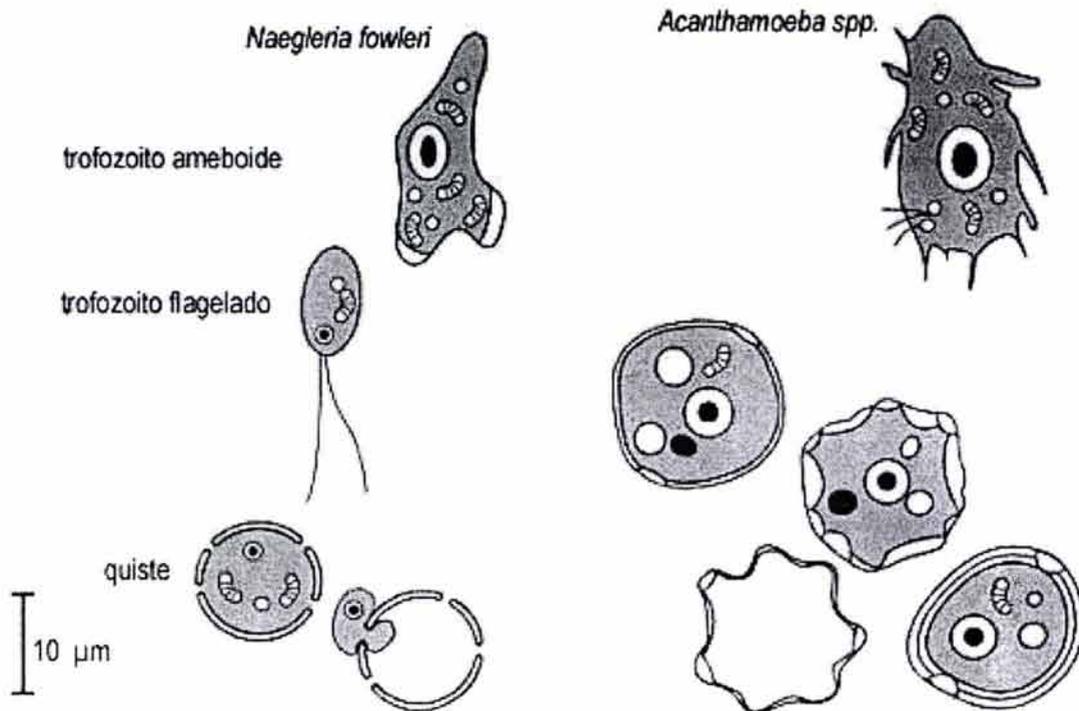


Figura 61

Esquema que muestra la morfología de *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba* spp ⁽¹⁸⁷⁾

Localización en el huésped

Puede invadir la faringe, nasofaringe y sistema nervioso central.

Distribución geográfica y Epidemiología

Su distribución es mundial, encontrándose frecuentemente en cuerpos de agua dulce como: lagos, lagunas, estanques, piscinas y canales de riego. Es a partir de 1983 que ha adquirido importancia médica debido a los informes de casos en países como Estados Unidos de Norteamérica, Australia, Checoslovaquia, Bélgica, India y Perú. ^(173, 186)

Desde 1971, el Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades Infecciosas (CDC) y la Agencia de Protección al Ambiente (USEPA) ha mantenido en colaboración un sistema de vigilancia para coleccionar y reportar de manera periódica datos alusivos a la ocurrencia y las causas de posibles brotes epidémicos de encefalitis. Durante el período de 1995-96, 37 brotes en 17 estados fueron atribuidos a la exposición de agua en parques de recreo, lo que afectó a cerca de 9,129 personas. De estos, 22 fueron brotes de gastroenteritis (59%); nueve de dermatitis (24.3%); y seis de Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MAP), causada por *N. fowleri* (16.2 %), los seis tuvieron un curso fatal.

De acuerdo con el CDC, existe un promedio de 1 a 3 infecciones en los Estados Unidos de Norte América cada año. Los casos mencionados en el período de 1995-1996 de meningoencefalitis ocurrieron durante los meses de Julio y Agosto involucrando a niños entre 4 a 11 años de edad. Cinco de los seis casos ocurrieron en Texas y el restante en Florida.

En México existen solo tres reportes de brotes de MAP y que ocurrieron en sitios tan distantes como Mexicali, Baja California, Monterrey, Nuevo León y Huetamo, Michoacán.

⁽¹⁷³⁾

Mecanismo de infección

La infección se produce al ponerse en contacto con la mucosa nasal, aguas contaminadas con trofozoitos u organismos flagelados de *Naegleria fowleri*, los cuales invaden rápidamente los bulbos olfatorios, cruzan la lámina cribosa del etmoides y llegan por esta vía al sistema nervioso central y meninges.

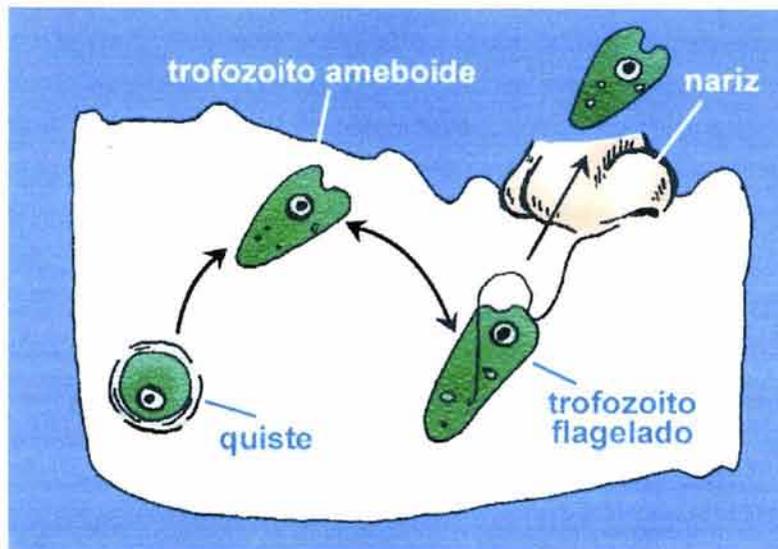


Figura 62

Esquema que ejemplifica la forma en la que *N fowleri* ingresa al organismo⁽¹⁸⁷⁾

Patología

En la mayoría de los casos *N fowleri* ingresa al organismo mediante una inhalación o una salpicadura en el epitelio del tracto respiratorio al sumergirse en aguas contaminadas con el microorganismo. Sin embargo, en algunos casos los pacientes reportan no haber tenido contacto reciente con agua fresca que hubiera podido ser la fuente de infección, lo que sugiere que de algún modo tuvieron contacto con los quistes al inhalarlos de otra fuente como polvo o lodo.⁽¹⁹¹⁾

Las células sustentáculas del epitelio olfatorio son capaces de activar la fagocitosis y este parece ser el mecanismo por el cual las amebas invaden el cuerpo. Posteriormente las amebas viajan hacia el espacio mesaxonal del nervio olfatorio hacia el cerebro.

El nervio olfatorio termina en el bulbo del mismo nombre, el cual se localiza en el espacio subaracnoidea que se haya altamente vascularizado y bañando por el fluido cerebro espinal.

El espacio surbaracnoideo es la ruta de diseminación hacia el resto del CNS. Los síntomas respiratorios en algunos pacientes pueden ser el resultado de una hipersensibilidad o reacción alérgica, o pueden representar una infección subclínica. (187, 191)

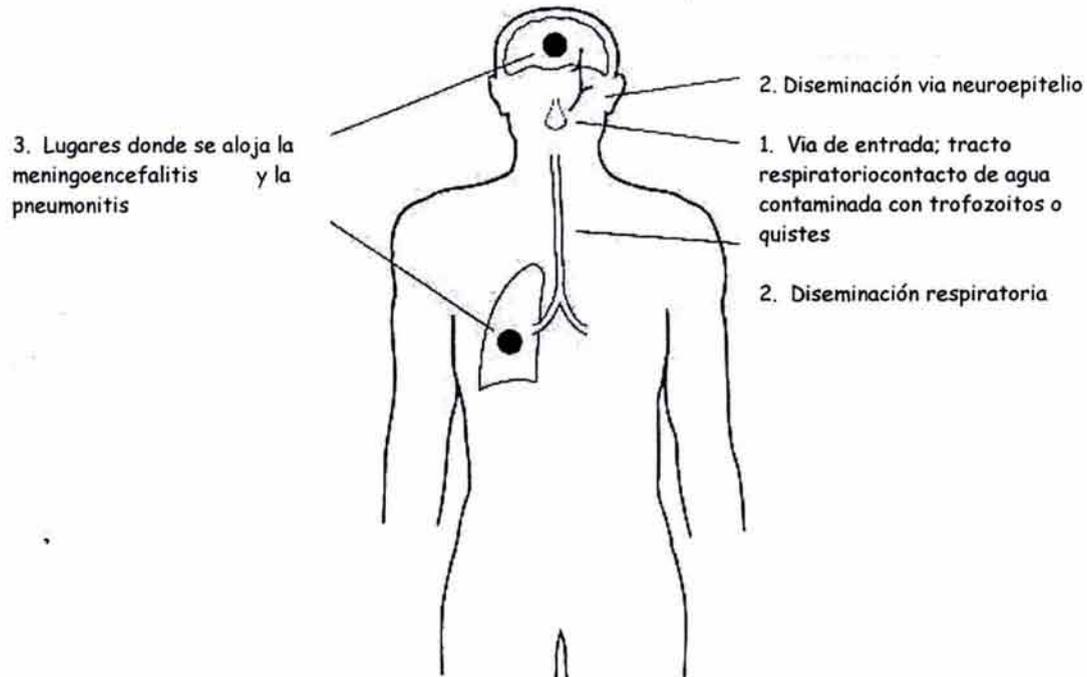


Figura 63

Esquema que indica la ruta de entrada al organismo así como las regiones donde se aloja *N fowleri*.

El cerebro de un paciente con un cuadro de MAP usualmente se muestra hinchado, edematoso, con los hemisferios cerebrales congestionados y presenta clara evidencia de un incremento en la presión intracraneal. El aracnoideo se observa severamente congestionado y un exudado purulento puede encontrarse a lo largo del sulci.

Los bulbos olfatorios y los cortices orbitofrontales se hallan usualmente necróticos y hemorrágicos. Las leptomeninges muestran un exudado fibroso y purulento compuesto de leucocitos polimorfonucleares, eosinófilos y unos pocos monocitos y algunos linfocitos.

Estos cambios pueden presentarse a lo largo de los hemisferios cerebrales, el tallo cerebral, el cerebelo y la porción superior del cordón espinal. ⁽¹⁸⁷⁾ Unas pocas amebas pueden llegar a encontrarse en el exudado purulento, algunas en el proceso de ser fagocitadas por los leucocitos polimorfo nucleares y macrófagos.

Patogenicidad



Figura 64 ⁽¹⁸⁷⁾

Trofozoito ameboide de
Neqleria fowleri

Provoca meningoencefalitis amibiana primaria, que se caracteriza por el repentino comienzo de dolor en la cabeza, fiebre, náusea, faringitis y obstrucción nasal; con el progreso del padecimiento aparecen otros síntomas como son letargia, confusión, cabeza dura; las convulsiones pueden ocurrir con un rápido deterioro y evolución a coma y después la muerte en un período que oscila entre 1 y 14 días; entre otros síntomas reportados encontramos anomalías de las sensaciones del olfato y el gusto, ataque de apoplejía, ataxia cerebral, rigidez en la nuca y fotofobia. ^(173, 186)

Riesgo de Infección

Un cuadro de MAP solo puede ocurrir cuando se reúnen algunas de las siguientes condiciones al mismo tiempo. :

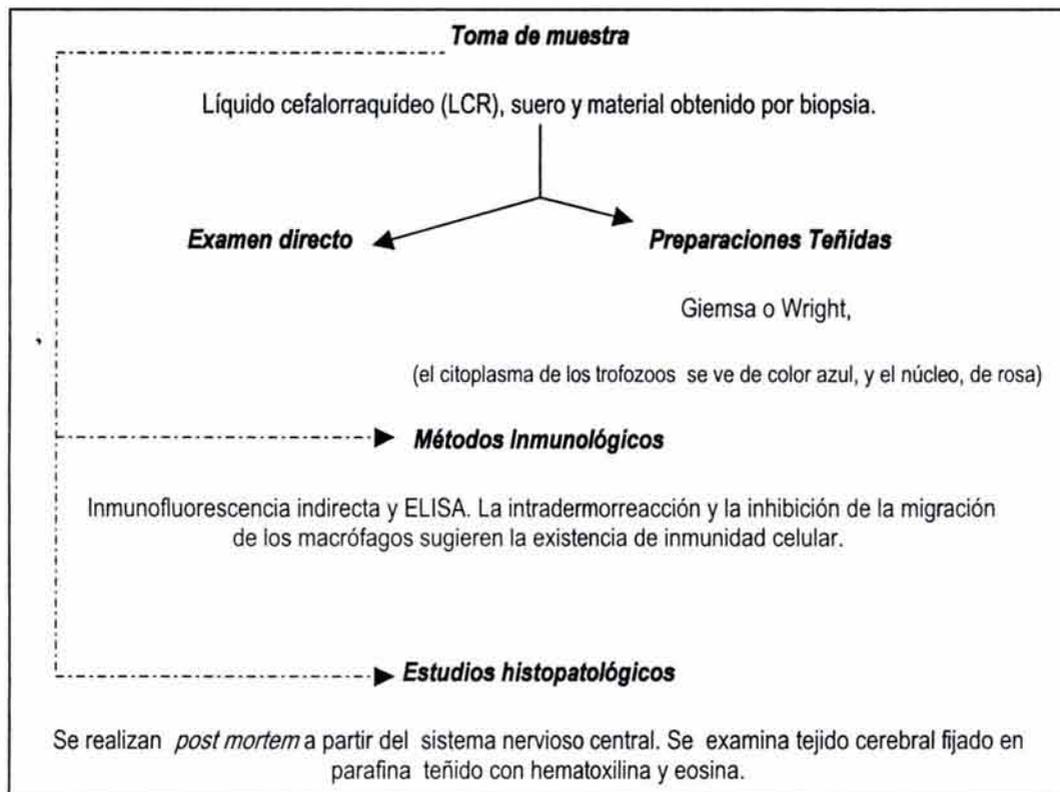
- a. La amiba debe estar presente en el agua.
- b. La amiba debe poseer la capacidad para multiplicarse en gran cantidad (bajo una temperatura cálida en agua estancada) así como abundante presencia de mesófilos aerobios, que favorecen el desarrollo de *Neqleria fowleri*

c. El agua contaminada por la amiba debe alcanzar la cavidad olfatoria de la posible víctima, es decir el agua debe ser inhalada enérgicamente mediante uno o varios chapuzones, o abundantes salpicaduras.

Manifestaciones clínicas

La meningoencefalitis amibiana primaria se presenta en personas con antecedentes de haber nadado en lagunas, estanques o piscinas. Después de 3 a 7 días de la infección se presentan cefalea intensa de predominio frontal o bitemporal, fiebre de 38 a 40°C, anorexia, náusea, vómito en proyectil, fotofobia, ageusia y parosmia, signos de irritación meníngea, signos de Babinsky y Brudzinsky positivos, confusión mental, irritabilidad, intranquilidad y coma. La muerte sobreviene por edema pulmonar o paro cardiorrespiratorio 72 horas después de haberse iniciado los síntomas ⁽¹⁷³⁻¹⁷⁵⁾

Diagnóstico de *Naegleria fowleri* ^(173, 186, 189)



MAP no puede ser distinguida a simple vista de una meningoencefalitis bacteriana. La tomografía computarizada del cerebro muestra obliteración de la cisterna que rodea el mesencéfalo y del espacio subaracnoideo sobre los hemisferios cerebrales. ⁽¹⁸⁷⁾

Es importante mencionar que la mayoría de los casos de MAP ocurridos alrededor del mundo, se han identificado de manera aislada y el diagnóstico ha sido postmortem, esto hace que se incremente la importancia del establecimiento de sistemas de vigilancia para MAP pues gracias a la búsqueda intencionada de casos, se puede hacer la detección oportuna y consecuentemente tener mayor probabilidad de éxito en el tratamiento.

Prevención

- a. Evite nadar en agua estancada o contaminada. Busque áreas donde el agua corra y más abiertas.
- b. Si va a realizar clavados en aguas de parques naturales utilice tapones nasales como los que utilizan los nadadores profesionales.
- C. Preferentemente nade en piscinas adecuadas y limpias específicas para dicho fin.

MAP es extremadamente rara. Menos de tres casos se reportan cada año en América del Norte. Mas no por ello debemos poner menos atención en este padecimiento y las muertes y afectaciones podrían aumentar como resultado de una irresponsabilidad tanto de autoridades en salud publica por no informar acerca de los riesgos provocados por dicha enfermedad, como de la población en general al no acatarlas.

Cuadro 11

Cuadro Sinóptico de Parásitos Emergentes

	BALANTIDIOSIS	MICROSPORIASIS
Phylum	Ciliophora	Microspora
Agente etiológico	<i>Balantidium coli</i>	<i>Encephalitozoon sp</i> , <i>enterocytozoo sp</i> , <i>Vitaforma sp</i> , <i>Nosema sp</i> , <i>Pleistophora sp</i> v <i>Trachinleistonhora sp</i> .
Distribución	Predominante de climas cálidos (Latino América, Sureste de Asia y Papua Nueva Guinea).	Mundial, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Donde se le ha buscado, se le ha encontrado.
Epidemiología	Afecta a personas que manejan el cuidado de los cerdos.	Afecta a inmunocompetentes e inmunosuprimidos, con mayor severidad y frecuencia a estos últimos.
Patología	Provoca cuadros muy similares a los que causan las amibas, sin embargo puede cursar de modo asintomático.	Consultar cada una de las especies por separado
Síntomas	Diarrea, dolor abdominal , náusea, vómito, fiebre y se observan materias fecales mucosanguinolentas.	Varian un poco entre especies pero de modo general se pueden citar: Diarrea crónica , fiebre, conjuntivitis bilateral, tos crónica
Diagnóstico	De difícil diagnóstico. Se realiza examen directo en fresco con solución salina isotónica y observación al microscopio. Para observación de quistes se recomienda realizar técnicas de concentración o sedimentación.	Mediante microscopia electrónica de Transmisión, Microscopía Óptica y de Fluorescencia, Cultivo Celular, Serología y Técnicas Moleculares.

Cuadro 11

Cuadro Sinóptico de Parásitos Emergentes

Phylum	BLASTOCISTOSIS Sarcocystis	GIARDIASIS Sarcocystis
Agente etiológico	<i>B.hominis</i>	<i>Giardia lamblia</i>
Distribución	Cosmopolita, su papel como comensal, oportunista o patógeno no está claramente establecido.	Mundial, en especial en países en vías de desarrollo principalmente debida a condiciones pobres de higiene.
Epidemiología	Al parecer afecta por igual a niños, jóvenes incluso a ancianos.	Los niños pequeños son los más afectados
Patología	Es estrictamente anaerobio. Puede llegar a cursar de manera asintomática	Se le puede encontrar asociada a otros patógenos como Cryptosporidium. Aunque presenta numerosos síntomas puede cursar de forma asintomática
Síntomas	Diarrea, dolor abdominal , flatulencia, náusea, vómito, anorexia y fiebre. Ocasionalmente se observan materias fecales con sangre o exceso de moco y leucocitos	Diarrea aguda, dolor abdominal , flatulencia, inflamación, esteatorrea, náusea, vómito y anorexia.
Diagnóstico	Examen coproparasitológico por métodos de concentración-flotación en serie o examen directo en fresco. La tinción más adecuada es la tricrómica.	Examen coproparasitológico por medio de técnicas de concentración como el Faust o el MIFC, la tinción más recomendable es la hematoxilina ferrica y la tricrómica. Técnicas poro utilizadas pero eficaces CIE, ELISA.

Cuadro 12

Cuadro Sinóptico de Parásitos Emergentes pertenecientes al Phylum Apicomplexa

	BABEIOSIS	CRITOSPORIDIOSIS
Agente etiológico	<i>Babesia microti</i>	<i>C.parvum, C.muris</i>
Distribución	Mundial	Propia de zonas Tropicales y subtropicales de todos los continentes
Epidemiología	Afecta notablemente a splenectomized patients	Predomina en la población infantil y en la seropositiva, también en la población homosexual
Patología	Se transmite por un artrópodo como la garrapata y provoca síntomas como los de la Malaria y anemia hemolítica.	No se cuenta con un modelo experimental bien determinado que ponga en claro el mecanismo de infección.
Síntomas	Fiebre intermitente, escalofríos, sudoración, mialgias, fatiga, hepatoesplenomegalia y anemia hemolítica	Diarrea, dolor abdominal, cefalea, vómito, astenia y adinamia
Diagnóstico	a) Microscopía: Observación al microscopio de un frotis de sangre teñido con Giemsa. b) Detección de anticuerpos c) Métodos moleculares	Coproparasitológico con concentración como la de Sheeter, Tinción de Ziehl-Neelsen modificada, PAS, o Tricrómico. También se acude a la inoculación de animales. Se encuentran aún en desarrollo sin comercialización metodologías por PCR.

Cuadro 12

Cuadro Sinóptico de Parásitos Emergentes pertenecientes al Phylum Apicomplexa

	CICLOSPORIASIS	ISOSPORIDIOSIS	NAEGLERIASIS
Agente etiológico	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	<i>I.hominis, I.belli, I.natalensis, I.canis, I.felis</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
Distribución	Propia de zonas Tropicales y subtropicales a nivel mundial. Haití esta considerada zona endémica.	Oportunista enteropatógeno de distribución mundial	Mundial, aunque prevalece en cuerpo de agua dulce (lagos, lagunas, estanques, canales de riego)
Epidemiología	No se han descrito preferencia por algun sexo, raza o edad determinada.	Afecta mas a la población infantil, Personas con SIDA ó inmunosuprimidas	Se observa mas en niños y adolescentes, pero se le atribuye a que estos practican el nado recreativo en cuerpos de agua dulce contaminados
Patología	Deterioror importante en la morfología y fisiología del intestino delgado.	Cuadro de Gastroenteritis en inmunosuprimidos, pero en pacientes normales cursa de manera asintomática o curar de forma espontánea.	Provoca cuadros de meningoencefalitis amibiana primaria que suelen sufrir un curso fatal
Síntomas	Diarrea , anorexia, febrícula , dolor abdominal , pérdida de peso, náusea, vómito, mialgias, fatiga y flatulencia	Diarrea abundante, náusea, vómito, dolor abdominal , fiebre, y adenopatías	Cefalea intensa, fiebre, nausea, vomito en proyectil, fotofobia, confusión mental, irritabilidad entre otros
Diagnóstico	Examen Coproparasitológico con tecnicas de concentración y/o sedimentación para la recuperación de quistes (utilizando acetato de etilo). Observación al microscopio del sedimento al fresco, por microscopia de luz, fluorescente o de contraste o preparaciones teñidas usando safranina o ácido modificada	Observacion de muestras en fresco teñidas con lugol y previamente concentradas por el método de flotación de Sheater. Tambien pueden usarse tinciones como la de Kinyoun modificada o la fluorescente de auramina-rodamina.	Observación al microscopio de muestras de LCR, suero o material obtenido por biopsia teñidos con Giemsa o Wrigth. Tecnicas inmunologicas como ELISA son también de utilidad

5. MÉTODOS DIAGNOSTICOS

5.1 GENERALIDADES

Es muy común considerar que las enfermedades parasitarias representan un problema simple desde el punto de vista de diagnóstico; sin embargo, pueden llegar a constituir serios problemas de diagnóstico diferencial; muchas veces no se considera la posibilidad de etiología parasitaria entre las alternativas de diagnóstico en un paciente o no se recuerdan con claridad los procedimientos más apropiados para establecerlo. El diagnóstico de las infecciones por parásitos depende en gran parte de procedimientos de laboratorio que sirven para establecer, confirmar o descartar un diagnóstico realizado en bases clínicas.

El diagnóstico por el laboratorio de las parasitosis generalmente se confirma por el hallazgo directo del parásito, o por la detección de la respuesta inmune que provoca siendo importante por lo tanto el empleo de las mejores técnicas y de personal debidamente capacitado, cuidadoso y que disponga de los medios y el tiempo necesario para realizarlos.

Las muestras destinadas a fines de diagnóstico deben de obtenerse y manejarse de tal manera que en caso de existan parásitos, lleguen al laboratorio en un estado que permita su identificación. Los métodos para el diagnóstico de las parasitosis pueden dividirse en dos grupos:

5.2 MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS PARASITOSIS INTESTINALES

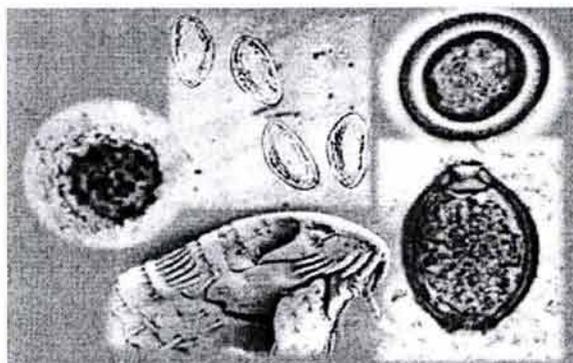
Se definen como los métodos para la detección e identificación de parásitos en materia fecal y/o en los tejidos del tubo digestivo y se les denomina como exámenes coproparasitoscópicos (Cuadro 13), ⁽¹⁹²⁾ la utilidad de cada uno de ellos es variable y depende de muchos factores; el examen directo por ejemplo es el procedimiento técnicamente más sencillo, rápido y económico; sin embargo las tinciones especiales

pueden identificar con mayor seguridad al género y a la especie de microorganismo algunas características del ciclo biológico del parásito: oviposición en los márgenes del ano (*Enterobius vermicularis*); termotropismo (*Balantidium coli*); localización anatómica, peso y tamaño del parásito, la necesidad de evaluar el grado de infección, etc., originan la necesidad de contar con diversos métodos parasitológicos.

Básicamente en materia fecal se buscan dos tipos de parásitos: Protozoarios y Helmintos; en el primer caso el laboratorio deberá de determinar si el objeto examinado es o no un protozoario. La diferenciación de protozoarios con objetos no parasitarios es uno de los mayores problemas para el microscopista: Existen tres grupos de objetos no parasitarios que pueden confundirse con ellos, células del huésped, detritus fecales y organismos no protozoarios. ⁽¹⁹³⁾

La identificación de parásitos de base en criterios morfológicos, los quistes, huevos y larvas de parásitos intestinales son muy uniformes en su apariencia general, existiendo tan solo la variación inherente en tamaño de cualquier organismo vivo.

Existen numerosos parásitos que pueden encontrarse en materia fecal y que no se consideran como patógenos primarios pero cuya presencia es indicativa de contaminación fecal o higiene deficiente, y cuyo hallazgo deberá de orientar hacia la posible presencia concomitante de patógenos primarios, y a la toma de medidas higiénico-sanitarias en personal manejador de alimentos debiendo diferenciarse claramente de los considerados como patógenos primarios y no confundirse con ellos. ⁽¹⁹⁴⁾



CUADRO 13. Clasificación de exámenes coproparasitológicos ⁽¹⁹²⁾

POR EL TIPO DE PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	POR SU EXPRESIÓN NUMÉRICA	MÉTODOS ESPECIALES
<ol style="list-style-type: none"> 1. Directo: Macroscópico o microscópico 2. Concentración por: <ol style="list-style-type: none"> a. Flotación b. Sedimentación c. Termotropismo 3. Dilución 4. Cultivo 5. Aclaramiento 6. Tinción 	<ol style="list-style-type: none"> 1. CUALITATIVOS: <ol style="list-style-type: none"> a. En fresco b. Cucharilla rectal c. Centrifugación Flotación (Faust) d. Flotación (Willis) e. Sedimentación (Ritchie) 2. CUANTITATIVOS: <ol style="list-style-type: none"> a. Concentración (Ferreira) b. Dilución (Stoll) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tamizado 2. Graham 3. Baermann 4. Biopsia tejidos 5. Microscopia electrónica
POR APLICACIÓN DE COLORANTES	POR EL MOMENTO DE SU REALIZACIÓN	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparaciones húmedas 2. Preparaciones fijas: <ol style="list-style-type: none"> a. Temporales b. Permanentes 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inmediato o en fresco 2. Mediato: de muestra preservada o no preservada 	

OBTENCION DE LA MUESTRA

Las muestras de materia fecal deberán de colocarse directamente en recipientes limpios y secos, las heces que han sido depositadas en el suelo son totalmente inadecuadas ya que pueden dar lugar a errores de diagnóstico por la presencia de larvas de vida libre y otros contaminantes que provienen de la tierra, tampoco son adecuadas las heces recogidas del excusado, no solo por el riesgo de que se contaminen con otros organismos, sino que además el agua y la orina puedan destruir a los protozoarios que pudieran existir.

Es muy importante también determinar la consistencia de la materia fecal (formada, semiformada, suave o líquida), ya que puede orientar hacia el tipo de organismos que pudiera estar presente; los trofozoítos se encuentran habitualmente en muestras blandas o líquidas, rara vez en heces formadas, lo contrario es cierto para las formas quísticas.

El la figura 65 se muestra la distribución de protozoos en relación a la consistencia de la material fecal y debe prestársele las consideraciones precisas cuando se reciben este tipo de muestras.

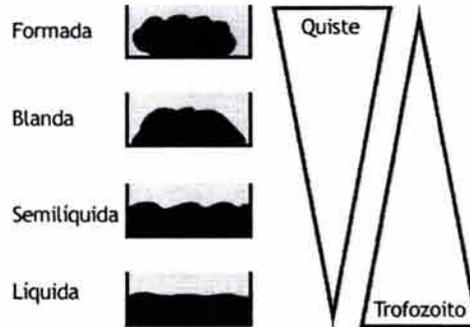


Figura 65 ⁽¹⁹⁵⁾

Distribución de las formas parasitarias en la materia fecal de acuerdo a a su consistencia

1. Una muestra fresca debe ser procesada tan pronto como se recibe, o debe de lo contrario ser preservada adecuadamente. Una excepción a esta regla son las muestras guardadas bajo refrigeración y en las cuales es conveniente analizar mediante una prueba de antígeno.
2. Una vez que la muestra ha sido preservada, puede procesarse. Si se cuenta con los equipos de detección rápida que existen en el mercado, es muy sencillo, baste seguir al pie de la letra las indicaciones de los mismos, de lo contrario la muestra deberá ser dividida y guardada en distintos recipientes preservados cada uno de ellos (formalina al 10% y alcohol polivinílico PVA). Añada un volumen de muestra por tres del agente preservador.
3. Asegúrese de que la muestra se mezcla perfectamente con el preservador. Una muestra de materia fecal bien formada debe primero ser desintegrada en porciones mas pequeñas de manera mecánica.
4. Asegúrese de que los contenedores de las muestras sellan perfectamente y puede añadirseles un sello extra con parafilm, estos contenedores a su vez pueden guardarse en una bolsa de plástico perfectamente etiquetada.
5. La recolección de muestras deberá repetirse si el primer análisis de la misma resulta negativo. De ser posible se examinaran tres muestras en un intervalo de 2 a 3 días.
6. El examen de muestras líquidas deberá de llevarse a cabo en los siguientes 30 minutos después de haber sido emitidas, las blandas una hora después y las formadas el mismo día o conservarse.

7. Algunos medicamentos o compuestos, interfieren con la observación o búsqueda de parásitos como es el caso de purgantes, compuestos antidiarreicos, antibióticos, antiácidos y preparados de bario y bismuto por lo que las muestras deberán de obtenerse antes de la ingestión de dichos compuestos. ⁽¹⁹⁵⁾

Como la expulsión de parásitos es intermitente y las técnicas parasitológicas tienen limitaciones, el estudio de varias muestras aumenta considerablemente las posibilidades de demostrar parásitos

5.3 MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS PARASITOSIS EXTRAINTESTINALES

A diferencia de las parasitosis intestinales, el diagnóstico por el laboratorio de las parasitosis extraintestinales requiere de muestras accesibles en su mayor parte por procedimientos invasivos tales como sangre, líquido cefalorraquídeo, aspirados, biopsias y de métodos especiales como cultivos, inoculación a animales y más recientemente de procedimientos de biología molecular.

Algunos parásitos pueden observarse en sangre fresca por su movilidad y tamaño característicos, sin embargo su identificación específica requiere de tinciones y en algunos casos de procedimientos de concentración por centrifugación diferencial con objeto de buscarlos en células mononucleares. En unos cuantos años las técnicas de biología molecular aplicadas en el diagnóstico y tratamiento de numerosas enfermedades han evolucionado de una mera curiosidad tecnológica a un vasto campo que está revolucionando la práctica de la medicina y que eventualmente reemplazarán a los métodos actuales de diagnóstico. La parasitología ha sido el último campo de la microbiología clínica en incorporarlas y aunque se han desarrollado numerosos métodos y se han caracterizado numerosas secuencias para amplificación, pocos han logrado evaluaciones clínicas o estudios de campo a gran escala. La obtención de muestras por medio de aspiración es un método de gran utilidad que puede revelar parásitos que por métodos convencionales no hubieran podido obtenerse; los más frecuentemente realizados son los de abscesos hepáticos pulmonares, bazo, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, ganglios linfáticos, abscesos diversos y úlceras cutáneas; el material obtenido deberá de procesarse de inmediato utilizando diversas técnicas

CUADRO 14. Protozoarios intestinales (18, 53, 192, 196-199)

PROTOZOARIO	Sección 1.01 MÉTODO DIAGNÓSTICO	MUESTRA	ESTADIO
<i>Babesia microti</i>	Frotis teñido con Giemsa IFA * Técnicas Moleculares	Sangre	Trofozoitos * Anticuerpos
<i>Blastocystis hominis</i>	Concentración por Flotación en serie Examen directo en fresco Tinción Tricrómica, tricrómico de Gomori, Giemsa o Lugol parasitológico	Heces	Forma quística vacuolar
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Centrifugación diferencial (Solución Sheater) Tinción de ácido alcohol resistentes Safranina Tricrómica Inmunofluorescencia directa E.L.I.S.A. Hemaglutinación pasiva	Heces (Muestras múltiples) Biopsia Ileon terminal	Ooquistes Esporulados Trofozoitos
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Centrifugación diferencial (Solución Sheater) Contraste de fases Autofluorescencia Frotis y tinción de kinyoun, Zeihl-Neelsen o safranina Safranina Tricrómica	Heces	Ooquistes
<i>Isospora belli</i>	Examen directo en fresco Tinción para ácido alcohol resistentes Safranina Tricrómica Autofluorescencia (Auramina-rodamina)	Heces Biopsia intestinal	Ooquistes
<i>Microsporidium</i>	Frotis y tinciones diversas: Hematoxilina, eosina, P.A.S., Gomori, Giemsa, cromotropo 2R Safranina Tricrómica luz polarizada, Microscopía electrónica P.C.R.	Heces Aspirado duodenal Biopsia intestinal	Esporas Diferenciación género
<i>Naegleria fowleri</i> y <i>Acanthamoeba spp</i>	Exámen directo Frotis teñido con Giemsa o Wright ELISA	LCR Suero Biopsia	Trofozoitos o forma flagelada Quistes

5.4 PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

Como mencionamos antes esta herramienta deberá emplearse cuando la muestra no pueda ser examinada de forma inmediata. A continuación se muestra una tabla con los agentes preservadores, entre ellos los más utilizados son la formalina al 10% y el alcohol polivinílico PVA.

<i>Preservador</i>	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
<i>Formalina al 10%</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ De fácil preparación ▪ De larga duración y apto para almacenar ▪ Excelente para la preservación de huevos de helmintos, larvas y quistes de protozoos (incluyendo coccidios). ▪ Adecuado en la utilización de métodos de concentración y microscopía epifluorescente. ▪ Adecuado para utilizar posteriormente tinciones como la de cromotropo. ▪ Compatible con los kits de inmunoensayo y microscopía epifluorescente. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ No recomendable para ciertas tinciones permanentes como la tricrómica. ▪ Inapropiado para la preservación de la morfología de algunos trofozoitos de protozoarios. ▪ Puede interferir para un posterior procedimiento por PCR especialmente después de un prolongado tiempo de fijación.
<i>MIF (merthiolate-iodo-formaldehído)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Los componentes fijan y tiñen a la vez a los microorganismos. ▪ De fácil preparación. ▪ Puede conservarse por largo tiempo ▪ Útil para trabajos de campo. ▪ Adecuada para posteriores técnicas de concentración. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ No es adecuada para algunas tinciones permanentes como la tricrómica. ▪ Inapropiado para la preservación de la morfología de algunos trofozoitos de protozoarios ▪ El Iodo interfiere con otras tinciones y con la fluorescencia. ▪ El Iodo puede causar distorsión en la apreciación del protozoario. Lo que provoca inconsistencia y falta de confiabilidad para detectar parásitos en la muestra por concentración.
<i>LV-PVA (Alcohol polivinílico de baja densidad)</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Excelente preservador para la morfología de quistes y trofozoitos de protozoarios. ▪ De fácil manufactura en preparaciones permanentes teñidas con la tinción tricrómica (la solución preserva a los parásitos y a su vez los hace adherirse a la superficie del portaobjetos en la preparación) ▪ Las muestras preservadas con el permaneces estables por varios meses. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Inadecuado para par preservación de huevos y larvas de helmintos, coccidios y microsporidios. ▪ Contiene cloruro de mercurio. ▪ Resulta un conservador caro y de difícil almacenaje. Involucra un procedimiento muy laboreoso para su preparación No es adecuado utilizarlo a la par de un método de concentración. No puede ser utilizado cuando se va procesar la muestra con un kit de inmunoensayo. No es buena para la tinciones de cromotropo, y safranina

<p><i>SAF</i> (acetato de sodio- ácido acético- formalina)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Indicada para utilizarse con métodos de concentración y para preparaciones teñidas en forma permanente. ▪ De fácil preparación ▪ Puede conservarse por largo tiempo ▪ Adecuada para utilizarse con las siguientes tinciones: safranina, cromotopo y acid-fast, safranin. ▪ Compatible con los kits de inmunoensayo. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Requiere de aditivos como glicerina o albúmina para lograr una adhesión de la muestra al portaobjetos en y lograr una adecuada preparación.
<p><i>Fijador de Schaudinn</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Excelente para la preservación de la morfología de trofozoitos y quistes de protozoarios. ▪ Easy preparation of permanent stained smears 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ El menos indicado para un procedimiento posterior de concentración ▪ Contiene cloruro de mercurio. ▪ Inapropiado para la preservación de la morfología de larvas y huevos de helmintos, coccidios y microsporidios. ▪ Muestra una pobre adherencia de las muestras liquidas o con moco hacia el portaobjeto.
<p><i>PVA Modificado</i> - cobre o zinc -</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Las tinciones permanentes pueden realizarse y teñirse posteriormente con la tinción tricrómica. ▪ El Zinc se prefiere sobre el cobre. ▪ No contiene cloruro de mercurio. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ No logra teñir de manera consistente. ▪ La morfología de los microorganismos no se aprecia co Puede conservarse por largo tiempo n claridad y es pobre. ▪ Al utilizar Cobre la morfología de los quistes y trofozoitos es pobremente apreciada. ▪ El Zinc provee una mejor morfología pero no comparable a la de LV-PVA
<p><i>Fijadores Viales Comerciales</i> (Ecofix, Parasafe, Unifix, Proto-fix, STF, entre otros)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ El concentrado y permanente de la muestra puede hacerse fuera un vial. ▪ No contienen cloruro de mercurio. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Solo ciertos fijadores viales aceptan determinadas tinciones lo que limita su uso. ▪ La tinción no es siempre consistente. ▪ Son un poco más caros que la formalina y LV-PVA

(195)

Como puede observarse tanto la Formalina al 10% como el PVA presentan ciertas ventajas sobre los otros, se recomienda que las muestras se dividan en dos partes y sean preservados en ambos agentes, añadiendo un volumen de muestra por tres de agente preservador. Los equipos de detección rápida comerciales presentan la particularidad de que pueden conservarse por numerosos meses, y dependerá de las posibilidades del laboratorio la accesibilidad a ellos.

5.5 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

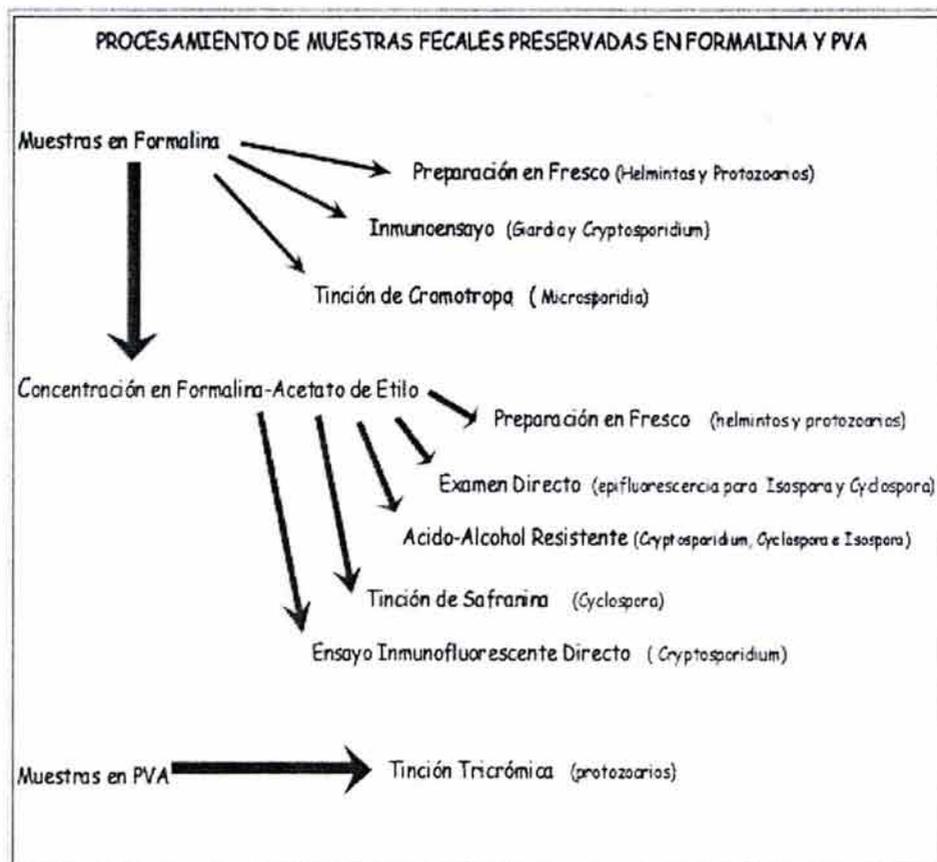
El examen de la una muestra puede realizarse con la misma al fresco o preservada.

Muestras al fresco y preservadas

En este tipo de muestra se puede observar el movimiento de trofozoitos, pero debe hacerse de manera casi inmediata a la recolección de la muestra evitando retrasos. Las muestras líquidas (diarreicas) deben examinarse dentro de los 30 minutos posteriores a la recolección de la misma, no a los 30 minutos que ha llegado al laboratorio, y las muestras de consistencia suave pero no líquida deberán examinarse dentro de la primera hora una vez que ha sido obtenida la muestra.

Si no pueden evitarse retrasos en el procesamiento de la muestra, el espécimen entonces deberá ser preservado para evitar así la desintegración de los trofozoitos. Para heces bien formadas no es necesaria tanta premura en el tiempo de análisis, y pueden guardarse y conservarse de forma adecuada para su examen. ⁽²⁰⁰⁻²⁰¹⁾

El siguiente diagrama de flujo sugiere la manera de como preservar y procesar las muestras en formalina y PVA. Este es la metodología seguida por el CDC: ⁽¹⁹⁵⁾



Las Muestras preservadas en **Formalina** pueden examinarse de forma directa ya sea como una preparación al fresco, o teñirse con colorantes como el de cromotropeo, o si se va a realizar un inmunoensayo, tinciones para UV y epifluorescencia. O también puede optarse por realizar un procedimiento de concentración antes del examen.

Los procedimientos de **Concentración** separan a los parásitos de otros restos en la materia fecal e incrementan la probabilidad de detectar microorganismos en especial cuando estos se hallan en poca cantidad. Se dividen en técnicas de flotación y sedimentación.

Los métodos de **Flotación** normalmente usados son el de Sulfato de Zinc o el de Sheather, los cuales usan soluciones con una gravedad específica superior a la de los microorganismos lo que los hace flotar y por ello alcanzan la parte superior del recipiente que lo contiene mientras que los restos se depositan en el fondo. La principal ventaja de estas técnicas es que logran producir un aclaramiento de la muestra, lo que no ocurre con las técnicas de sedimentación. La desventaja es que en la mayoría de estas técnicas la pared de algunos huevos o quistes usualmente se colapsa, dificultando su posterior identificación. O en su defecto no todos los huevos de parásitos logran flotar. ⁽¹⁾

Las técnicas de **Sedimentación** utilizan soluciones de una gravedad específica menor a la de los organismos parásitos, esto hace que se concentren entonces en el sedimento de la solución. Estas técnicas son muy recomendadas por la mayoría de los laboratorios ya que se preparan fácilmente y están sujetas a una menor cantidad de errores con respecto a las otras. ⁽²⁰²⁻²⁰³⁾ La técnica de sedimentación utilizada por el CDC es la de Acetato de etilo-formalina, que es una técnica que elimina los problemas de la inflamabilidad del éter y la cual puede utilizarse con muestras preservadas en MIF o SAF. ⁽¹⁹⁵⁾

Método de Concentración por Sedimentación del Acetato de Etilo-Formalina ⁽¹⁹⁵⁾

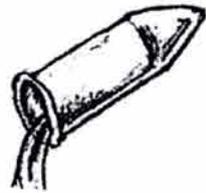
1. Mezcle adecuadamente la muestra .



2. Filtre aproximadamente 5 ml de una suspensión de la materia fecal a través de un trozo de gasa mojada colocada sobre un cono de papel desechable dentro de un tubo conico de 15 ml para centrífuga.



3. Añada 0.85% saline o 10% de formalina a través de los restos contenidos en la gasa hasta alcanzar un volumen de 15 ml dentro del tubo para centrífuga. También puede emplearse agua destilada para llegar al aforo, pero se corre el riesgo de destruir o deformar a *Blastocystis hominis* si es que se haya en la muestra.



4. Centrifugue a $500 \times g$ durante 10 minutos.

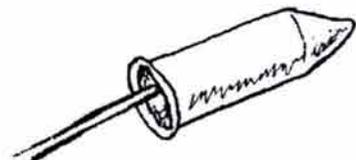
RPM - velocidad del rotor en revoluciones por minuto
 g - fuerza centrífuga (max 1000g)
 r- radio; distancia horizontal entre la punta del cono de sedimentación y spindle centre measured in mm

Nota: Para calcular la RPM en cualquier centrifuga, utilice

$$\text{RPM} = (g / 1.12 r) \times 1000)^{\dagger}$$



5. Decante el supernadante. Añada 10 ml de formalina al 10% a el sedimento y mezcle perfectamente con la ayuda de un aplicador de madera.



6. Agregue 4 ml de acetato de etilo, tape bien el tubo y agite vigorosamente e invierta su posición por 30 segundos, con sumo cuidado quite el tapón del tubo para liberar un poco de la presión generada.
7. Centrifuge a $500 \times g$ por 10 minutos.
8. Remueva el tapón de restos formado del tope del tubo con ayuda de un palillo aplicador de madera. Decante las capas superiores del sobrenadante.
9. Use un aplicador con algodón en la punta para remover los restos de las paredes del tubo centrífuga.
10. Añada numerosas gotas de formalina al 10% para resuspender la muestra concentrada. Continúe con el siguiente protocolo que haya elegido para analizar su muestra.

(193, 203)

- Existen en el mercado tubos de concentración comerciales que abaten los tiempos del procesamiento de muestra así como instrumental de laboratorio. (por ejemplo, Fecal Parasite Concentrator, Evergreen Scientific).

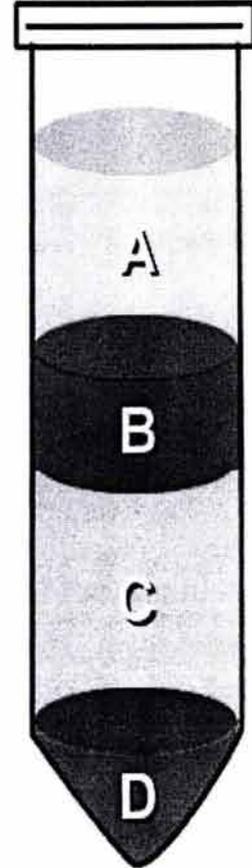
Las **Muestras preservadas en PVA** se procesan de la manera siguiente:

1. Asegúrese de que la muestra está bien mezclada.
2. Realice un frotis con 2 o 3 gotas de suspensión de la muestra, la cantidad dependerá de la densidad de la muestra.
3. Fije al calor la laminilla, si cuenta con un equipo de calentamiento, caliéntelo ahí durante 5 minutos a 60°C . o seque completamente al aire a temperatura ambiente.

Las preparaciones podrán ser teñidas con la tinción tricrómica o guardada por algunos meses en una caja o contenedor adecuado que permita su posterior tratamiento y examinación. (193, 202-203)

Metodo de Concentración por Sedimentación del Acetato de Etilo: ⁽²⁰²⁾

- 1) Haga pasar un poco de heces (cerca de 5x5 mm) a través de un colador con aproximadamente 9 ml de agua, y coloque el líquido que fluye en un tubo para centrífuga de 15 ml. .
- 2) Añada al tubo 3 ml de acetato de etilo y sellelo. Agite el tubo vigorosamente y centrifúgelo.
- 3) Con la ayuda de un palillo aplicador, corte en forma de un anillo el tapon de grasa formado en la interfase agua-acetato de etilo, (el tapon se adhiere a un costado del tubo y de ahí es fácilmente removido para posteriormente purgar el sobrenadante contenido en el tubo).
- 4) Decante el sobrenadante, hagalo cuidadosamente y evite que el sedimento se integre a esta porción líquida, recuerde que el objetivo es dejar el sedimento intacto.
- 5) Transfiera parte del sedimento del fondo del tubo a una laminilla y examínelo. Puede hacerlo de una de las siguientes formas: 1) Si permanece algo de líquido, la pequeña porción puede resuspenderse y tomarse con la ayuda de una pipeta. 2) Añada una gota de solución yodada a la pequeña porción sobrante y resuspendala y luego transfírala con una pipeta. 3) Utilice un palillo aplicador para remover parte del sedimento y realice con el un frotis sobre una laminilla.



Una vez que se remueve el tubo de la centrifuga pueden observarse claramente las siguientes capas:

A. Capa de acetato de Etilo en la Superficie superior. B. A plug de grasa semidisuelta en la parte media del tubo. C. Una capa de agua. D. A pellet de sedimento en el fondo del tubo.

NOTA: Si usted utiliza esta técnica solo para remover la grasa, usted puede resuspender la gota en una solución para flotación, centrifugar y remover el material de la parte superior del tubo para la búsqueda de huevecillos.

Método **PARASEP**[®] (195, 203)

PARASEP[®] es un kit comercial para la concentración de parásitos, es rápido, sencillo de usar, cuenta con un módulo específico de limpieza para una concentración más eficiente de ova helmínticas, así como quistes y ooquistes de protozoarios. La metodología es una modificación del método de Ridley-Allen.

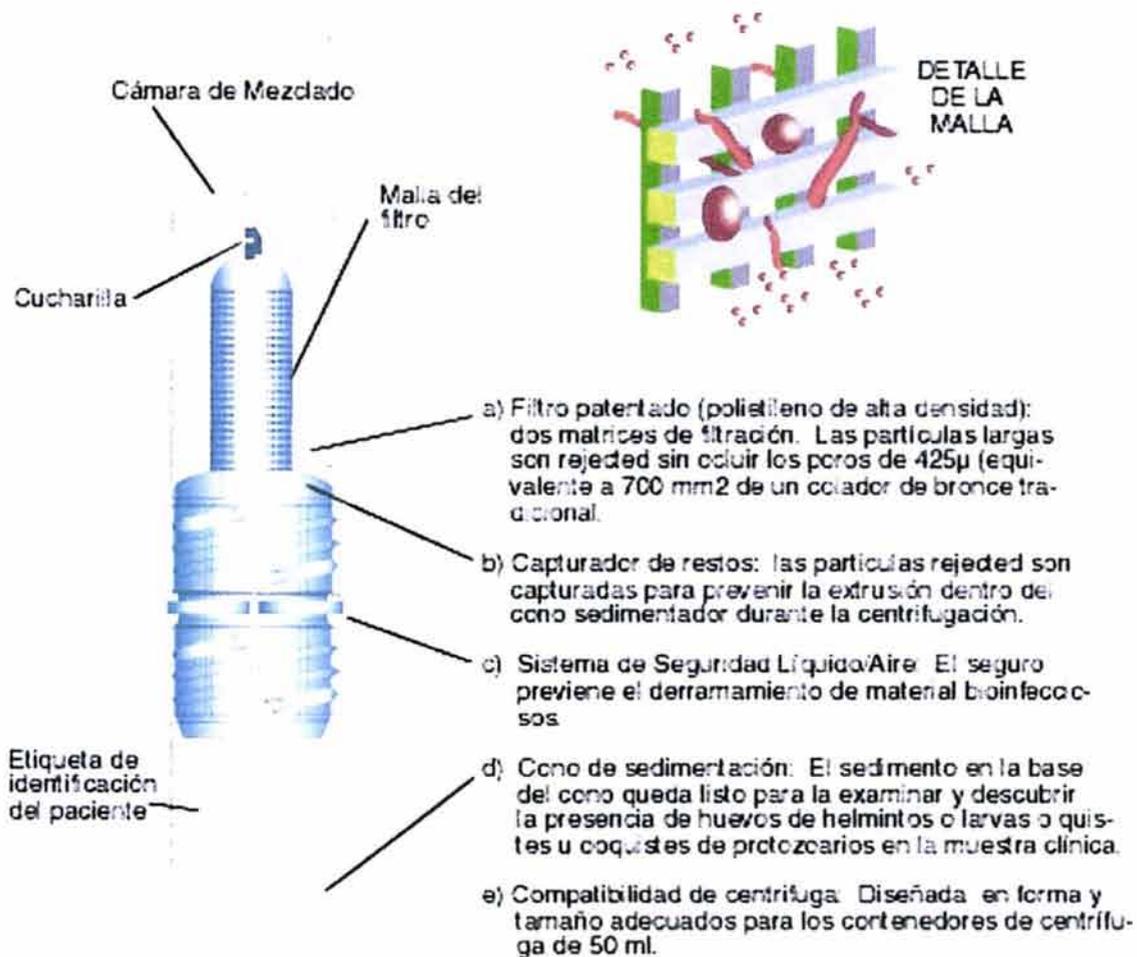


Figura 66
Método **PARASEP**[®]

Preparación de la muestra



Figura 67

1. Desenrosque la tapa y añada 6 ml de formalina tamponada al 10% en la cámara de mezclado y si se requiere una gota de surfactante para emulsificar. (como Triton X-100).
2. Añada 2 ml de acetato de etilo a la cámara de mezclado.
3. Introduzca una muestra fecal del tamaño de un chícharo con ayuda de la cucharilla dispuesta para este fin que incluye el sistema PARASEP®.
4. Incorpore perfectamente la mezcla con ayuda de la cucharilla, si la muestra se encuentra demasiado dura triturela con la punta de la cucharilla.

Emulsificación

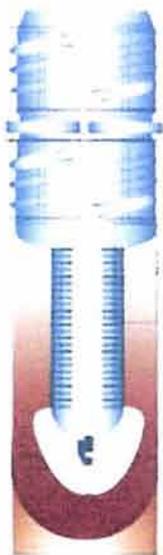
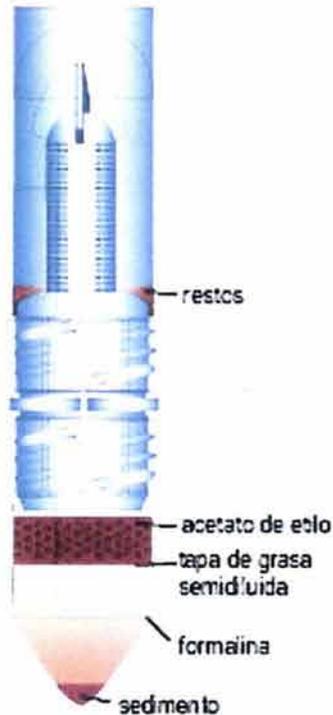


Figura 68

1. Cierre el sistema PARASEP® enroscando a la unidad cónica.
2. Agite para emulsificar con el cono de sedimentación y procure que quede en la posición que se muestra al lado.
3. En este punto, la muestra debe dejarse en reposo por 24 horas.

Concentración de los Parásitos



1. Invierta el sistema PARASEP® y centrifugue a 100g por un minuto o 500g por 5 minutos.
2. Parasep esta diseñado para encajar adecuadamente en las cubetas para centrifuga de 50ml.

RPM – velocidad del rotor en revoluciones por minuto

g – fuerza centrífuga (max 1000g)

r – radio; distancia horizontal entre la punta del cono de sedimentación y spindle centre measured in mm

Nota: Para calcular la RPM en cualquier centrifuga, utilice

$$RPM = ((g / 1.12 r) \times 1000)^{1/2}$$

Figura 69

Examinación

1. Abra lentamente el sistema para evitar que se disperse la mezcla en aerosol.
2. Desenrosque y deseche la cámara de mezclado y el sistema de filtración.
3. Remueva el tapón grasoso formado y elimine el líquido que circunda el sedimento.
4. Transfiera el sedimento para proceder a su examinación. Si lo desea agregue una gota de lugol parasitológico para identificar mejor los agentes protozoarios.



Figura 70

El sistema PARASEP® incorpora un filtro patentado que ofrece una gran superficie de área. La estructura tridimensional previene que se bloquee la superficie de filtración, lo que da como resultado que las partículas largas sean prevenidas de pasar a través del filtro y son sostenidas por las barras horizontales en un primer plano. La orientación vertical en el segundo plano significa que el proceso de filtración es tangencial. En la base del filtro se encuentra el capturador de restos, donde las partículas son repelidas y evitan una oclusión de los poros del filtro (tamaño del poro: 425 nm). La gran superficie de área retiene suficiente cantidad de muestra fecal y a su vez la clarifica para lograr una preparación limpia sobre el microscopio.

Instrucciones de uso

Ventajas del sistema PARASEP® comparado con los métodos convencionales:

Se realizó un estudio que comparara al método tradicional Ridley-Allen contra este nuevo. Durante el mismo las observaciones consideradas fueron la recolección de parásitos, la densidad del depósito, facilidad y sencillez en el desarrollo de cada uno, aspectos de seguridad e higiene y por supuesto el costo. 100 muestras fecales con su respectivo duplicado se trataron mediante ambos métodos. De este se observó que la recolección de parásitos es similar con ambas técnicas, y se encontró que el método Ridley-Allen tradicional es más barato, de trabajo un tanto más laborioso y presenta riesgos de seguridad e higiene inevitables.

Concluyendo el sistema PARASEP® es:

Simple y consta de cuatro pasos rápidos.

- Ventajas en seguridad e higiene sobre otras unidades desechables.
- Un sistema de sello total que previene al operador de una bio-exposición.
- Un filtro único altamente eficiente.
- Una reducción en el volumen de reactivos.
- De uso sencillo.
- Evita una contaminación de la muestra.
- Ofrece una óptima recogida de muestra.
- Se optimizan los recursos humanos de un laboratorio.

Nota: desafortunadamente en nuestro país no se cuentan en todos los laboratorios de análisis con el presupuesto suficiente que alcance para este tipo de novedosos sistemas y son raros los que se puedan dar el lujo de contar con él.

5.6 TÉCNICAS DE TINCIÓN

Existen numerosas técnicas para teñir y darle color a una muestra que permita diferenciar a los organismos que puedan estar presentes en ella. Las técnicas de tinción pueden realizarse en preparaciones en fresco y en preparaciones fijas.

Generalidades para tinciones en preparaciones fijas: ^(193, 202)

Fijación.- Los procedimientos químicos son los más usados para matar y fijar los parásitos. Una buena fijación es aquella en la cual el agente fijador penetra rápidamente, parando de inmediato los procesos metabólicos, con un mínimo de distorsión o cambios degenerativos.

Las tinciones pueden realizarse en dos formas: **progresivas** y **regresivas**; las primeras son aquellas que se hacen con el colorante diluido, colocando las piezas a teñir, durante el tiempo necesario para su tinción, hasta la intensidad deseada; el segundo tipo o regresivas son aquellas en que el material se coloca en colorante concentrado hasta lograr una sobre tinción y posteriormente decolorar diferenciando las estructuras hasta la intensidad deseada; la mayor parte de los procedimientos son del segundo tipo, y se necesita de mucha práctica para lograr la diferenciación (decoloración) exacta.

Una técnica de tinción puede involucrar varios pasos y procedimientos alternos así que para familiarizarse con los términos que en la mayoría se utilizan a continuación se explican en breve.

Para que los productos tomen el colorante adecuadamente, en algunas tinciones es necesario, la acción de un *mordiente*, que es como una especie de anclaje para el colorante sobre el organismo a teñir; generalmente se utiliza una sal de aluminio o hierro o bien un ácido, ya sea antes del colorante o, adicionado a la solución de tinción. Para tinciones contrastantes de estructuras diferentes, es necesario utilizar más de un colorante o separadamente o mezclados.

Deshidratación.- El agua debe de eliminarse por completo de las preparaciones. La deshidratación se hace mediante pasos sucesivos en soluciones alcoholicas de concentraciones crecientes, hasta llegar a alcohol absoluto.

Aclaramiento.- Este paso es crítico y es aqui donde algunas estructuras se pueden colapsar si no se tiene cuidado en el paso previo del alcohol absoluto a la solucipon o sustancia alcarante; generalmente hay dos pasos previos en alcohol absoluto y en seguida se introducen las preparaciones en xilol, que es un buen aclarante.

Posterior a una tinción vienen otra serie de procedimientos que daran como resultado una prepración fija que pueda ser conservada y utilizada como archivo biológico del laboratorio, entre esos procedimientos podemos mencionar de modo general:

Montaje.- Los especímenes ya aclarados, se montan con bálsamo de Canadá o resina sintética. Para piezas grandes como proglótidos de céstodos o tremátodos como Fasciola hepatica se requiere de un medio de montaje espeso, mientras que para frotis debe de estar bastante diluído para posteriormente hacer una buena observación con objetivos de inmersión.

Limpieza.- Después de montar una preparación, es necesario esperar un tiempo variable entre 10 y 15 días y algunas veces hasta más tiempo si se trata de montaje de piezas grandes. Para acelerar el secado se recomienda introducir las prepraciones en estufa u horno a 60°C; después del secado, con una navaja u hoja de bisturí se raspa el exceso de resina y se limpia con una gasa con alcohol o xilol.

Etiquetado.- Despues de la limpieza es necesario etiquetar perfectamente con los datos correctos del parásito de que se trata, estadio del mismo y fecha. ⁽²⁰¹⁾

Tinción Ácido-Alcohol Resistente Modificada ⁽¹⁹⁵⁾

Esta técnica es útil para la identificación de quistes de las especies de coccidios (*Cryptosporidium*, *Isospora*, y *Cyclospora*), que normalmente no son detectados con técnicas rutinarias como la tricrómica. Contraria a la tinción de Ziehl-Neelsen, la tinción ácido alcohol resistente modificada, no requiere del calentamiento previo de los reactivos para lograr la tinción.

Muestra:

Puede emplearse tanto como sedimento concentrado como una muestra en fresco o preservada en formalina. Otros tipos de muestras como fluido duodenal, bilis, muestras de pulmón (esputo, lavado bronquial, biopsias) son igualmente útiles.

Reactivos:

Dentro de los cuatro pasos que requiere esta técnica, se emplean las siguientes soluciones;

1. Metanol absoluto
2. Alcohol ácido: 10 ml de ácido sulfúrico + 90 ml de etanol absoluto. Guardado a temperatura ambiente.
3. Carbofucsina de Kinyoun: se adquiere comercialmente.
4. Verde de malaquita al 3%: disuelva 3 g de verde de malaquita en 100 ml de agua destilada. Guarde a temperatura ambiente.

Procedimiento:

1. Prepare un frotis con 1 a 2 gotas de muestra en un portaobjetos y permita que se seque con un poco de calor. Cuide de no realizar un frotis demasiado grueso.
2. Fije con metanol absoluto por 30 segundos.
3. Tiña con la carbofucsina de Kinyoun por un minuto. Enjuague moderadamente con agua destilada y escurra.
4. Decolore con alcohol ácido por 2 minutos. Enjuague con agua destilada y escurra.

5. Contratiña con verde de malaquita por 2 minutos. Enjuague moderadamente con agua destilada y escurra.
6. Seque al calor por 5 minutos a 60°C. Monte la preparación con un cubreobjetos y observe al microscopio.
7. Examine entre 200 a 300 campos usando un objetivo de 40x o mayor. Para confirmar la morfología de un organismo, utilice un objetivo de 100 x y aceite de inmersión.

Control de Calidad:

Un frotis control para de una muestra fecal preservada en formalina es indispensable en el laboratorio para cada corrida, *Cryptosporidium* spp se tiñe de color rojo rosado. El fondo de la preparación debe teñirse de manera uniforme de color verde.

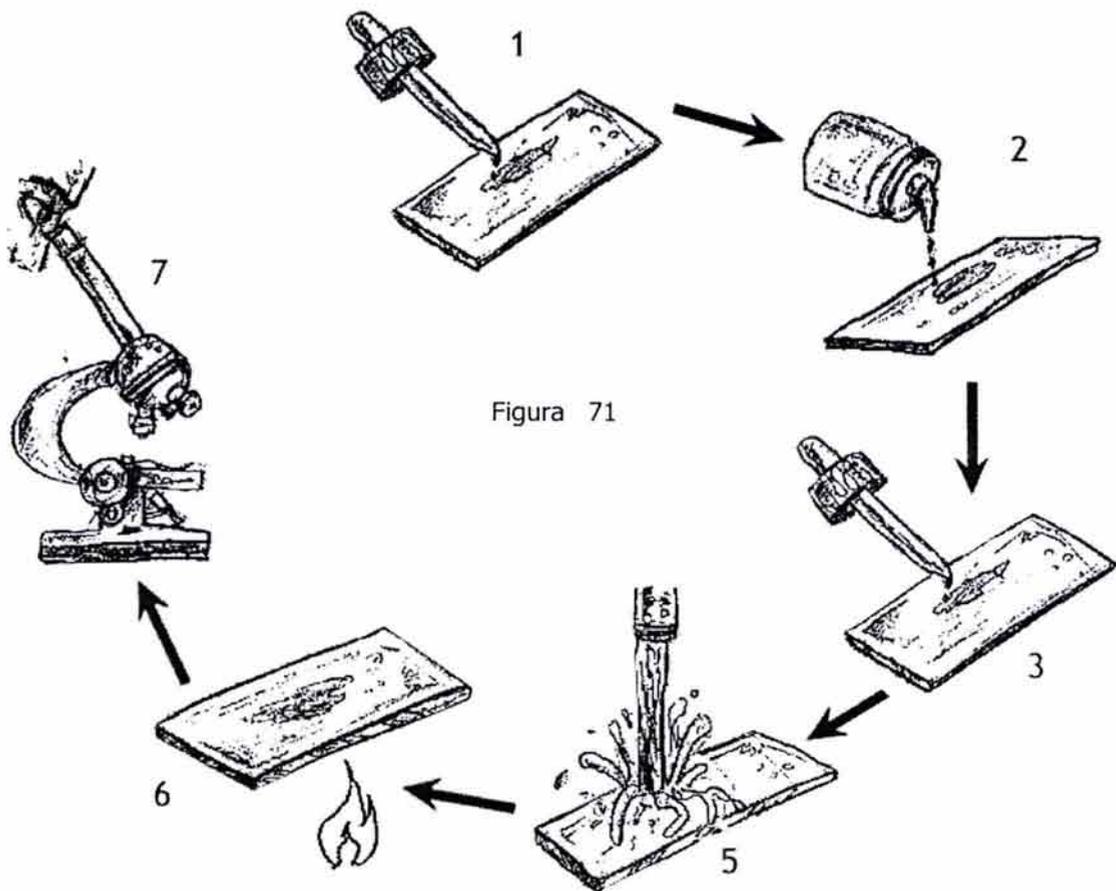


Figura 71

Tinción de Cromotropo ⁽¹⁹⁵⁾

Este método fue desarrollado en el CDC y utiliza varios componentes de la tinción tricrómica para diferenciar a las esporas de microsporidia del resto de elementos de la materia fecal.

Muestra:

Realice un frotis utilizando aproximadamente 10 µl de suspensión de muestra (no concentrada). Una muestra concentrada en formalina puede también usarse pero el número de organismos encontrados son esencialmente los mismos que en una muestra no concentrada. Fije al calor a 60°C hasta que seque completamente (5 a 10 minutos aproximadamente).

Reactivos:

Esta técnica involucra seis pasos y requiere de las siguientes soluciones:

1. **Metanol absoluto**
2. **Tinción de Cromotropo**

Cromotropo 2R	6.00 g
Verde fuerte ⁽²⁰⁵⁾	0.15 g
Ácido fosfotúngico	0.70 g
Ácido acético glacial	3.00 ml

* Mezcle los ingredientes y permita que reposen por 30 minutos. Después agregue 100 ml de agua destilada. Prepare mensualmente esta solución ya que es importante mantenerla fresca y de reciente preparación.

3. **Alcohol ácido:**

Etanol al 90%	995.5 ml
Ácido acético glacial	4.5 ml

4. **Etanol al 95%**
5. **Etanol al 100%**
6. **Xyleno o sustituto de Xyleno**

Procedimiento:

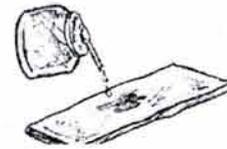
1. Fije el frotis en metanol absoluto durante 5 minutos.

2. Colóquelo en la tinción de cromotropo durante 90 minutos.



3. Decolore en alcohol ácido de 1 a 3 minutos, No más.

4. Sumerja y enjuague en etanol a 95%.

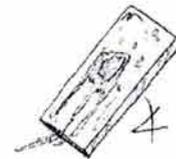


5. Hágalo pasar en dos cambios de etanol al 100% durante 3 minutos cada uno.

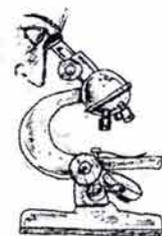
6. Sométalo a dos cambios de xylene o sustituto de xylene por 10 minutos cada uno.



7. Escurra la preparación y montela como acostumbra.



8. Observe la preparación utilice un objetivo de 100x y aceite de inmersión. Examine por lo menos de 200a 300 campos con el objetivo máximo y el aceite de inmersión.



Control de Calidad:

Una preparación control de microsporidia de una muestra preservada en formalina al 10% deberá incluirse en cada corrida de análisis. La pared de las esporas de microsporidia se tiñen de una coloración rojo-rosado y miden aproximadamente 1 μm .

Cambie todas las soluciones de trabajo de modo subsecuente después de 10 preparaciones para obtener un adecuado enjuague y deshidratación. Un microscopio con los objetivos en buen estado es indispensable para un correcto análisis. Debido a la dificultad de identificar a estos organismos tan pequeños, se recomienda que un segundo analista confirme un diagnóstico positivo.

Tinción de Gram

Esta tinción se utiliza en el laboratorio en la identificación de bacterias, pero una de las técnicas que se describen mas adelante utiliza en su mezcla ua porción de tinción de Gram, es por ello que se incluye en este apartado tanto la composición como la preparación de la misma. Esta tinción comprende el uso de varias soluciones. ⁽¹⁹³⁾

a) Solución de cristal violeta o violeta de genciana:

Solución alcoholica de cristal violeta o violeta de genciana.....10 cc

Solución acuosa al 1% de fenol..... 100 cc

Se mezclan y se filtran

b) Solución de Lugol:

Yodo1g

Yoduro de potasio2g

Agua destilada300 cc

Se mezclan y se filtran

c) Colorante de contraste.

Fucsina básica1g

Agua destilada100 cc

Tinción caliente y rápida de Gram-Cromotropo

Esta es una técnica alternativa al método de cromotropo que es más rápida, confiable, segura, y en general un método más simple para diagnosticar esporas de microsporidia en muestras fecales y de otro tipo. ⁽²⁰⁶⁾

Muestra:

Realice un frotis fino y delgado del material a analizar (heces, orina, esputo, saliva entre otros) y seque al aire.

Para fijados en formalina, secciones de tejido enbebidas en parafina, desparafinize como lo acostumbra. Hidrate en series de alcohol, y moje en agua la preparación antes de realizar la tinción de Gram.

Reactivos:

1. El necesario para la tinción de Gram
2. Cromotropo:

Cromotropo 2R	1.0 g
Verde Fuerte	0.15 g
Ácido fosfotungstico	0.25 g
Ácido acético glacial	3.0 ml

* Mezcle los ingredientes y permita que reposen por 30 minutos. Después agregue 100 ml de agua destilada. Prepare mensualmente esta solución ya que es importante mantenerla fresca y de reciente preparación

3. Alcohol ácido:

Etanol al 90%	995.5 ml
Ácido acético glacial	4.5 ml

4. Etanol al 95%
5. Etanol al 100%

Nota: Adicionalmente a los reactivos mencionados, se requiere calentar y mantener a los reactivos a una temperatura adecuada.

Procedimiento:

1. Fije al calor el frotis (3 veces por un segundo cada una sobre una flama). Deje enfriar a temperatura ambiente.



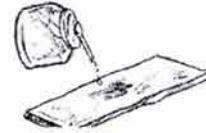
2. Efectúe la tinción de Gram omitiendo unicamente el paso del teñido con safranina de la manera siguiente:

- a. Sumerga la preparación en una solución de violeta de genciana y dejela reposar por 30 segundos. Para secciones con tejido prolongue hasta un minuto.
- b. Enjuague el exceso de colorante con abundante agua.
- c. Sumerja la preparación en la solución de iodo de Gram por 30 segundos. Para secciones con tejido prolongue hasta un minuto.
- d. Remueva la solución iodada enjuaguando abundantemente hasta decolorar la solución. Sostenga la preparación en un ángulo inclinado y añada la solución decolorante gota a gota hasta que observe que ha dejado de escurrir color de la preparación. Ponga especial cuidado en estos pasos para asegurar que las esporas toman la coloración precisa.
- e. Lave la preparación con abundante agua fría para remover el exceso del decolorador.



3. Para la tinción con cromotrope siga los siguientes pasos:
 - a. Coloque la preparación en una porción de solución de cromotrope calentada previamente (50 a 55°C) por lo menos durante 1 minuto. Para secciones con tejido prolongue el tiempo 30 segundos mas.
 - b. Enjuague en alcohol ácido al 90% por 1 minuto 30 segundos. Ponga especial cuidado en este paso para asegurar una correcta tinción en las esporas.

- c. Enjuague en etanol al 95% durante 30 segundos.



- d. Enjuague dos veces por 30 segundos cada vez en etanol al 100% (para realizar esta acción se necesitan dos contenedores por separado). Permita que la preparación seque con ayuda de Cytoseal60 * (Stephens Scientific) u otro sellador. Para secciones con tejido, se recomienda que las preparaciones sean lavadas brevemente en una solución de alcohol etílico al 50% y xileno al 50% por 15 segundos, previo al montaje.



Control de calidad:

Se recomienda contar con una preparación control de esporas de microsporidia de una muestra fecal preservada en formalina al 10% cada vez que se inicie una corrida.

En muestras de materia fecal, las esporas de microsporidia deberán aparecer como estructuras ovoides teñidas de un violeta oscuro con un fondo verde pálido.

Las células de levaduras, de encontrarse presentes en la muestra pueden teñirse de un violeta mucho más suave o con una coloración rosada lo que las hace distinguirse fácilmente y diferenciarlas de esporas de microsporidia.

En preparaciones citológicas, las esporas de microsporidia adquieren una coloración de violeta a rosadas y pueden contener gránulos gram positivos. Ocasionalmente, las esporas muestran un prominente cinturón ecuatorial haciéndolas inconfundibles.

* ver apéndice

Tinción de Safranina Modificada (método en caliente) ⁽¹⁹⁵⁾

Para *Cyclospora*, *Cryptosporidia*, y especies de *Isospora*:

Los ooquistes de *Cyclospora* en las muestras clínicas se diagnostican rutinariamente utilizando la tinción ácido-alcohol resistente en frío. Sin embargo, con esa técnica, los ooquistes se tiñen de forma variable, incluso algunos ooquistes no logran adquirir la coloración, lo que conlleva a resultados confusos. La técnica aquí propuesta produce una coloración uniforme sobre las esporas de estos microorganismos. La tinción requiere de un calentamiento para lo cual puede utilizar un platillo calentador o un horno de microondas.

(139, 155, 196)

Muestra:

Puede usarse sedimento concentrado o material al fresco o preservado en formalina. De igual forma son útiles algunos otros especímenes como muestras clínicas.

Reactivos:

Esta técnica involucra tres pasos, y requiere de las siguientes soluciones:

1. Alcohol ácido (Solución de HCl al 3%/Metanol): agregue lentamente 3 ml de HCl a 97 ml de metanol absoluto. Guarde a temperatura ambiente en un contenedor cerrado apretadamente.
2. Tinción de Safranina (Puede utilizarse la empleada en la tinción de Gram)
3. Verde de malaquita al 3%: disuelva 3 g de verde de malaquita en 100 ml de agua destilada. Guarde a temperatura ambiente.

Procedimiento:

1. Prepare un frotis fino y delgado en un portaobjetos y seque con un poco de calor. No intenso, suave.
2. Fije en alcohol ácido durante 5 minutos.
3. Enjuague con agua destilada.
4. Coloque en safranina hirviendo durante 1 minuto.
5. Enjuague con agua destilada.

6. Contratiña verde de malaquita por 1 minuto.
7. Enjuague brevemente con agua destilada.
8. Seque la preparación y montela con un cubreobjetos y como acostumbra.

Control de calidad:

Una preparación control para *Cyclospora* spp. De una muestra preservada en 10% de formalina deberá incluirse en cada corrida que se incie. Los quistes de *Cyclospora* spp. se colorearan entre rojo y anaranjado. El fondo debe observarse con un verde uniforme.

Tinción Tricrómica

La técnica más utilizada en Estados Unidos es el método tricrómico de Whatley, que es una modificación de la técnica de Gromori original para tejidos. Es rápida, simple y produce frotis adecuada y uniformemente teñidos de protozoarios intestinales, células humanas, levaduras y otros materiales.

Muestra:

La muestra consiste usualmente de materia fecal fresca o muestras fecales fijadas en PVA que se permiten secar al aire o en un calentador de laminillas a 60°C. También pueden emplearse muestras preservadas en acetato de sodio-ácido acético-formalina (SAF).

Reactivos:

Este procedimiento involucra siete pasos, y requiere de las siguientes soluciones:

1. Etanol al 70% adicionado con yodo: prepare una solución stock añadiendo cristales de yodo a alcohol al 70% hasta obtener una coloración parecida al te negro o rojiza oscura.
2. Etanol al 70%
3. Tinción Tricrómica: puede obtenerse de manera comercial.
4. Etanol ácido al 90%

Etanol al 90% 99.5 ml

Ácido acético glacial 0.5 ml

5. Etanol al 95%
6. Etanol al 100%
7. Xyleno o sustituto de xyleno

Procedimiento:

1. Para frotis preservadas en PVA, coloque la preparación en etanol al 70% adicionado con yodo durante 10 minutos. Para muestras fijadas de otro modo,

siga las instrucciones que indique el fabricante. Omita el paso del yodo para preservadores que no contengan cloruro de mercurio.

2. Coloque la preparación en etanol al 70% durante 5 minutos.
3. Coloquela por segunda ocasión en etanol al 70% esta vez por 3 minutos.
4. Coloquela en tinción tricrómica durante 10 minutos.
5. Decolore con etanol al 90% más ácido acético de 1 a 3 segundos.
6. Enjuague numerosas veces en etanol al 100%.
7. Colóquela en dos cambios de etanol al 100% por 3 minutos cada uno.
8. Colóquela en dos cambios de xylene o sustituto de xylene durante 10 minutos.
9. Monte la preparación como acostumbra.
10. Examine la preparación bajo el microscopio con el objetivo 100x y aceite de inmersión. Revise de 200 a 300 campos.

Control de calidad:

Es necesario contar con una preparación control de un protozooario conocido, por ejemplo *Giardia* spp de una muestra preservada en PVA para cada corrida que se inicie de este análisis. Cuando la preparación es fijada por completo y tratada correctamente, el citoplasma de los trofozoitos se observa de una coloración azul verdosa con un matiz morado. Los quistes tienden a observarse ligeramente mas morados. El núcleo y las inclusiones (cuerpos cromátidos, células sanguíneas, bacterias) y cristales de Charcot-Leyden se tiñen de rojo matizado con morado. El material de fondo usualmente se tiñe de verde lo que provee un excelente contraste frente a los protozoarios.

Tinción Safranina- Tricrómica (ST)

Esta tinción se desarrolló en 1999 en Argentina ⁽⁵³⁾, con el fin de economizar costos y tiempos en el diagnóstico de cuatro parasitosis de manera simultánea. Esta técnica permite detectar a *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, especies de *Microsporidia* e *Isospora belli* en materia fecal.

Reactivos

1. Safranina 1% (1 g de safranina en 100 ml de agua destilada)
2. Agua de canilla
3. Alcohol ácido 1 (3 ml de HCl en 97 ml de metanol)
4. Cromotropo 2 R (Cromotropo 2 R 6 g; Verde fuerte 0.15 g; ácido fosfotúngstico 0.7 g; 3 ml de ácido acético y 100 ml de agua destilada)
5. Alcohol ácido 2 (0.45 ml de ácido acético y 99.55 ml de alcohol etílico 90%)
6. Alcohol etílico 95%
7. Alcohol abosoluto
8. Xilol

Procedimiento

1. Los frotis fijados en metanol se cubren con la safranina al 1%
2. Se calienta hasta desprendimiento de vapores por 2 veces y se deja en contacton con la safranina durante 15 minutos
3. Se lava brevemente con agua de la canilla y se decoloran durante 5-10 segundos con el alcohol ácido 1
4. Se lava con agua dela canilla y se coloca en estufa a 37°C durñte 90 minutos en jarra de Koplín conteniendo el cromotropo
5. Se enjuaga con el alcohol ácido 2
6. Se pasan dos veces por alcohol etílico al 95%, el primero de forma breve y el segundo hasta 5 minutos
7. Se deshidrata en alcohol absoluto por5 minutos
8. Se colocan en Xilol durante 10 minutos.

Tinción Blanca de Calcofluor: ⁽¹⁹⁵⁾

Esta es una técnica quimiofluorescente útil para la detección de *Microsporidia spp.*, *Acanthamoeba spp.*, *Pneumocystis jiroveci*, y *Dirofilaria spp.* Los agentes quimiofluorescentes como el Calcofluor, Fungi-Fluor o el Uvitex 2B son también conocidos como agentes abrillantadores y no resultan en realidad caros. Estos reactivos son sensibles pero no específicos y pueden hacer fluorecer a otros organismos u objetos dentro de la muestra. Esta técnica debiera elegirse cuando se desee un análisis rápido y no para la precisa identificación de especies.

Muestra:

Realice un frotis delgado utilizando 10 µl aproximadamente de muestra fresca o preservada en un portaobjeto de vidrio. La muestra puede ser materia fecal, orina, cultivo entre otras. Fije al calor hasta que seque por completo.

Reactivos:

Este método involucra dos pasos y requiere de las siguientes soluciones:

1. Metanol absoluto
2. Reactivo de calcofluor blanco al 0.01%: Prepare una solución al 0.01% en .1M de Tris-buffered salino con un pH 2

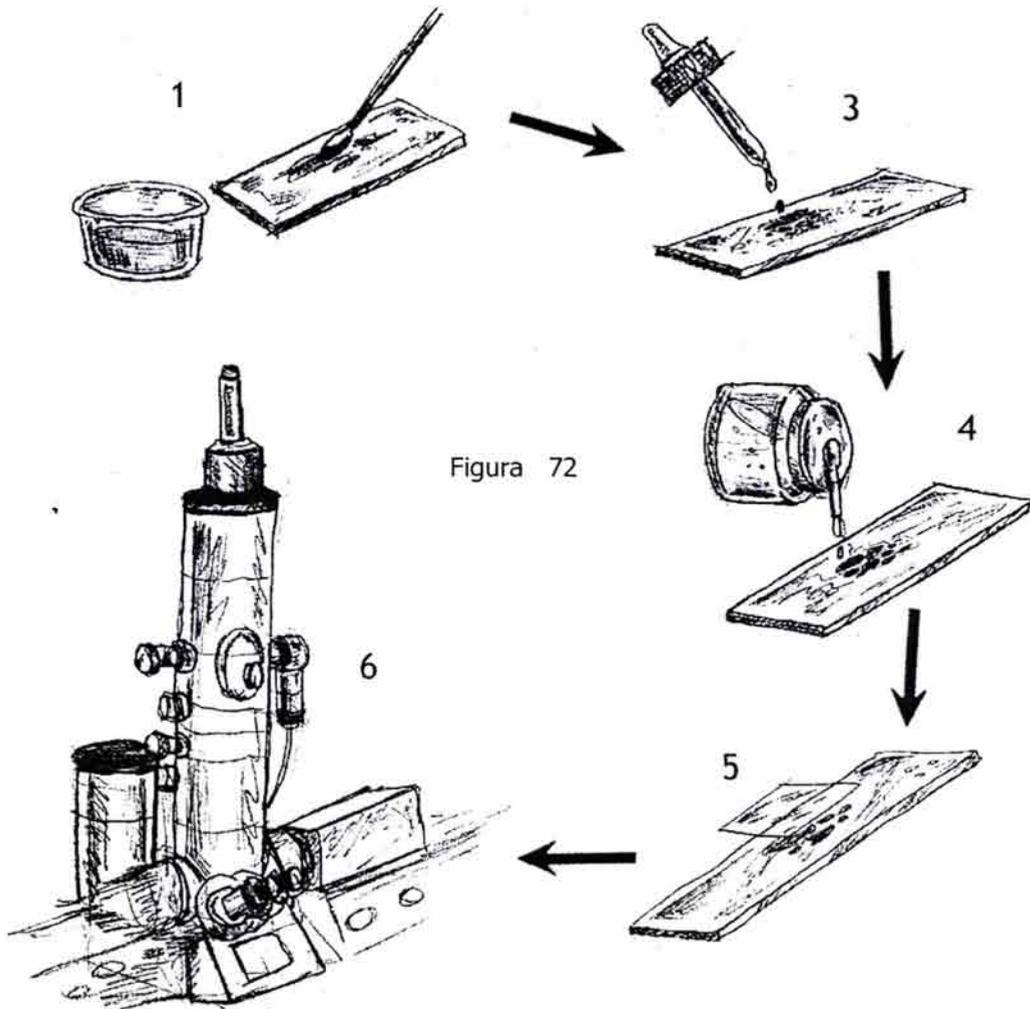
Procedimiento

1. Realice un frotis delgado de una muestra fecal o de otro tipo.
2. Fije la preparación en metanol por 30 segundos.
3. Tiña con el reactivo de Calcofluor blanco al 0.01% durante 1 minuto.
4. Enjuague con agua destilada y permita que la preparación seque.
5. Monte con un cubreobjetos delgado del #1.
6. Examine con un microscopio de fluorescencia equipado con un filtro azul violeta con una longitud de onda de 400 nm o menos.

7. Para buscar a *Microsporidia*, observe cuidadosamente con objetivos de 50x o 100x y aceite de inmersión. Las esporas de *Microsporidia* fluorescen con una coloración blanco-azulado muy brillante y un fondo negro.

Control de Calidad

Es necesario contar con una preparación control de *Microsporidia* preservada en formalina al 10% preparada de un cultivo o de una muestra fecal, cada vez que se inicie una corrida de análisis.



Tinciones para Muestras de Sangre

Tinción de Giemsa

El colorante de Giemsa se vende como solución stock concentrada. También se encuentra disponible en forma de polvo para aquellos que deseen elaborar su propio colorante. El empleo de colorante líquido preparado o colorante preparado a partir del polvo es una cuestión de preferencia personal. Para prepararlo de manera individual siga estos pasos:

(201)

Reactivos:

Solución concentrada de Giemsa.

1. Polvo colorante Giemsa, certificado 0.6 g.
2. Metanol, neutro absoluto y certificado, (libre de acetona) 50 ml.
3. Glicerina, neutra, certificada 50 ml

Procedimiento

1. Mezcle pequeñas porciones de colorante y glicerina en un mortero y reúna la mezcla en un frasco de 500 o 100 ml hasta que se haya terminado de mezclar todo el material medido.
2. Cierre el frasco con un tapón de algodón, tápelo con papel grueso y colóquelo en un baño de agua a 55-60°C durante 2 horas, asegurándose de que el agua alcance el nivel del colorante.
3. Agítelo suavemente a intervalos de ½ hora. Deje enfriar la mezcla, agregue alcohol y consérvela en un frasco marrón.
4. El colorante deberá guardarse durante 3 semanas y se filtrará antes de su empleo.

Para películas de sangre finas o una combinación de películas de sangre fina y gruesas, utilice agua amortiguada con tritón al 0.01% y para películas de sangre gruesas, agua amortiguada con tritón al 0.1%.

El colorante líquido comercial o la solución madre preparada con el polvo deberá diluirse aproximadamente en partes iguales para preparar la solución colorante. El

colorante líquido de Giemsa stock se diluye 1:10 con buffer para películas de sangre finas; sin embargo, para películas gruesas puede utilizarse una dilución de hasta 1:50.

El agua amortiguada usada en la dilución del colorante madre debe ser neutra o ligeramente alcalina. La solución buffer de fosfato puede utilizarse para obtener el pH correcto.

Solución concentrada al 10% de tritón X-100.

1. Tritón X-100 10 ml.
2. Agua destilada 100 ml.

Buffer

Buffer de fosfato disódico

1. $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$ 9.5 g
2. Agua destilada 1000 ml

Buffer de fosfato ácido de sodio

1. $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ 9.2 ml
2. Agua destilada 1000 ml

Soluciones de agua amortiguada con Tritón

Agua amortiguada con tritón al 0.01%

1. Tritón X-100 acuoso stock al 10% 1 ml
2. Agua amortiguada 1000 ml

Agua amortiguada con Tritón al 0.1%

3. Tritón X-100 acuoso stock al 10% 10 ml
4. Agua amortiguada 1000 ml

Preparación del agua amortiguada: Una solución amortiguada con el pH deseado puede prepararse con la mezcla de dos amortiguadores de fosfato. Los amortiguadores se guardan por separado

durante tiempo indefinido en frascos de vidrio refractario con tapón y se filtran antes de hacerse la mezcla de agua amortiguada.

Formula para 1 litro de agua amortiguada			
pH final	Na ₂ HPO ₄ M/15	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O M/15	Agua Destilada
6.8	49.6 ml	50.4 ml	900 ml
7.0	61.1 ml	38.9 ml	900 ml
7.2	72.0 ml	28.0 ml	900 ml
7.4	80.3 ml	19.7 ml	900 ml

Procedimiento para teñir

Películas finas: Los frotis se fijan primero en alcohol metílico absoluto y se dejan secar al aire. Un mililitro de tinción de Giemsa previamente preparada se mezcla con 50 ml de agua amortiguada, pH 7.0 o 7.2 y se permite que el frotis se tiña durante 45 minutos en la tinción diluida de reciente preparación. Se lava el frotis en agua corriente y se seca. Si los frotis se tiñen de rojo intenso, utilice un amortiguador más alcalino, si parecen demasiado oscuros, use uno más ácido.

Nota: Una buena regla general para la dilución del colorante con respecto al tiempo de coloración es la siguiente. Si la dilución es de 1:20, colorea durante 20 minutos; si es de 1:30, colorea durante 30 minutos, etcétera.

Películas gruesas: El procedimiento a seguir para colorear películas gruesas es el mismo, excepto que se no se fijan el alcohol metílico ni se seca al aire. Si el portaobjeto tiene una película gruesa en una extremidad y una película fina en la otra, fije solo la fina y luego colorea simultáneamente ambas partes de las películas. ^(193, 201-202)

Control de calidad

Si los glóbulos rojos aparecen adecuadamente coloreados, la regulación del tiempo y dilución del colorante deberán ser apropiados para demostrar la presencia de parásitos.

Si los portaobjetos no pueden colorearse dentro de las 48 horas; las películas finas deberán fijarse en alcohol metílico y las películas gruesas lacadas en agua destilada antes de su almacenamiento.

Los portaobjetos deberán almacenarse a temperaturas razonablemente bajas (debajo de los 80 F) antes de su coloración. Las películas gruesas que no han sido lacadas se fijarán con calor; la hemoglobina quedará fijada en los glóbulos rojos, y la considerable retención de colorante impedirá entonces la identificación de los parásitos. Las películas finas también se colorean débilmente después de la exposición a elevadas temperaturas.

Nota:

La sangre comienza a perder su afinidad por los colorantes al cabo de unos 3 días y las películas gruesas antiguas no deshemoglobinizan bien.

La tinción se realiza especialmente con el colorante de Giemsa. Para las capas finas se puede utilizar la tinción de Wright, aunque tiñe los parásitos peor que el colorante de Giemsa. No es satisfactoria para las películas gruesas porque fija los eritrocitos.

Una solución de colorante de Giemsa que actúe adecuadamente debe prepararse cada día.

Tinción de Wright ⁽¹⁹³⁾

Reactivos

Se trata de una solución de eosina y una mezcla compleja de tiacinas, que incluyen:

- a) El azul de metileno (normalmente del 50 al 75%)
- b) Azur B (10 a 25%) y otros derivados.
- c) La solución tampon (pH 6.4) contiene fosfato potásico primario (monobásico) (KH_2PO_4), anhidro 6.63 g; Fosfato sódico secundario (dibásico) (Na_2HPO_4), anhidro 2.56 g y agua destilada para hacer 1 litro. Puede prepararse una solución más alcalina (pH 6.7) con 5.13 g de sal potásica y 4.12 g de sal sódica.

Procedimiento

- d) Las extensiones de sangre se deben teñir en pocas horas tras la preparación; si tienen que mantenerse sin teñir, habrán de ser fijadas.
- e) La fijación y la tinción se pueden hacer por inmersión de las preparaciones en recipientes llenos de reactivo o cubriéndolas con los reactivos mantenidas en posición horizontal. En este último método, si se cubre la extensión con abundante colorante, se evitará la evaporación, la cual da lugar a precipitación.
- f) La fijación se realiza durante 1 o 2 minutos con metanol absoluto.
- g) La preparación se expone a continuación a una solución no diluida de tinción durante 2 min. Luego, sin quitar la tinción de la preparación horizontal, se añade con cuidado una cantidad igual de tampón y se mezcla soplando suavemente.
- h) Se limpia con agua el colorante de la preparación horizontal. El lavado durante más de 30 seg reduce la coloración azul. La parte posterior de la preparación se limpia con una gasa.

- i) Se deja secar al aire la preparación en posición inclinada
- j) Se montan los cubreobjetos sobre la extensión de la preparación con bálsamo de Canadá u otro medio de montaje.

Las extensiones bien teñidas con la tinción de Wright tienen color rosa cuando se miran a simple vista. Con bajo aumento las células deben estar regularmente distribuidas.

Control de Calidad

Tinción excesivamente azulada: Las extensiones gruesas, el tiempo prolongado de tinción, el lavado inadecuado o la alcalinidad demasiado alta del colorante o diluyente tienden a provocar una basofilia excesiva.

Tinción excesivamente rosada: La tinción insuficiente, el tiempo de lavado prolongado, el montaje de los cubreobjetos antes de que estén secos o la acidez del colorante o del tampón demasiado elevada pueden provocar acidofilia excesiva.

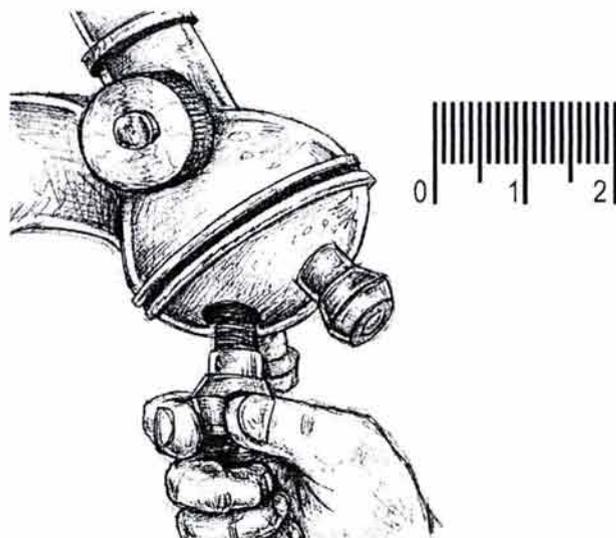
La presencia de un precipitado sobre la extensión puede ser debida a la utilización de portaobjetos sucios, a un secado durante el período de tinción, a un lavado inadecuado del portaobjetos al final de dicho período, en especial si este no se mantiene horizontal durante el lavado inicial, a la filtración inadecuada del colorante o al haber permitido que se depositara polvo sobre el portaobjetos o extensión. ⁽²⁰¹⁻²⁰²⁾

5.7 MICROSCOPIA

Calibración del Microscopio – Micrómetro Ocular:

La determinación de las dimensiones de los parásitos es importante para una identificación correcta tanto de los protozoos como de los helmintos y se debe realizar empleando un micrómetro ocular correctamente calibrado para cada objetivo de cada microscopio con que se vaya a usar. A continuación se describen los pasos a realizar en la calibración de un microscopio: ^(195, 200-202)

- k) Inserte un micrómetro ocular en el elemento ocular de modo que la escala esté enfocada cuando el microscopio lo esté.
- l) En la platina del microscopio se coloca un micrómetro de platina calibrado; el diafragma del iris se cierra parcialmente para reducir la iluminación, y se enfoca la escala calibrada.
- m) La escala del micrómetro ocular y la del micrómetro de la platina se desplazan hasta que los ceros se correspondan. A continuación se examina el micrómetro ocular hasta que se encuentra una división que también se alinea con una división del micrómetro de platina. Cada división grande del micrómetro de la platina equivale a 0.1 mm (100 μ m) y cada división pequeña a equivale a 0.01 mm (10 μ m).



- n) La distancia entre pequeñas unidades del ocular se calcula determinando la distancia en micras entre dos divisiones alineadas en el micrómetro de la platina y dividiéndola por el número de unidades menores del ocular entre las divisiones alineadas. El resultado es la distancia entre las unidades del ocular en micras.
- o) Se debe registrar el valor de la unidad de división del micrómetro ocular (en micras) utilizando cada objetivo del microscopio. Cada microscopio debe calibrarse por separado y ha de recalibrarse cada vez que se cambie un objetivo o un ocular.
- p) Para determinar el tamaño de un objetivo, hay que calcular la cantidad de unidades de ocular que representan la dimensión que se mide y multiplicar esta cifra por el valor calculado en el inciso d) para el aumento utilizado.

Preparaciones en Fresco:

Antes de realizar una preparación en fresco, el microscopio debe estar calibrado. Los objetivos y oculares utilizados para el proceso de calibración deben ser los usados para realizar las mediciones en el microscopio. Los factores de calibración deberán estar siempre anotados y colocados a un costado del microscopio.

Los trofozoitos, quistes y ooquistes de protozoarios, así como los huevos y larvas de helmintos son susceptibles, en la mayoría de los casos, de ser vistos e identificados mediante una técnica de montaje en fresco. Los montajes húmedos directos o de material concentrado se realizan mejor utilizando portaobjetos de 5 por 7.5 cm (mejor que los de 2.5 por 7.5 cm) y un cubreobjetos del No. 1 de 22 mm. Esto previene las fugas durante la observación microscópica y proporciona espacio para sellar el cubreobjetos con algun sellador si se desea.

Para comenzar, obtenga un portaobjeto y un poco de la muestra clínica a analizar. Tome una pequeña cantidad de la muestra y distribuyala sobre el portaobjeto. Preferentemente se recomienda realizar por lo menos dos frotis sobre el mismo portaobjetos y en donde una de ellas puede teñirse con solución yodada. El Yodo debe ser de Dobell y O'Connor o una dilución yodada al 1:5 de Lugol.

El espesor de la preparación en fresco no debe ser muy gruesa, puede guiarse de la foto que a continuación se muestra. Observe que es lo suficientemente ligera lo que permite ver a través de ella. También es importante evitar las burbujas de aire.



Figura 73 (195)

Ejemplo del espesor al realizar una preparación en fresco

Para prevenir la desecación debe colocarse un portaobjetos a través de las porciones separadas de la varilla del aplicador en un placa de Petri que contenga una toalla de papel húmeda. El cierre hermético de los montajes con *vaspar* permite el empleo del objetivo de inmersión en aceite para el examen del preparado y evita su secado. *Vaspar* es una mezcla a partes iguales de vaselina y parafina, que se calienta hasta su licuación en una placa caliente.

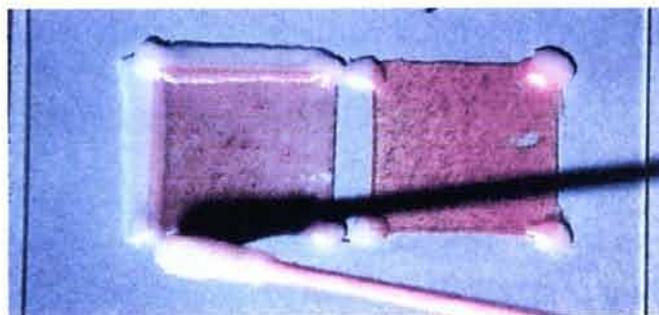


Figura 74 (195)

Sellado adecuado de un cubreobjetos en una preparación

Un pincel de pelo de camello o un aplicador con punta de algodón se sumergen en el *vaspar* fundido y se tocan con él los ángulos opuestos del cubreobjetos para fijarlo al portaobjetos de 5 por 7.5 cm; entonces se aplica *vaspar* con pinceladas iguales en los bordes del cubreobjetos hasta que se tiene éste sellado, como se ilustra en la foto anterior, no olvide que esta mezcla debe calentarse a 70°C aproximadamente y mezclarse para que pueda ser utilizada como sellador.

Alternativamente los bordes pueden sellarse con esmalte de uñas sin color. Sellando de esta manera, se mantiene a los organismos alejados del movimiento que provocaría el aceite de inmersión y de igual manera los protege de una desecación.

Se debe examinar microscópicamente el preparado de tal modo que sea observada sistemáticamente toda la superficie del cubreobjetos. Un buen método consiste en empezar en un ángulo y utilizando la platina, mover arriba y debajo de tal modo que cada campo pueda ser observado metódicamente con el objetivo de 10 aumentos.

También es importante la observación de la preparación con el objetivo de inmersión en aceite o de alto aumento en seco para estar seguros de que no pasan inadvertidos los protozoos pequeños.

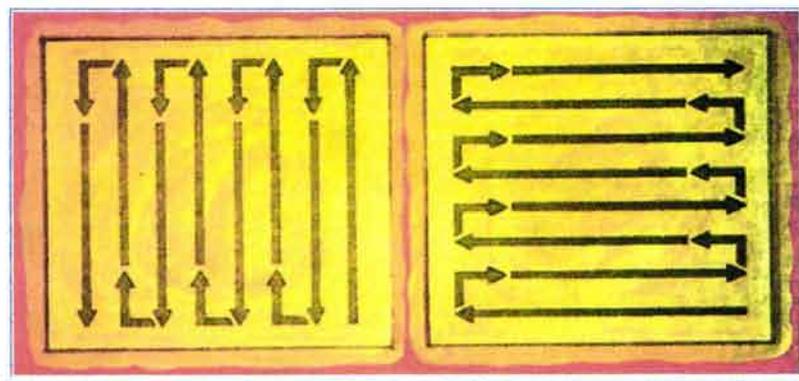


Figura 75 ⁽¹⁹⁵⁾

Observación sistemática de la totalidad de la superficie del cubreobjetos

Preparaciones Teñidas:

Las preparaciones teñidas permanentemente son útiles para la identificación de trofozoitos y quistes de protozoarios y también para la confirmación de especies. De igual modo permiten tener una referencia de consulta en el diagnóstico y pueden conservarse en el archivo biológico de un laboratorio. ⁽²⁰²⁾

El microscopio debe ser calibrado antes de comenzar el análisis. Las preparaciones positivas así como el material de referencia (fotos, imágenes digitales, etc) deben de estar disponibles en la estación de trabajo para comparar los detalles morfológicos de los microorganismos. Normalmente se suelen preparar de 1 a 3 muestras de modo permanente. Si la muestra no se haya preservada, prepare una capa delgada del material trazando el mismo hacia atrás y hacia adelante sobre el portaobjetos con la ayuda de un aplicador. De ser necesario diluya la materia fecal con agua salina. Para muestras preservadas en PVA, aplique dos o tres gotas del espécimen a la laminilla o portaobjetos y con un movimiento circular o movimientos suaves de retoque esparsa la muestra equitativamente hasta cubrir un área de aproximadamente 22 x 22 mm del cubreobjetos. Para muestras preservadas de otra manera consulte las instrucciones del fabricante.

Una vez que el proceso de teñido esta completo, examine de manera sistemática la preparación utilizando un objetivo 100x y aceite de inmersión. Observe por lo menos de 200 a 300 campos. Reporte las formas observadas (trofozoitos o quistes).

Microscopía de Fluorescencia - UV:

La demostración de los ooquistes de *Cyclospora* ^(207, 208) en prepaciones húmedas se intensifica enormemente cuando se utiliza microscopía de fluorescencia UV. ^(161, 162) A pesar de la "edad" de la muestra, los quistes de *Cyclospora* exhiben un intenso color azul cuando se observan mediante esta técnica (con filtros especiales para UV de 330-365 nm). Si estos filtros no estan disponibles, pueden utilizarse para una excitación azul entre 450-490 nm, pero la intensidad disminuye y toma una coloración verde fluorescente. Sin embargo esta técnica no permite contar con una preparación permanente que pueda ser conservada en el archivo biológico del laboratorio.

5.8 EXÁMENES EN SANGRE

El método habitual para diagnosticar los parásitos en sangre es el estudio de las películas de ésta, aunque se han descrito procedimientos especiales mas sensibles para la microfiliaria, la tripanosomiasis africana y el paludismo.

Para el diagnóstico de las infecciones por parásitos de la sangre se preparan dos tipos de película de sangre:

- a) películas finas
- b) películas gruesas.

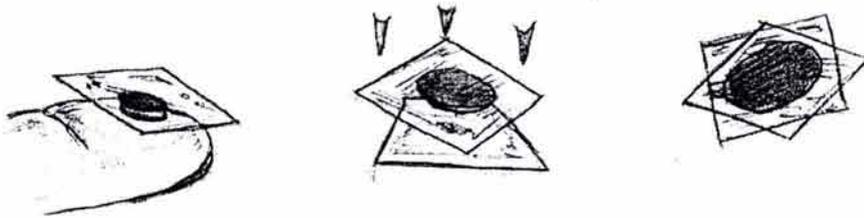
En la película fina la sangre se distribuye por el portaobjetos en una capa delgada y los eritrocitos están intactos después de la tinción. En la película gruesa (gota gruesa), la sangre se concentra en una pequeña zona y tiene el grosor de muchas capas de células. Durante la tinción, los eritrocitos se lisan y solo serán visibles los leucocitos y los parásitos (si estan presentes).

Para el diagnóstico se prefiere a la película gruesa, puesto que contiene de 16 a 30 veces más sangre por campo de microscopio que la película fina, con lo que aumentan las probabilidades de detectar infecciones mínimas (ligeras) y disminuye el tiempo necesario para efectuar un examen fiable. En las películas bien preparadas, en una película gruesa se puede examinar en 5 min aproximadamente la misma cantidad de sangre con lentes de inmersión en acetie que en una película delgada en 30 min. Para los exámenes habituales se deben preparar tanto una película delgada como una gruesa. ^(193, 201-203)

Preparación del portaobjetos

1. La sangre para el examen se puede obtener por punción digital, punción del lóbulo de la oreja o venoclis.

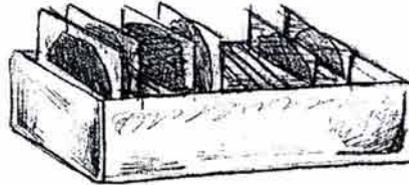
- 1.1 Si se obtiene por venopunción, la primera gota, libre de anticoagulante, se utiliza para preparar las películas.
 - 1.2 Los anticoagulantes pueden causar distorsión de algunos organismos al interferir en la tinción.
2. Si se emplea alcohol al 70% para desinfectar el punto de la punción, debe enjuagarse o permitir que el alcohol se seque para asegurar que no fije las células hemáticas y evitar una deshemoglobinización de las películas finas.
3. Para realizar una **película fina**, ponga en contacto un cubreobjetos con la parte superior de una gota pequeña de sangre sin tocar la piel, y colóquela con la parte manchada hacia abajo, encima de otro cubreobjetos, de manera que las esquinas de los dos aparezcan como una estrella de 8 puntas.



- 3.1 Si la gota no es demasiado grande y los cubreobjetos están limpios, la sangre se extenderá uniforme y rápidamente como una capa fina entre las dos superficies.
4. En el momento en que la sangre cesa de extenderse, separe los cubreobjetos rápida y firmemente tirando de ellos en el plano paralelo a sus superficies. La sangre suele estar mucho mejor extendida en uno de los cubreobjetos que en el otro.



5. Los cubeobjetos se deben colocar con la extensión hacia arriba sobre papel limpio y dejar que sequen al aire, o se pueden colocar unidos por su cara posterior en hendiduras hechas en una caja.



6. La **película gruesa** puede prepararse tocando la superficie inferior de una gota de sangre con la punta del dedo y rotando el porta hasta cubrir una superficie del tamaño de 1.5 cm. Un método alternativo consiste en reunir algunas gotas pequeñas con un borde del porta.
 - 6.1 Una película gruesa debe ser lo bastante delgada para poder leer a su través un impreso. Si es demasiado gruesa, la película se puede desprender del portaobjetos.
 - 6.2 Las películas gruesas deben dejarse secar a temperatura ambiente, generalmente durante la noche. Un exceso de temperatura puede fijar los eritrocitos y evitar la deshemoglobinización.
 - 6.3 Las películas gruesas o finas pueden prepararse en portas diferentes o en el mismo con una película fina en un extremo y una gruesa en el otro. En estos casos, solo la película fina se debe fijar con alcohol metílico (30 seg) y ha de evitarse el contacto de la película gruesa con el vapor del alcohol.

5.9 DETECCIÓN DE ANTÍGENOS

El diagnóstico de muchos parásitos intestinales que afectan al hombre depende en la observación bajo el microscopio de la posibilidad de encontrar diferentes estadios de los mismos en la materia fecal, fluido duodenal, o muestras de biopsias tomadas directamente del intestino. Como el examen de estas muestras puede requerir bastante tiempo de un microscopista experimentado y diverso material, se han desarrollado otros métodos diagnósticos como alternativa, por ejemplo los que detectan antígenos que utilizan anticuerpos fluorescentes directos, el inmunoensayo EIA, y otros métodos realizados con kits comerciales.⁽¹⁶³⁾ Estas metodologías pueden realizarse de un modo rápido y sin la imperiosa necesidad de contar con un laboratorista y microscopista experimentado.

Cryptosporidiosis

Algunos autores sostienen que el método de elección para el diagnóstico de la criptosporidiosis es la inmunodetección de antígenos sobre la superficie del organismo en las muestras de heces, utilizando ensayos de anticuerpos monoclonales, estos proveen una sensibilidad superior a las técnicas que emplean la tinción ácido alcohol resistente modificada.^(37, 47)

Existen aproximadamente 15 kits comerciales en el mercado estadounidense para el diagnóstico de la criptosporidiosis, algunos de ellos detectan de forma simultánea a *Giardia* y *E histolytica*. Para elegirse deben ponderarse la comodidad, facilidad, habilidades y tiempo, así como el costo de cada uno de ellos, y que vaya acorde con los recursos con los que cuente el laboratorio. Uno de los más sensibles (99%) y específicos (100%) es el DFA, el cual identifica quistes en muestras tanto concentradas como no concentradas, y utiliza anticuerpos monoclonales marcados con isocianato.

Existen seis pruebas comerciales de EIA en el formato de microplato para detectar antígenos de *Cryptosporidium* tanto en muestras en fresco o preservadas en el refrigerador, así como muestras preservadas en formalina o SAF. Las muestras concentradas y tratadas con PVA no son adecuadas para probar con kits de EIA. La sensibilidad y especificidad de estos kits está reportada en un rango que oscila entre un 93 y 100% cuando se usa de manera correcta y en el laboratorio. Los laboratorios que

emplean esta prueba diagnóstica deben considerar la posibilidad de obtener resultados falsos positivos y tomar las medidas que monitoreen de modo constante el desempeño de estos. Por otro lado existen tres ensayos inmunocromatográficos para la detección individual o combinada de antígenos de *Cryptosporidium*, *Giardia* y *E histolytica*, Estos ofrecen la ventaja de realizar un test múltiple en poco tiempo y con una sola reacción. Las evaluaciones efectuadas para evaluar la sensibilidad y especificidad muestran resultados muy similares a los ensayos anteriormente mencionados.

No obstante se recomienda confirmar todos los resultados positivos obtenidos por inmunoensayos enzimáticos. El equipo de detección rápida comercial Meridian Merifluor DFA para *Cryptosporidium* o el examen mediante preparaciones teñidas por la tinción ácido-alcohol resistente modificada para *Cryptosporidium* spp o la tinción tricrómica de Wheatley's para *Giardia* spp son métodos confirmatorios para la identificación de estos organismos.

Cuadro 15

Relación de pruebas diagnósticas inmunológicas con equipos de detección rápida ⁽²⁰⁹⁾

Organismo	Nombre del Kit	Fabricante-Distribuidor ^a	Tipo de Test ^b
<i>Cryptosporidium parvum</i>	ProSpecT	Alexon-Trend	EIA
	ProSpecT Rapid	Alexon-Trend	EIA
	Crypto-CEL	Cellabs	IFA
	Cryptosporidium	Novocastra	DFA
	Cryptosporidium	TechLab	EIA
	RIM Cryptosporidium	Remel	EIA
	RIM Cryptosporidium	Remel	Rapid
	Cryptosporidium	Wampole	EIA
<i>Cryptosporidium parvum/Giardia lamblia</i>	ProSpecT	Alexon-Trend	EIA
	ColorPAC*	Becton Dickinson	Rapid
	Crypto/Giardia-Cel	Cellabs	IFA
	Merifluor	Meridian	DFA
	RIM Crypto/Giardia	Remel	EIA
	ImmunoCard STAT!*	Meridian	Rapid

5.10 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

El examen Microscópico pese a lo laboreoso de la técnica, sigue siendo la técnica más utilizada y considerada como standard, sin embargo no es infalible y en ocasiones puede no darnos los resultados que esperamos y cuando se sospecha la presencia de alguno de los parásitos emergentes ya mencionados pero no logramos ponerlos de manifiesto mediante técnicas convencionales debe recurrirse a técnicas mas sofisticadas pero muy precisas tal es el caso de las técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).⁽²⁰⁴⁾

Recolección de la Muestra

1. La muestra fecal deberá recolectarse en ausencia de cualquier agente conservador.
2. De modo alternativo la muestra puede ser mezclada y homogenizada con dicromato de potasio (dilución 1:1 al 5% masa/volumen) o en etanol absoluto (dilución 1:1) y almacenada bajo refrigeración.
3. Preparaciones teñidas con tinción Tricrómica (para *G. lamblia* o *E. histolytica/dispar*) o preparaciones ácido-alcohol resistentes (para *C. parvum* o *C. cayetanensis*) deberán acompañar a la muestra cuando un análisis por PCR sea requerido para cualquier de estos protozoarios.
4. Todas las preparaciones teñidas deberan observarse bajo e microscopio y si ahí mismo puede realizarse la identificación del parásito, un procedimiento por PCR debe omitirse. Los resultados de un análisis por PCR tardan 1 semana aproximadamente para ser completados.

Detección de ooquistes de *C parvum* mediante PCR

Recientemente, nuevos métodos genéticos en la detección de *C parvum* han sido desarrollados, utilizando la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) u otros métodos basados en la detección del DNA. ^(1210, 211)

Los ooquistes son detectados por PCR en la superficie de aguas de desecho y en aguas de consumo, entre otras, pero la sensibilidad del ensayo por PCR se inhibe por "componentes no caracterizados en las muestras". Diferentes estudios se apoyan en el uso de otras técnicas como citometría de flujo, dot blot y captura magnética de anticuerpos que incrementen la sensibilidad en el ensayo por PCR.

En Diciembre de 1995, se desarrollo una prueba que, no solo reportaba la especificidad y sensibilidad en la detección de ooquistes de *C parvum* por PCR (amplificaba un fragmento de DNA que codificaba de manera repetitiva una proteína del ooquiste, la region 873-bp a 2359-bp), sino que reportaba también la viabilidad de los mismos. ⁽³¹⁾

El uso directo de PCR no distingue entre ooquistes vivos o muertos, ya que el DNA parece preservarse por lo menos una semana después de la muerte celular. Sin embargo, PCR ha sido usada para detectar DNA blanco de esporozoitos excistados después de incubación en un medio adecuado. Así las cosas, la viabilidad de los ooquistes fue determinada amplificando y detectando fragmentos de DNA de esporozoitos viables. Estos protocolos son adecuados en la detección de bajos números de ooquistes viables, como los que se realizan para monitorear muestras de agua potable y otras muestras ambientales. ⁽³¹⁾ Actualmente se han desarrollado diversos ensayos para el diagnóstico de esta y muchas otras parasitosis por PCR y aunque no se han logrado estandarizar ofrecen excelentes resultados, acérquese a la bibliografía expuesta al final de este capítulo si desea información especializada.

Diagnóstico Molecular de la Babeiosis

En algunas infecciones con parásitos intra-eritrocíticos, las características morfológicas observadas bajo examinación microscópica de los frotis sanguíneos no permiten una clara diferenciación entre *Babesia* y *Plasmodium*.

Por otra parte, donadores de sangre pueden presentar síntomas subclínicos y una parasitemia sumamente baja, lo que la hace indetectable por el método convencional. En casos como estos, el diagnóstico puede realizarse mediante técnicas moleculares, como PCR que utilicen un primer adecuado y pasos sencillos.

Adicionalmente, propuestas moleculares son de gran valor en el ámbito de investigación de nuevas especies de *Babesia* "observadas" recientemente en infecciones en humanos tanto en América como en Europa. A continuación se muestra una fotografía de un análisis con esta técnica para la identificación de *Babesia microti*.^(21, 212)

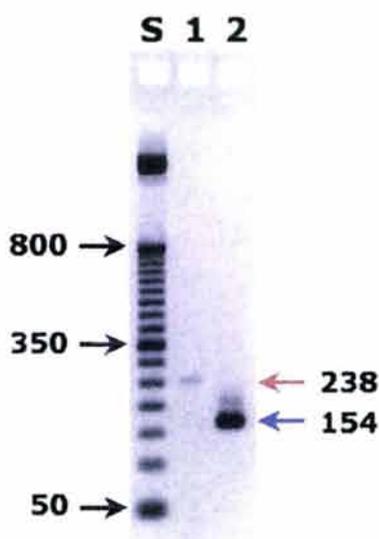


Figura 76⁽²²⁾

Análisis por PCR para la identificación de *B. microti*

A: Gel de agarosa (2%); Análisis diagnóstico por PCR para la detección de DNA de *Babesia microti*. Se realizó un PCR con primers BAB1 y BAB4¹ (primera vuelta) y BAB2 yBAB3 (segunda vuelta)¹.

- Carril S: Par de bases moleculares standard (50-bp ladder). Las flechas negras muestran el tamaño estándar de las bandas.
- Carril 1: Primer paso de la amplificación con el primer BAB1 y BAB4¹ del nested PCR protocolo para la detección del DNA de *B. microti* extraído de sangre. Las flechas rojas muestran la banda diagnóstica para *B. microti* (tamaño: 238 bp)

▪ Carril 2: PCR Nested con los primers BAB2 y BAB3¹ utilizados como producto templado del primer paso de la amplificación. La flecha azul muestra la banda diagnóstica por PCR para *B. microti* (size: 154 bp). Note por favor la gran sensibilidad de este método para la detección de DNA de *Babesia microti*.

Técnicas Moleculares para la detección de Microsporidios

La caracterización del genoma microsporidial se ha centrado en una pequeña subunidad ribosomal RNA gene (SSU-Rrna). Las secuencias de este gen han sido publicadas para *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* y *E. bienewsi*.^(106, 105, 126, 150)

Técnicas moleculares han confirmado la existencia de diferentes cepas de *E. cuniculi* que han sido aisladas de ratones, conejos y perros.⁽¹²³⁾

Diagnóstico Molecular

Pares de primer que amplifican la secuencia de el gene entero de microsporidia SSU-rRNA producen amplificaciones de aproximadamente 1,550 pares de bases de largo, de *Encephalitozoon species* y *E. bienewsi*.⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁶⁾

Aunque estos pares de primer han probado la utilidad en la secuenciación y estudios taxonómicos; en un ensayo diagnóstico los objetivos blanco son demasiado largos para ser eficientemente amplificados a partir de una muestra clínica.

Los blancos para el diagnóstico por PCR que pueden ser amplificados eficientemente, usualmente oscilan en un rango de 100 a 400 pares de bases en tejidos fijados con formalina o superiores de 700 a 1000 pares de bases en preparaciones frescas.⁽⁴⁰⁾

Numerosos pares de bases designados para amplificar pequeñas regiones (250 a 607 pares de bases) del gen SSU-rRNA, así como su aplicación para un diagnóstico por PCR de la infección por microsporidios han sido publicados. (Cuadro 15).^(108, 142, 213-220)

Cuadro 16. PCR pares de primers para el diagnóstico de la infección por microsporidios (108, 142, 213-220)

Primers	Designación del Primer	Organismo amplificado	Tamaño de la ampificación en la base del primer	Fuente de la muestra
5'- CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC- 3'	V1	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	348	Aspirado duodenal y biopsias del mismo tejido
5'- ACTCAGGTGTTATACTCACGTC- 3'	EB450	<i>Encephalitozoon hellem</i>		Organismos cultivados
5'- GAAACTTGTCCTCCTTACG-3'	EBIEF1	<i>E.bieneusi</i>	607	Bilis
5'- CCATGCACCACTCCTGCCATT-3'	EBIER1			Aspirados Duodenales
5'- TGAGAAGTAAGATGTTTAGCA- 3'		<i>E.hellem</i>	547	Organismos cultivados
5'- GTAAAAACACTCTCACACTCA- 3'				
5'- ATGAGAAGTGATGTGTGTGCG- 3'		<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	549	Organismos cultivados
5'-TGCCATGCACTCACAGGCATC-3'				
5'- CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC- 3'	V1	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	370	Tejido de Biopsias
5'-CTCGCTCCTTTACACTCGAA- 3'	SI500			
5'- CACCAGGTTGATTCTGCCTGAC- 3'	PMP1*	<i>E.bieneusi</i>	250	Evacuaciones fecales
5'-CCTCTCCGGAACCAAACCTG- 3'	PMP2	<i>E.cuniculli</i>	268	Organismos cutivados
		<i>E.intestinalis</i>	270	Evacuaciones fecales
		<i>E.hellem</i>	279	Organismos cultivados

*La secuencia de nucleotidos del primer PMP 1 es idéntica a la del Primer V1.

Primers específicos para *E. hellem* y *E. cuniculi* han sido usados en la identificación de cultivos de microsporidia que a su vez proviene de muestras de pacientes^(173, 174) pero sólo el DNA y el gen SSU-rRNA de *E. bienewsi* y *E. intestinalis* han sido amplificados directamente de especímenes de pacientes.⁽²¹³⁻²¹⁵⁾

Para evitar el adquirir especímenes para el diagnóstico por métodos invasivos, la tecnología molecular del PCR ha sido empleada en muestras fecales.⁽²²¹⁾ Primer pair PMP1 y PMP2 (Cuadro 16) le permite a *E. bienewsi* y a *Encephalitozoon* species ser amplificadas, El DNA es fácilmente extraído de cultivos de organismos y de tejidos de biopsias, pero extraer el DNA de las esporas requiere de ásperas condiciones en una manipulación tanto mecánica como química.

Uno de los problemas enfrentados para el desarrollo del método por PCR sobre muestras fecales, es la presencia de inhibidores para PCR. El tratamiento de las muestras con hipoclorito de sodio o Formalina al 10% antes de la extracción de DNA inactiva a los microorganismos en las evacuaciones y produce un benéfico efecto inactivante sobre los inhibidores de la actividad de la Taq polimerasa. Los productos de la amplificación por PCR de muestras fecales que utilizan primers PMP1 y PMP2 han sido digeridos con endonucleasas de *HaeIII* y *PstI* para distinguir entre una infección entre *E. bienewsi* y *E. intestinalis*⁽¹⁷⁷⁾. Estas enzimas de restricción no permiten distinguir entre *E. intestinalis* y *E. cuniculi*, lo que limita en cierto modo el uso de esta técnica como herramienta diagnóstica para este tipo de afección intestinal.

Un acceso eficiente en la detección molecular de microsporidia en muestras de pacientes afectados debiera involucrar el uso de primers universales o "pan-microsporidian" en la amplificación. Primers PMP1 y PMP2 parecen ser panmicrosporidian⁽¹⁷⁷⁾, pero estos pares de bases necesitan ser evaluados en cuanto a la habilidad que presentan para amplificar DNA microsporidial en un amplio rango de muestras clínicas.

La aplicación de técnicas diagnósticas moleculares para la microsporidiosis se encuentra aún en pañales. No se cuenta aún con reportes publicados de estudios comparativos entre PCR y otros métodos que determinen la sensibilidad y especificidad de los mismos. Una cuidadosa selección en conjunto con severas y estrictas condiciones serán requeridas para detectar y especificar la especie del microsporidio en cuestión en las muestras de los pacientes.

El potencial de PCR en la identificación de especies de muestras adquiridas mediante métodos no invasivos hacen a esta técnica una atractiva y prometedora opción de diagnóstico. Aunque PCR puede emplearse en la detección y el establecimiento de la especie de microsporidia, la búsqueda de este grupo de parásitos mediante el uso de tintes quimiofluorescentes y el método de tricromo modificado seguido de una confirmación con PCR se ha convertido en el paradigma actual para el diagnóstico de la microsporidiosis.

PCR se encuentra disponible únicamente en los laboratorios dedicados a la investigación; se han logrado resultados satisfactorios para el diagnóstico de *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem*, y *Encephalitozoon cuniculi*. El principal obstáculo es que no trabaja de forma adecuada con muestras fijadas en formalina y almacenadas por un largo, largo tiempo.

El género *Encephalitozoon* contiene tres especies que están asociadas a infecciones causadas a humanos: *E. hellem*, *E. cuniculi*, y *E. intestinalis* (syn. *Septata intestinalis*). La diferenciación entre *E. hellem* y *E. cuniculi* no se logra con un análisis de su morfología. Adicionalmente dos especies de microsporidia suelen encontrarse en el hombre (*Enterocytozoon bieneusi* y *Vittaforma corneae* [syn. *Nosema corneum*]) y que normalmente solo las distingue un experimentado microscopista.

A continuación se muestra una fotografía de un análisis con esta técnica para la identificación de algunos microsporidios ⁽²²¹⁻²²³⁾

A: Gel de agarosa al (2%) que muestra las bandas diagnósticas para especies específicas de microsporidia que afectan al genero humano.

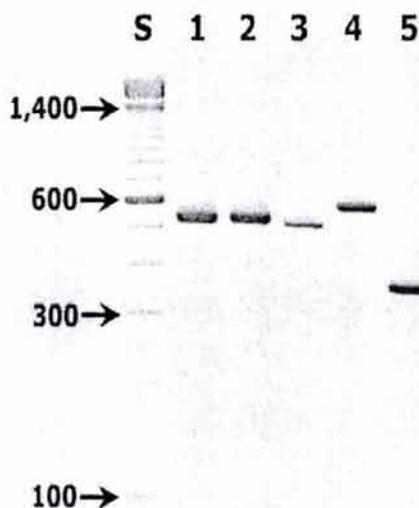


Figura 77 ⁽²²⁴⁾

Análisis por PCR para la identificación de *Microsporidia*

- **Lane S:** Par de bases moleculares standard (100-bp ladder). Las flechas negras indican el tamaño de las bandas standar.
- **Carril 1:** *Encephalitozoon cuniculi* specimen positivo amplificado con PCR primers ECUNF/ECUNR²; tamaño de la banda diagnóstica: 549 bp.
- **Carril 2:** *Encephalitozoon hellem* templado amplificado con PCR primers EHELf/EHELr¹, tamaño de la banda diagnóstica: 547 bp.
- **Carril 3:** *Encephalitozoon intestinalis* templado amplificado con PCR primers SINTF1/SINTR^{3,4}, tamaño de la banda diagnóstica: 528 bp.
- **Carril 4:** *Enterocytozoon bieneusi* templado amplificado con PCR primers EBIEF1/EBIER⁵, tamaño de la banda diagnóstica: 607 bp.
- **Carril 5:** *Vittaforma corneae* templado amplificado con PCR primers NCORF1/NCORR¹⁶, tamaño de la banda diagnóstica: 375 bp.

6. DISCUSIÓN

El presente trabajo ha quedado manifiesta la importancia que cada una de estas parasitosis presenta por si mismas. Las parasitosis intestinales que son objeto de consulta, las cuales incluyen alguno de los padecimientos aquí mencionados; representan un gasto económico considerable para el Estado y para las familias de los afectados.

En otras palabras, enfermarse por cualquier causa, pero en especial presentar un padecimiento infeccioso de tipo parasitario, trae como consecuencia un desembolso económico considerable, y así lo ha reportado la propia Secretaria de Salud en su informe del año 2001, donde se consideran entre las primeras 20 causas de egresos hospitalarios de ese mismo año.

Resulta evidente que en nuestro país, hace falta una conciencia del cuidado de todo individuo en cuestiones de salud. Es importante indicar la falta de responsabilidad principalmente por ignorancia, la cual origina un incremento de nuevos casos.

Como ejemplo la creciente cifra de personas afectadas por el VIH/SIDA, el cual también es considerado como una de las principales causas de mortalidad general Nacional (ver apéndice D), y que como se revisó, es uno de los factores que comúnmente predisponen a adquirir enfermedades oportunistas y en este caso en particular a adquirir infecciones parasitarias como Microsporidiosis, Criptosporidiosis, y otras parasitosis aquí estudiadas.

De todo esto la importancia que tiene el informar adecuadamente tanto a la población en general, como a los trabajadores del área de la salud, médicos, enfermeras, laboratoristas, químicos y otros especialistas que se encuentren involucrados en la atención de un paciente.

De acuerdo a la importancia que revisten estas parasitosis podemos enumerarlas en base a la frecuencia de casos reportados, comenzando por la que se encuentra afectando a mayor número de personas, y concluyendo con la que sólo se han encontrado casos aislados:

1. Criptosporidiosis
2. Microsporidiosis
3. Ciclosporiasis
4. Isosporiasis
5. Babesiosis
6. Blastocistosis
7. Naegleriasis
8. Acantamibiasis

Estos padecimientos están presentes en nuestro país y es necesario seguir realizando estudios que clarifiquen distintos aspectos que ya discutimos como comportamiento, transmisión, tratamiento y por supuesto su diagnóstico.

En este trabajo se reúne una gran cantidad de información, tanto clínica como diagnóstica de los padecimientos que aquí se exponen. En la literatura encontramos distintos métodos diagnósticos, desde los más sofisticados y de vanguardia, hasta los que se han venido utilizando desde hace medio siglo, incluso se pueden encontrar numerosas variantes de una misma técnica.

La mayor parte de la información recopilada y analizada proviene de publicaciones extranjeras que gozan del reconocimiento científico internacional, siendo un tanto escasa la información recopilada de publicaciones de circulación nacional. Nuevamente en este tipo de situaciones se ve reflejado que en nuestro país hacen falta información clara y al alcance de las instituciones públicas y privadas destinadas a los servicios de salud, así como mas esfuerzos para destinar distintos apoyos que permitan seguir estudiando estos padecimientos

Se muestran todas las técnicas encontradas hasta el momento, aunque muchas de ellas sobrepasan los recursos con los que generalmente cuentan los laboratorios de análisis en nuestro país.

Es por ello que este trabajo se adecua a la realidad que viven los laboratorios clínicos en el territorio nacional; pues incluye además de los métodos que requerirían de un considerable costo, metodologías que estén al alcance de laboratorios más pequeños y que no son considerados como de nivel superior, pero que son de gran utilidad para poner de manifiesto la presencia del organismo patógeno causal de la enfermedad, sin poner en duda la veracidad de los resultados.

Es este un compendio a manera de manual técnico que facilita la comprensión y el estudio de cada una de las parasitosis mencionadas, y aunque aún hay mucho por seguir estudiando acerca de la mayoría de estos organismos se acerca por mucho al material que se estaba esperando que reuniera en él tanto la clínica como métodos diagnósticos de estos parásitos emergentes.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Las enfermedades infecciosas de tipo parasitario han ido en aumento en las últimas dos décadas, por ello se les han denominado como fenómenos **emergentes** y **reemergentes**, y han despertado el interés de diversos grupos de atención a la salud como consecuencia a la alta incidencia de diversos casos reportados a lo largo del mundo.

2. Controlar los brotes epidémicos es una tarea urgente, y tiene como prioridad saberlos identificar oportunamente. En el caso de un padecimiento intestinal, las principales fuentes de error que presenta un diagnóstico mal hecho, que arroja falsos positivos o negativos, son:

- Manejo inadecuado de una muestra para su análisis
- La falta de conocimiento por parte del personal del laboratorio frente a un organismo poco conocido y observado.
- No contar con técnicas adecuadas para la identificación de estos parásitos.

3. La **capacitación** constante y de **actualización** por parte del personal encargado de realizar las pruebas clínicas en un laboratorio es **indispensable**, y de igual manera lo es, la responsabilidad por parte del Laboratorio de proporcionar los materiales de trabajo y la información adecuada y accesible para que se logren los objetivos de trabajo, y se le proporcione al paciente datos fidedignos acerca de su estado general de salud o la presencia de algún patógeno en el mismo.

4. Lo más apropiado para reducir la incidencia de enfermedades son los cursos de educación sanitaria continua. Este tipo de educación es, esencial para el personal involucrado en cualquier institución que esté relacionada con la atención médica o cualquier otro servicio de salud.
5. El ofrecer **diagnósticos** precisos y confiables, del estado general de un paciente, es una obligación por parte de la institución ya sea pública o privada que se encargue de realizar las pruebas clínicas que por prescripción médica le soliciten.
6. El diagnóstico de afecciones parasitarias denominadas emergentes y reemeergentes causadas por protozoarios como:
 - *Babesia*
 - *Blastocystis*
 - *Cryptosporidium*
 - *Cyclospora*
 - *Isospora*
 - *Microsporidium*
 - *Naegleria* y *Acanthamoeba*,

puede lograrse de manera exitosa por distintos métodos, y la elección de los mismos puede depender principalmente de dos motivos:

- a) De los recursos con que cuente la institución encargada de realizar los estudios.
- b) Del grado de especificidad requerido en el análisis

Para ello el analista encargado debe contar con toda la información técnica y clínica a su alcance, para lograr un mejor discernimiento y elección diagnóstica en cada caso.

7. La información contenida en el presente trabajo, satisface las dos grandes áreas de conocimiento indispensables para realizar un adecuado diagnóstico. Por un lado ofrece una exhaustiva descripción de la clínica de cada una de las parasitosis emergentes causadas por protozoos aquí mencionadas, y por el otro ofrece una serie de metodologías distintas que permiten analizar adecuadamente las muestras que les lleguen a sus manos de los pacientes que están en espera de un pronto y fidedigno diagnóstico.

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Burnet M, White DO. Natural history of infectious disease. London: Cambridge University Press; 1972.
- 2 Berlinguer G. The interchange of disease and health between the old and new worlds. *Int J Health Serv* 1993; 23: 703-15
- 3 MacKenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med* 1994;331:161-7
- 4 Organización Panamericana de la Salud. Enfermedades Infecciosas nuevas, emergentes y reemergentes. *Bol Epidemiol* 1995; 16(3):1-7
- 5 [URL:http://www.smu.org.uy/publicaciones/rmu/1998v1/h-weiss.htm](http://www.smu.org.uy/publicaciones/rmu/1998v1/h-weiss.htm).
- 6 Louria DB. Emerging and re-emerging infections: the societal variables. *Int J Infect Dis* 1996; 1:59-62
- 7 Satcher D. Emerging Infections: Getting ahead of the curve. *Emerg Infect Dis* 1995; 1: 1-6
- 8 Colwell R., Epstein P., Gubler D., Hall M., Reiter P., Schukla J. Springg E., Global Climate Change and Infectious Diseases [monograph on the web]. <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol14no3/colwen.num>
- 9 Morse S, Factors in the emergence of infectious diseases. *EID* 1995;1:7-15
- 10 McCord C, Freeman H., Excess mortality in Harlem. *N Engl J Med* 1990; 322:173-7
- 11 Ledergberg J, Shope RE, Oaks SC. Emerging Infections: microbial threats to health in the United States. Washington, D.C.: National academy Press, 1992
- 12 Farmer P. AIDS and Accusation: Haiti and the Geography of Blame. University of California Press, Berkeley, 1992
- 13 Mann J, Tarantola D, Netter T. AIDS in the World. Cambridge, Ma: Harvard University Press, 1992
- 14 Kaplan J., Jones J., Dikewicz C. Protists as Opportunistic Pathogens: Public Health Impact in the 1990s and Beyond, *J Eukariot Microbiol* 2000; 47(1):15-20
- 15 Cruz Reyes Alejandro, Camargo Camargo Blanca, "Glosario de Términos en Parasitología y Ciencias Afines", Plaza y Valdez, 2001
- 16 Mahmoud Adela A.F., Parasitic Protozoa and Helminths,; Root Richard K, Clinical Infectious Diseases; a Practical Approach, Oxford University Press,1999. p. 37-41.
- 17 Tay-Lara, "Parasitología Médica", 7º Edición, Méndez Editores 2002
- 18 Gutiérrez Yezid. Capítulo 8, Intestinal Apicomplexa. Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations, Second Edition. Oxford University Press, 2000. p-168-184
- 19 Herwaldt BL, Persing DH, Prévigout EA, et al., A fatal case of babesiosis in Missouri: Identification of another piroplasm that infect humans. *Ann Intern Med* 1996, 124:643-65
- 20 Pershing DH, Herwaldt BL, Glaser C, et al. Infection with a *Babesia*-like organism in northern California. *N Engl J Med* 1995, 332: 298-303
- 21 www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/babesia/default.htm - 10k
- 22 www.vetmed.ucdavis.edu/VBDP/BABESIA.HTM
- 23 Krause PJ, Babesiosis, *Med Clin North Am* 2002; 86(2):361-373
- 24 Gutiérrez Yezid. Capítulo 10, Apicomplexa of the Blood., Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations, Second Edition. Oxford University Press, 2000. p-252-258
- 25 www.missouri.edu/~vmicrorc/Protozoa/Hemosporidians/Babesia.htm
- 26 Schetino Salazar Paz, Técnicas de Diagnóstico Morfológico de las Parasitosis, Editor Fco Méndez,1980

- 27 Keusch, G.T., Hamer, D., Joe, A., Kelley, M., Griffiths, J., and Ward, H. "Cryptosporidia--who is at risk?" *Schweiz Med Wochenschr*, 1995; 125 (18): 899-908
- 28 Flanigan, T.P. and Soave, R., "Cryptosporidiosis." *Prog Clin Parasitol*, 1993; 1-20
- 29 Division of Biology, Kansas State University, Basic Biology of Cryptosporidium. <http://www.ksu.edu/parasitology/measurements>
- 30 Hannahs Greg, Kenyon College, "*Cryptosporidium parvum*, an emerging pathogen". <http://www.2.kenyon.edu/depts/biology/slonc/bio38/hannanhs/crypto.htm>
- 31 Juranek, D.D., "Cryptosporidiosis: sources of infection and guidelines for prevention." *Clin Infect Dis*, 1995; 21 Suppl 1:S 57-61
- 32 Heyworth, M.F. "Immunology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections." *J Infect Dis*, 1992; 166 (3): 465-72
- 33 Pitlik et al, Human Cryptosporidiosis: spectrum of disease. Report of six cases and review of the literature. *Arch. Intern. Med.*, 1983; 143:2269-2275
- 34 Bristol BioMed, Image Archive, Fotos Criptosporidium. <http://www.brisbio.ac.uk>
- 35 Kramer. Surveillance for waterborne-disease out-breaks- United States, 1993-1994. *MMWR* 1996; Summ. 45:1-33
- 36 Newman. Household Epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection in an urban community in northeast Brazil. *Ann Intern. Med* 1994, 120:500-505
- 37 Laughon et al, Prevalence of enteric pathogens in homosexual men with and without acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology*. 1988, 94:984-993
- 38 Rodriguez Hernández et al, Seasonal prevalences of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in children attending day care centers in Salamanca (Spain) studied for a period of 15 months. *Eur. J. Epidemiol* 1996, 12:291-295
- 39 Widmer et al., Water-borne *Cryptosporidium*: a perspective from de USA. *Parasitol. Today* 1996; 12:286-290
- 40 Casemore, D.P., Garder, C.A., and O'Mahony, C., "Cryptosporidial infection, with special reference to nosocomial transmission of *Cryptosporidium parvum*: a review.", *Folia Parasitol* 1994; 41(1): 17-21
- 41 Goodgame RW:, Understanding intestinal spore-forming protozoa: cryptosporidia, microsporidia, isospora, and cyclospora. *Ann Intern Med* 1996; 124(4): 429-41
- 42 Laboratory of Medical parasitology. <http://www.paru.cas.cz/Structure/Protozoology/medical.htm>
- 43 Molbak et al, Risk factors for *Cryptosporidium* diarrhea in early childhood: a case-control study from Ginea-bissau, West Africa. *Am J. Epidemiol*. 1994; 139:734-740
- 44 Herbert et al, The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers, *The New England Journal of Medicine*, 1995;332 (13): 855-859
- 45 Dupont H, Chappell Cl, Sterling Cr Okhuysen Pc JakubowskiW, The infectivity of *cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N Engl J Med* 1995; 332:855-9
- 46 Ortega YR, Roxas CR, Gilman RH, Miller NJ, Cabrera L, Taquiri C, et al. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected from markets of an endemic region in Peru. *Am J Trop Med Hyg*, 1997 ;57:683-6
- 47 Clark, Sears, The pathogenesis of Cryptosporidiosis, *Parasitol. Today* 1996, 12:221-225
- 48 Gatti, Cryptosporidiosis in tourists returning from Egypt and the Island of Mauritius. *Clin. Infect Dis*. 1993; 16:344-345
- 49 Gentile et al., Cryptosporidiosis in patients with hematologic malignancies. *Rev. Infect. Dis*.1991;13:842-846
- 50 Benhamou et al AIDS-related cholangiopathy. Critical analysis of a prospective series of 26 patients. *Diag Dis Sci* 1993; 38:1113-1118
- 51 Ignatius Ralf., Lehmann Michael, Miksits Laus, Regnath Thomas, Arvarnd Mardjan, Engelmann Elisabeth, Futh Ursula, Hahn Helmut and Wagner Jutta, A New Acid-Fast Trichrome Satín for Simultaneous Detection of *Cryptosporidium parvum* and Microsporidial

- Species in Stool Specimens, *J Clin Microbiol* 1997;35(2): 446-449
- 52 Kehl C. Karen Sue et al, Comparison of Four Different Methods for Detection of *Cryptosporidium* Species, *J Clin Microbiol* 1995;33(2):416-418
 - 53 Ponce de Leon Patricia, Flaherty Patricia y Zdero María, "Una Nueva Coloración Safranina Tricrómica para la detección de *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, Especies de Microsporidia e *Isospora belli* en Materia Fecal", *Rev Lat Microbiol* 1999;41:211-214
 - 54 Kehl K.S., Cicirello H., Havens P.L., Comparison of Four different Methods for Detection of *Cryptosporidium* Species., *Journal of clinical Microbiology*, 1995; 33 (2):416-418
 - 55 Bernal Redondo Rosa María, Hernández Sánchez G., Ramírez Hdez E., Gamez Aranda A., Martínez Méndez L., Protozoos emergentes, comparación de tres métodos de identificación, *Rev Mex Patol Clín* 1998;45 (4):193-199
 - 56 Mota Patricia, Rauch Carol A. Edberg Stephen c., Microsporidia and *Cyclospora* epidemiology and Assessment of Risk from the Environment, *Critical Reviews in Microbiology*, 2000, 26(2):69-90
 - 57 Sterling Charles R. and Ortega Ynés R. *Cyclospora*: An enigma Worth Unraveling, *EID* 1999, 5(1): 48-53
 - 58 Shoff William H., Behrman Amy J., Shepeherd Suzanne, *Cyclospora cayetanensis*, *eMedicine Journal* 2002, 3(7)
 - 59 Ortega et al *Cyclospora cayetanensis*: anew protozoan pathogen of humans. Program and Abstracts, 41st annual meeting of the American Society for Tropical Medicine and Hygiene, Seattle, 1992:15-19
 - 60 Ortega et al , A new coccidian parasite (Apicomplexa: emeriidae) from humans. *J. Parasitol.*1994; 80:625-629
 - 61 Pape JW, Verdier RI, Bonocy M, et al: *Cyclospora* infection in adults infected with HIV. Clinical manifestations, treatments, and prophylaxis. *Ann Intern Med* 1994 Nov 1; 121(9):654-7
 - 62 Deluol et al, *Cyclospora* sp.: life cycle by electron microscopy examination in HIV infected patients. Joint meeting of the American Society of Parasitology and society of Protozoology, Tucson, Arizona, 1996; 11-15 p.180
 - 63 Sun et al, Light and electron microscopic identification of *Cyclospora* species in the small intestine. Evidence of the presence of asexual life cycle in human host, *Am J Clin Pathol* 1996: 105:216-20
 - 64 Jelinek T, Lotze M, Eichenlaub S, et al: Prevalence of infection with *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* among international travelers. *Gut* 1997 Dec: 41(6):801-4
 - 65 Ortega Ynés R., Sterling Charles R. Gilman Robert H., Cama Vitaliano A and Díaz Fernando, *Cyclospora* Species- A New Protozoan Pathogen of Humans, *N Eng J Med*, 1993; 328 (18): 1308-1312
 - 66 Hoge Charles W., Shlim David R., Rajah ramachadran, Triplett Joh, Shear Michael, Rabold Gregory, Echeverria Peter, Epidemiology of diarrhoeal illness associated with Coccidian-like organism among travellers and foreigners residents in Nepal, 1993, 34:1175-1179
 - 67 Vazquez Tsuji Oscar, Jiménez Domínguez R., Martínez Barbosa I., Ruiz Hdez A., García Yañez Y., Frecuencia de *Cryptosporidium*, *Cyclospora* y enterocytosoon en pacientes pediátricos con diarrea, *Rev Mex Patol Clín* 1997; 44 (2) 79-84
 - 68 Vazquez Tsuji Oscar y cols, Infección por *Cyclospora cayetanensis*, Diagnóstico de Laboratorio, *Rev Lat Microbiol* 2000;42: 45-52
 - 69 Ponce Macotela Martha, Cob-Sosa Carlos, Martínez Gordillo Mario, *Cyclospora* en dos niños mexicanos, *Rev Invest Clin* 1996, 48 (6): 461-463
 - 70 Rabold JG, Hoge CW, Shlim DR, Kefford C, Rajah R, Echeverria P. *Cyclospora* outbreak associated with chlorinated drinking water [letter]. *Lancet* 1994;344:1360-1

- 71 Sturbaum GD, Ortega YR, Gilman RH, Sterling CR, Klein DA. Detection of *Cyclospora cayetanensis* in sewage water. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:2284-6
- 72 Kocka F, Peters C, Dacumos E, Azarcon E, Kallick C, Langkop C. Outbreaks of diarrheal illness associated with cyanobacteria (Blue-green algae)-like bodies-Chicago and Nepal, 1989 and 1990. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1991;40:325-7
- 73 Smith HV, Paton C, Girdwood RAW, Mtambo MMA. *Cyclospora* in non-human primates in Gombe, Tanzania. *Vet Rec* 1996;138:528
- 74 Jackson GJ, Leclerc JE, Bier JW, Madden JM. *Cyclospora*—still another new foodborne pathogen. *Food Technology* 1997;51:120
- 75 Rose JR, Lisle JT, LeChevallier M. Waterborne cryptosporidiosis: incidence, outbreaks, and treatment strategies. In: Fayer R, editor. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. Boca Raton (FL): CRC Press, Inc. 1997. p. 93-109
- 76 Besser-Wiek JW, Forfang J, Hedberg CW, Korlath JA, Osterholm MT, Sterling CR, et al. Foodborne outbreak of diarrheal illness associated with *Cryptosporidium parvum*—Minnesota, 1995. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1996;45:783-4
- 77 Millard PS, Gensheimer KF, Addiss DG, Sosin DM, Houck-Jankoski A, Hudson A. An outbreak of cryptosporidiosis from fresh pressed apple cider. *JAMA* 1994;272:1592-6
- 78 Meng J, Doyle MP. Emerging issues in microbiological food safety [review]. *Annu Rev Nutr* 1997;17:255-75
- 79 Garcia-Lopez HL, Rodriguez-Tovar LE, Medina-de la Garza CE. Identification of *Cyclospora* in poultry [letter]. *EID* 1996;2:356-7
- 80 Relman DA, Schmidt TM, Gajadhar A, Sogin M, Cross J, Yoder K, et al. Molecular phylogenetic analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggests that it is closely related to *Eimeria* species. *J Infect Dis* 1996;173:440-5
- 81 Pieniazek NJ, Herwaldt BL. Reevaluating the molecular taxonomy: is the human associated *Cyclospora* a mammalian *Eimeria* species? *EID* 1997;3:381-3
- 82 <http://www.totaldigestivehealth.com>
- 83 Ortega Ynés R., Nagle Raymond, Gilman Robert, Watanebe Jose, Miyagui Juan, Quispe Hugo, Kanagusuku Patricia, Roxas Concepción and Serling Charles, Pathologic and Clinical Findings in Patients with Cyclosporiasis and a Description of Intracellular Parasite Life-cycle stages, *J Infec Dis* 1997; 176: 1584-1589
- 84 Huang Philip, Weber Todd, Sosin Daniel, Griffin Patricia, Long Earl, Murphy John, Kocka Frank, Peters Caryn, Kallick Charles, The First Reported Outbreak of Diarrheal Illness Associated with *Cyclospora* in the United States, *Ann Intern Med.* 1995;123 (6):409-424
- 85 Berlin O.G., Peter J.B., Gagne C., Contreas C.N., Ash LR Autofluorescence and Detection of *Cyclospora* Oocysts, *EID* 1998, Vol. 4.No. 1 Letters. [Http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no1/letters.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no1/letters.htm)
- 86 Visvesvara G.S., Moura H., Kovacs-Nace E., Wallace S., Eberhard M.L., Uniform Staining of *Cyclospora* Oocysts in Fecal Smears by a Modified Safranin Technique with Microwave Heating, *J Clin Microbiol*, 1997; 35 (3):730-733
- 87 Orlandi Palmer A., Lampel Keith A., Extraction-Free, Filter-Based Template Preparation for Rapid and Sensitive PCR Detection of Pathogenic Parasitic Protozoa. *J Clin Microbiol*, 2000; 38 (6);2271-2277
- 88 Minnaganti Venkat R, Cunha Burke A, Isosporiasis, 2002, <http://www.emedicine.com/med/tropic1194.htm>
- 89 Sorvillo, F.J., L.E. Lieb, J. Seidel, P. Kerndt, J. Turner, and I.R. Asb. Epidemiology of isosporiasis among persons with acquired immunodeficiency syndrome in Los Angeles County. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995 53;656-659.
- 90 Lindsay David S., Dubey J.P., Blagburn Byron, Biology of *Isospora* spp. From Humans, Nonhumans Primates, and Domestic Animals, *Clin Microbiol Reviews* 1997;10(1);19-34
- 91 www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/isospora/default.htm

- 92 Comin, Santucci, Submicroscopic profile of *Isospora belli* enteritis in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Ultrastruct. Pathol.* 1994;18:473-482
- 93 Santana Añe Mercedes, Villaverde Añe Biarda, Morales Landrove Amaury, Pérez Ávila Jorge, Infección por VIH e Isosporiasis. Presentación de un caso, *Rev Cub Med Trop* 1997;49(2):142-144
- 94 Felez et al Enteritis por *Isospora belli* en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Descripción de 9 casos. *Med. Clin. Barcelona* 1990 ; 95:84-88
- 95 Greenberg et al *Isospora belli* enteric infection in patients with human T-cell leukemia virus type I-associated adult T-cell leukemia. *Am. J. Med.* 1988; 85:435-438
- 96 DeHovitz et al Clinical manifestations and therapy of *Isospora belli* infection in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*1986; 315:87-90
- 97 Prasad K.N., Nag V.L., Dhole T.N. Ayyagari A., Identification of Enteric Pathogens in HIV-positive Patients with Diarrhoea in Northern Asia, *J Health Popul Nutr* 2000;18(1):23-24
- 98 Dauschies A., Bialek R., Joachim A., Mundt C., Autofluorescence microscopy for the detection of nematode eggs and protozoa, in particular *Isospora suis*, in swine faeces, *Parasitol Res*, 2001; 87:409-412
- 99 Tay Zavala J., Sánchez Vega J., Características de protozoarios y helmintos capaces de causar diarrea aguda en humanos, *Rev Fac Med UNAM*, 2002: 45(2):64-70
- 100 Velázquez JN, Carnevale S, Mariano M, Kuo LH, Caballero A, Chertcoff A, Ibáñez C, Bozzini JP, Isosporosis and unizote tissue cyst in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Hum Pathol* 2001, 32:500-505
- 101 Muller A, Bialek R, Fatkenheurer G, Salzberger B, Diehl V, Granzen C, Detection of *Isospora belli* by polymerase chain reaction using primers based on small-subunit ribosomal RNA sequences, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:631-634
- 102 Varea M, Clavel A, Doiz O, Castillo FJ, Rubio MC, Gomez-Lus R., Fuchsin fluorescence and autofluorescence in *Cryptosporidium*, *Isospora* and *Cyclospora* oocysts, *Int J Parasitol* 1998; 28(12):1881-1883
- 103 Ruiz-Sánchez, Tay J., Microsporidiosis: Estado Actual de una Nueva Parasitosis. *Rev Lat-Amer Microbiol* 1996;38:151-166,
- 104 Gutiérrez Yezid. Capítulo 2, Microspora. *Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations*, Second Edition. Oxford University Press,2000. p-17-42
- 105 Cali A, Weiss L, Takvorian P, Microsporidian taxonomy: What is a family, genus and species? Joint Meeting of the American Society of Parasitology and Society of Protozoology. Tucson, Arizona, 1996; 11-15, Abstracts, pp 100S-101S
- 106 Canning EU, Lom J., *The Microsporidia of Vertebrates*, New York: Academic Press 1986
- 107 <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/aids.htm>
- 108 www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Microsporidiosis.htm
- 109 Desportes Isabelle Livage, Human Microsporidiosis: new opportunistic infections, *Rev Mex Patol Clín* 1997; 44(1):12-16
- 110 Curry A, Canning EU, Human microsporidiosis. *J. Infect.* 1993;27:229-236
- 111 Didier ES, et al, Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J. Infect. Dis.* 1991;163:617-621
- 112 McCluskey PJ, Goonan PV, Marriott DJ, Field AS, Microsporidial keratoconjunctivitis in AIDS. *Eye* 1993;7:80-83
- 113 Metcalfe TW et al. . Microsporidial Keratoconjunctivitis in a patient with AIDS. *Br. J. Ophthalmol.* 1992;76:177-178
- 114 Friedberg DN et al, Microsporidial keratoconjunctivitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Ophthalmol.*1990; 108:504-508
- 115 eMedice Journal, 2002, 3 (1);

- 116 Hollister WS, Canning EU, Willcox A, Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (microspora) in provided by ELISA and other serological test. *Semin. Respir. Infect* 1991;102:33-43
- 117 Croppo et al Antigenic analysis of *Encephalitozoon cuniculi* (CDC;V282) isolated from the urine of a patient with AIDS. Joint meeting of the American Society of Parasitology and American Association of Veterinary Parasitology. Pittsburgh, Pennsylvania, June 1995. Abstracts, p 104
- 118 van Gool et al, High sero-prevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetet subjects. *J. Infect. Dis.*1997;75:1020-1024
- 119 Singh M, Kane GH, Mackinlay L, Quaky I, Yap EH, et al, Detection of antibodies to *Nosema cuniculi* (Protozoa: Microsporidia) in human and animal sera by the indirect fluorescent antibody technique. *Southeast Asian J. Trop Med. Public Health* 1982;13:110-113
- 120 Cornet M, Romand AS, Warszawski J, Bouree P, Factors associated with microsporidial and cryptosporidial diarrhea in HIV infected patients. *Parasite* 1996;3:397-401
- 121 <http://www.apic.edu/biology/protozoology/microsporidiosis.htm>
- 122 Hollister WS, Canning EU, Colbourn NI, Aarons EJ, *Encephalitozoon cuniculi* isolated from the urine of an AIDS patient, which differs from canine and murine isolates. *J. Euk. Microbiol.* 1995;42:367-372
- 123 Baker MD et al, Small subunit ribosomal DNA phylogeny of various microsporidia with emphasis on AIDS related forms. *J. Euk. Microbiol.*1995; 42: 564-570
- 124 Hollister WS, et al, Characterization of *Encephalitozoon hellem* (microspora) isolated from the nasal mucosa of a patient with AIDS. *Semin. Respir. Infect.* 1993;107:351-358
- 125 Schwartz DA, et al Pathologic features and immunofluorescent antibody demonstration of ocular microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) in seen patients with acquired immunodeficiency síndrome. *Am. J. Ophthalmol.* 1993;115:285-292
- 126 Cali A, Lotler DP, Orenstein JM, *Septata intestinalis* n.g., n.sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J. Euk. Microbiol.*1993; 40:101-112
- 127 Blanshard C et al Simultaneous infection with two types of intestinal microsporidia in a patient with AIDS. *Gut*; 1992. 33:418-420)
- 128 Aarons EJ, et al, Reversible renal failure caused by a microsporidian infection. *AIDS* 1994;8:1119-1121
- 129 Lowder CY et al, Microsporidial keratoconjunctivitis caused by *Septata intestinalis* in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Ophthalmol* 1996; 121:715-717
- 130 Willson R et al, Human immunodeficiency virus 1-associated necrotizing colangitis caused by infection with *Septata intestinalis*. *Gastroenterology* 1995;108:247-251
- 131 Chu, West AB, *Encephalitozoon (Septata) intestinalis*. Cytologic, histologic and electron microscopic features of a systemic intestinal pathogen. *Am.J.Clinic. Pathol.* 1996;106:606-614
- 132 Molina JM et al, Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS: clinical features and response to albendazole therapy. *J. Infect. Dis.* 1995; 171:245-249
- 133 Gamboa Domínguez A, Soberanes Cerino C, Bencosme Viñas C, Kato Maeda M., Prevalencia de *Encephalitozoon intestinalis* en Pacientes con Sida y Diarrea Crónica, Universidad y Ciencia, 1998; 14(27):51-58
- 134 Desportes I et al, Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bienewisi* n.g.,n.sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J. Protozool.* 1985; 32:250-254
- 135 Sandfort et al, *Enterocytozoon bienewisi* infection in a immunocompetent patient who had acute diarrhea and who was not infected with the human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 1994;19:514-516
- 136 Rabeneck L et al, The role of Microsporidia in the pathogenesis of HIV-related chronic diarrhea. *Ann. Intern. Med.*1993; 119:895-899

- 137 Cali A, Owen RL, Intracellular development of Enterocytozoon, a unique microsporidian found in the intestine of AIDS patients. *J. Protozool.* 1990;37:145-155
- 138 Kokoskin et al, Modified Technique for efficient Detection of Microsporidia. *J Clin Microbiol* 1994;32 (4):1974-1975
- 139 Beaugerie L et al, . Cholangiopathy associated with Microsporidia infection of the common bile duct mucosa in a patient with HIV infection. *Ann. Intern. Med.*1992;117:401-402
- 140 Gourley WK, Swedo JL, Intestinal infection by microsporidia Enterocytozoon bienewsi of patients with AIDS: an ultra structural study of the use of human mitochondria by a protozoan. US and Canadian Academy of Pathology annual meeting. Washington, D.C.,1988. Abstracts, p 35A
- 141 Orenstein et al,. Intestinal microsporidiosis as a cause of diarrhea in human immunodeficiency virus-infected patients: a report of 20 cases. *Hum. Pathol.* 1990;21:475-481
- 142 www.paru.cas.cz/Structure/Protozoology/medical.htm
- 143 Silveira IL, Canning EU, Vittiforma corneae n. Comb. For the human microsporidium Nosema corneum Shaduck, Meccoli, Davis & Font, 1990 based on its ultrastructure in the liver of experimentally infected athymic mice. *J. Euk. Microbiol.* 1995;42:158-165
- 144 Field et al, Clinical presentation and light and electron microscopic findings of a new microsporidian, Trachipleistophora hominis, in a patient with AIDS. Joint meeting of the American Society of Parasitology and Society of Protozoology. Tucson, Arizona, 1996;11-15. Abstracts, p. 1035
- 145 Hollister WS et al Development and ultrastructure of Trachipleistophora hominis n.g., n. sp. After in vitro isolation from an AIDS patient and inoculation into athymic mice. *Semin. Respir. Infect.* 1996;112:143-154
- 146 Vavra et al Microsporidia of the genus Trachipleistophora-causative agents of human microsporidiosis: description of Trachipleistophora anthropophthera n. sp.. *J.Euk. Microbiol.*1998; 45:273-283
- 147 Yachnis et al Disseminated microsporidiosis especially infecting the brain, heart, and kidneys. Report of a newly recognized pansporoblastic species in two symptomatic AIDS patients. *Am. J.Clin. Pathol.* 1996;106:535-543
- 148 memorias del Instituto Oswaldo Cruz On-line, Supp 1-2000 Nov
- 149 Schwartz, D.; R. Bryan and G. Visversvara. Diagnostic approaches for Encephalitozoon infections in patients with AIDS. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1994 41:595-605
- 150 Carter Patricia, MacPherson Doduglas, Mckenzie RICHARD, Modified Tecnique To Recover Microsporidian Spores In Sodium Acetate-Acetic Acid-Formalin-Fixed Fecal Samples by Light Microscopy and Correlation with Transmission electron Microscopy. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (11):.2670-2673
- 151 Clarridge Jill, Karkhanis Shilpa, Rabeneck Linda, Marino Bernard Foote W., Quantitative Light Microscopic Detection of Enterocytozoon bienewsi in Stool Specimens: a Longitudinal Study of Human Inmmunodeficiency Virus-Infected Microsporidiosis Patients. *J Clinical Microbiol* 1996;34(3): 520-523
- 152 Ryan et al A new Trichrome-Blue Stain for detection of Microsporidial species in Urine, Stool, and Nasopharyngeal Specimens. *J Clin Microbiol* 1993;31(12): 3264-3269
- 153 Van Gool et al Diagnosi of Enterocytozoon bienewsi microsporidiosis en AIDS patients by recovery of spores from faeces. *The Lancet*, 1990; 336 (15):697:698
- 154 Weber et al, Improved light microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *The New England Journal of Medicine*, 1992; 326 (3):161-166
- 155 De Girolami et al Diagnosis of Intestinal Microsporidiuis by Examination of Stool and Duodenal Aspirate with Weber ´s Modified Trichrome and Uvitex 2B Stains. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (4): 805-810

- 156 Fedorko Daniel, Hijazi Yasmine, Application of Molecular Techniques to the Diagnosis of Microsporidial Infection. EID 1996; 2(3)
- 157 Charles et al Detection of Microsporidian spores in clinical samples by Indirect Fluorescent-Antibody Assay using whole-cell antisera to Encephalitozoon cuniculi and Encephalitozoon hellem. J Clin Microbiol 1993;31 (11): 3071-3074
- 158 Hester Jeff, Lindquist Alan, Bobst Albert, Schaefer Frank, Fluorescent in situ Detection of Encephalitozoon hellem Spores with a 6-Carboxyfluorescein-Labeled Ribosomal RNA-Targeted Oligonucleotide Probe, J eukaryot Microbiol, 2000;47(3):299-308
- 159 Zierd Charles, Gill Vee, Zierdt Willadene, Detection of Microsporidian Spores in Clinical Samples by Indirect Fluorescent-Antibody Assay Using whole-Cell Antisera to Encephalitozoon cuniculi and Encephalitozoon hellem, J Clin Microbiol, 1993;31(11):3071-3074
- 160 Garcia-Lynne, Shimizu robyn, Bruckner David, Detection of Microsporidial Spores in Fecal Specimens from Patients Diagnosed with Cryptosporidiosis, J Clin Microbiol, 1994; 32(7):1739-1741
- 161 Identification and Diagnosis of Parasites of Public Health Concern. CDC; www.dpd.cdc.gov
- 162 S.Beauchamp de J et al, Blastocystis hominis: prevalencia en alumnos de una escuela básica. Maracaibo, Edo Zulia, Venezuela, Kasmera 1995;23(1):43-67,
- 163 Stenzel D J; Boreham PF and Mc. Dougal R. Ultrastructure of B. hominis in human stool samples. Int J for Parasitology 1991, 21(7):807-812
- 164 Perez Suarez Eva, Guzman de Rondon Carmen, La Morfoogía del Blastocystis hominis en las heces y evaluación de métodos parasitológicos, GEN Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología, 1994;48(4): 226-231
- 165 Zierd Ch. Blastocystis hominis. Part and future. Clin. Microbiol Rew 1991; 4:61-79
- 166 Vazquez Tsuji O., Millares Estévez Lydia, Vértiz Chávez Ernesto, Martínez Barbosa I., Diarrea aguda por Blastocystis hominis Informe de un caso Pediátrico, Acta Pediátrica de México, 1994; 15(3):146-149
- 167 Alvarez Chacon Rubén, Siqueiros Delgado Laura A, De la Cruz Otero Ma del Carmen, , Frecuencia de Blastocystis Hominis en niños atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría, Rev Mex Patol Clín 1995;42 (1):26-30
- 168 Root Richard K, Capítulo 5: Parasitic Protozoa and Helminths, Clinical Infectious Diseases; a Practical Approach, Oxford University Press 1999, p.37-42
- 169 Martinez AJ: Infection of the central nervous system due to Acanthamoeba. Rev Infect Dis 1991; 13 Suppl 5: S399-402
- 170 www.cdfound.to.it/html/atlas.htm
- 171 Francine Marciano-Cabral and S.Gaylen Bradley, Current Research on Free-living Amebae Causing Granulomatous Amebic Encephalitis, Seven International Workshops on Opportunistic Protists, Cincinnati, Ohio 2001; June 13-16,
- 172 <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Sarcodina/acanth>
- 173 Ferreira G. Elizabeth, Lares V. Fernando, Fernandez Q. Gabriela, Nieburg Phillip, Meningoencefalitis Amibiana Primaria: dos brotes en Mexicali, Baja California, México. ITSON-DIEP 1997; II (5)
- 174 Migueles S, Kumar P: Primary cutaneous Acanthamoeba infection in a patient with AIDS. Clin Infect Dis 1998;27(6): 1547-8
- 175 Sison JP, Kemper CA, Loveless M: Disseminated Acanthamoeba infection in patients with AIDS: case reports and review. Clin Infect Dis 1995;20(5): 1207-16
- 176 Francine Marciano- Cabral, Robyn Puffenbarger and Guy A. Cabral, The increasing Importance of Acanthamoeba Infections, J.Eukaryot Microbiol, 2000; 47(1): 29-36
- 177 <http://vm.cfsan.fda.gov>
- 178 De Jonckheere JF: Ecology of Acanthamoeba. Rev Infect Dis 1991; 13 Suppl 5: S385-7

- 179 Stapleton F, Seal DV, Dart J: Possible environmental sources of Acanthamoeba species that cause keratitis in contact lens wearers. *Rev Infect Dis* 1991;13 Suppl 5: S392
- 180 DiGregorio C, Rivasi F, Mongiardo M, et al: Acanthamoeba meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: first report from Europe. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116:1363-1365,
- 181 Rabinovitch T, Weissman SS, Ostler HB: Acanthamoeba keratitis: clinical signs and analysis of outcome. *Rev Infect Dis* 1991; 13 Suppl 5: S427
- 182 Koide, J, Okusawa, E., Ito, t., Mori, S., et al Granulomatous amoebic encephalitis caused by Acanthamoeba in a patient with systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* 1998; 17: 329-332.
- 183 Mathers WD, Nelson SE, Lane JL: Confirmation of confocal microscopy diagnosis of Acanthamoeba keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Arch Ophthalmol* 2000;118(2): 178-83
- 184 Park DH, Palay DA, Daya SM: The role of topical corticosteroids in the management of Acanthamoeba keratitis. *Cornea* 1997;16(3): 277-83
- 185 Romero Cabello, *Microbiología y Parasitología Humana*, 2da Edición, Medica Panamericana,1999 pp 600-602
- 186 Anzil AP, Rao C, Wrzolek MA, et al: Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:21-25,
- 187 www.hc-sc.gc.ca/pphb-dqsp/msds106e.html
- 188 John DT: Primary amebic meningoencephalitis and the biology of Naegleria fowleri. *Ann Rev Microbiol* 1986;36:101-123,
- 189 López Corella, E.; B. De León & J.F. De Jonckheere. Meningoencefalitis Amibiana por Naegleria fowleri en un adolescente de Huetamo, Michoacán, México. *Bol Med Hosp Infant Mex* 1989;46;619-622
- 190 Levy, D.A., M.S. Bens, G.F. Craun, R.L. Calderon, and B.L. Herwaldt, "Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1995-1996," *Mortality Weekly Report, CDC Surveillance Summary*, 1998.; 47(5): 1-34
- 191 Martinez AJ, Guerra AE, Garcia-Tamayo J, et al: Granulomatous amebic encephalitis. A review and report of a spontaneous case from Venezuela. *Acta Neuropathol* 1994; 87:430-434,
- 192 www.drscope.com/pac/infecto-1
- 193 Talaska Frances FischBach, *Manual de Pruebas Diagnósticas*, 5ta Ed, Mc Graw Hill Interamericana 1996
- 194 www.sabater-tobella.com/htm/ing/00003-41.html
- 195 www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Diagnostic_procedures.htm
- 196 Visvesvara G.S, et all, Uniform Staining of Cyclospora Oocysts in Fecal Smears by a Modified Safranin Technique with Microwave Heating, *J Clin Microbiol* 1997;35 (3): 730-733
- 197 Bernal Redondo et all, Protozoos Emergentes; Comparación de Tres Métodos de Identificación, *Rev Mex Patolo Clín* 1998; 45 (4): 193-199
- 198 Ignatius ralf et all, A New Acid-Fast Trichrome Stain for Simultaneous Detection of Cryptosporidium parvum and Microsporidial Species in stool Specimens, *J Clin Microbiol* 1997;35 (2):446-449
- 199 Kehl C Karen Sue, Cicirello Hellen, Havens Peter L., Comparison of Four Different Methods for detecton of Cryptosporidium species, *J Clin Microbiol* 1995;33(2): 416-418
- 200 Bernard John Henry *Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio*, 9a Ed, Masson-Salvat ,1993
- 201 Lynne Shore García, *Diagnóstico Parasitológico*, 2a Ed, Editorial Médica Panamericana 1987

- 202 Schetino Salazar Paz, Técnicas de Diagnóstico Morfológico de las Parasitosis, Editor Fco Méndez 1980
- 203 <http://www.ksu.edu/parasitology/measurements>
- 204 Root Richard K, Capítulo 19, Clinical Parasitology. Clinical Infectious Diseases; a Practical Approach, Oxford University Press, 1999:181-193
- 205 Gaviño De La Torre Gonzalo, Juárez López C. Figueroa Tapia H. Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo, Limusa Noriega 1993:p- 235
- 206 Moura H, Schwartz DA, Bornay-Llinares F, et al A new and Improved "Quick-Hot Gram-Chromotrope" Technique That Differentially Stains Microsporidian Spores in Clinical Samples, Including Paraffin-Embedded Tissue Sections. Arch Pathol Lab Med. 1997;121:888-893
- 207 Berlin O.G.W., Peter J.B., Gagne C., Contreas C.N., Ash L.R., Autofluorescence and the Detection of Cyclospora oocysts, EID 1998;4 (1) (Letters).
- 208 Eberghard ML., Pienazek NJ, Arrowood MJ., Laboratory diagnosis of cyclospora infections. Arch Pathol Lab Med, 1997; 121; 792-7
- 209 (*) a Alexon-Trend, 14000 Unity Street NW Ramsey, MN 55303 - Becton Dickinson, 1 Becton Dr., Franklin Lakes, NJ 07417 - BioSite, 11030 Roselle St., San Diego, CA 92121 - Cellabs, P O Box 421, Brookvale, NSW 2100, Australia - Genzyme Virotech, GmbH, Lowenplatz 5, 66248, Russelheim, Germany - Meridian Bioscience, Inc., 3471 River Hills Dr., Cincinnati, OH 45244 - Novocastra, 30 Ingold Rd., Burlingame, CA 94010 - Remel, P O Box 14428, Lenexa, KS 66215 - TechLab, VPI Research Park, 1861 Pratt Dr., Blacksburg, VA 24060 - Wampole Laboratories, P O Box 1001, Cranbury, NJ 08512.
- 210 Johnson et al 1995. "Development of a PCR protocol for sensitive detection of Cryptosporidium oocysts in water samples." Appl Environ Microbiol, 1995; 61 (11): 3849-55
- 211 Wagner-Wiening y Kimming, "Detection of viable Cryptosporidium parvum oocysts by PCR." Appl Environ Microbiol, 1995; 61 (12): 4514-6
- 212 Krause PJ. Babesiosis, Med Clin North Am 2002;86, (2):361-373
- 213 Weiss LM, Zhu X, Cali A, Tanowitz HB, Wittner M. Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny: a review. Folia Parasitol 1994 ;41:81-90
- 214 Franzen C, Müller A, Hegener P, Salzberger B, Hartmann P, Fätkenheuer G, et al. Detection of microsporidia (Enterocytozoon bienewisi) in intestinal biopsy specimens from human immunodeficiency virus-infected patients by PCR. J Clin Microbiol 1995;33:2294-6.
- 215 Zhu X, Wittner M, Tanowitz HB, Kotler D, Cali A, Weiss LM. Small subunit rRNA sequence of Enterocytozoon bienewisi and its potential diagnostic role with use of the polymerase chain reaction. J Infect Dis 1993;168:1570-5
- 216 da Silva AJ, Schwartz DA, Visvesvara GS, de Moura H, Slemenda SB, Pieniazek NJ. Sensitive PCR diagnosis of infections by Enterocytozoon bienewisi (microsporidia) using primers based on the region coding for small-subunit rRNA. J Clin Microbiol 1996;34:986-987
- 217 Visvesvara GS, Leitch GJ, da Silva AJ, Croppo GP, Moura H, Wallace S, et al. Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small subunit rRNA identification of a microsporidian, Encephalitozoon hellem, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. J Clin Microbiol 1994;32:2760-8.
- 218 de Groot MA, Visvesvara G, Wilson ML, Pieniazek NJ, Slemenda SB, da Silva AJ, et al. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated Encephalitozoon cuniculi in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. J Infect Dis 1995;171:1375-8
- 219 Hartskeerl RA, Schuitema ARJ, deWachter R. Secondary structure of the small subunit ribosomal RNA sequence of the microsporidium Encephalitozoon cuniculi. Nucleic Acids Res 1993;21:1489
- 220 Vossbrinck CR, Baker MD, Didier ES, Debrunner-Vossbrinck BA, Shadduck JA. Ribosomal DNA sequences of Encephalitozoon hellem and Encephalitozoon cuniculi: species identification and phylogenetic construction. J Euk Microbiol 1993;40:354-62

- 221 1. Fedorko DP, Nelson NA, Cartwright CP. Identification of microsporidia in stool specimens by using PCR and restriction endonucleases. J Clin Microbiol 1995;33:1739-41.
- 222 emedicine journal, January 15 2002, Vol. 3 No. 1
- 223 Mota Patricia, Rauch Carol A. Edberg Stephen c., Microsporidia and Cyclospora epidemiology and Assessment of Risk from the Environment, Critical Reviews in Microbiology, 2000;26(2):69-90
- 224 www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/cryptosporidium/default.htm

APÉNDICE A

CYTOSEALTM 60

RICHARD-ALLAN SCIENTIFIC
4481 Campus Drive Kalamazoo, MI 49008 / CHEMTREC (800) 424-9300

1. IDENTIFICACIÓN

SUBSTANCIA: CytosealTM 60 Medio de montaje

NÚMERO DE CATALOGO: 8310-4, 8310-16

NOMBRES COMUNES / SINÓNIMOS: CytosealTM 60 Medio de montaje, Accumount 60 Medio de montaje

FAMILIA QUÍMICA: Hidrocarburos aromáticos,

2. COMPOSICIÓN

Contenido Aromático Total:

Tolueno	CAS# 108-88-3	65%
Resina Acrilica	CAS# 28262-63-7	35%
Antioxidante	CAS# 128-37-0	
Butil Benzil Phthalato	CAS# 100-41-4	

3. RIESGOS DE EXPOSICIÓN

ESCALA y VALORES NFPA (ESCALA 0-4):

Salud=2 Fuego=3 Reactividad=0

CytosealTM 60 es una mezcla de resina acrílica suspendida en tolueno. El contenido de tolueno es de aproximadamente de 65%. CytosealTM 60 es una solución viscosa incolora y aromática. CytosealTM puede ser tóxica si se ingiere. Cuando se somete a una leve exposición sobrevienen los siguientes síntomas: debilidad, vértigo, mareo, euforia, dolor de cabeza, náusea y vómito, las repetidas o prolongadas exposiciones incrementan los efectos tóxicos.

Rutas primarias de exposición:

Inhalación, Ingestión, Contacto en ojos y piel.

Efectos agudos:

Como resultado de una inhalación o ingestión prolongada, se presentan síntomas como los anteriormente citados además de opresión en el pecho y titubeo como resultado de una visión borrosa, temblores, respiración rápida y superficial, irregularidades ventriculares y en último caso puede ocurrir daño al hígado o al riñón.

Efectos Crónicos:

Una exposición prolongada o repetidas de tolueno pueden causar dolores de cabeza, pérdida de apetito, somnolencia, nerviosismo y palidez. Inhalación continua y repetida de tolueno puede provocar una encefalopatía irreversible presentando ataxia, timidez, vacilación, atrofia cerebral difusa.

Efectos Inmediatos:

- Inhalación: Dolores de cabeza, mareo, náusea y vómito.
- Contacto en los ojos: Puede causar una severa irritación.
- Contacto en la piel: Causa irritación.
- Ingestión: Perjudicial, puede incluso ser fatal. Provoca náusea y vómito.

4. PRIMEROS AUXILIOS**Inhalación:**

Remueva al paciente a un área ventilada con aire fresco de manera inmediata. Si la respiración se detiene, provea de una respiración asistida artificialmente. Si la respiración se dificulta administre oxígeno. Mantenga a la persona tapada y con una temperatura tibia y dejela reposar. Acuda inmediatamente al médico.

Contacto en los ojos:

Lávelos inmediatamente con abundante agua hasta que no exista evidencia de que el agente químico permanece (entre 15 y 20 minutos). Acuda inmediatamente al médico.

Contacto en Piel:

Remueva la ropa y el calzado contaminado de forma inmediata. Lave perfectamente el área afectada con jabón neutro y abundante cantidad de agua hasta que no persista evidencia clara de que el agente químico permanece sobre la piel (entre 15 y 20 minutos). Si persiste la irritación acuda a una atención médica.

Ingestión:

Si se traga, NO induzca el vómito.

Si el vómito ocurre, asegure que la cabeza de la víctima se encuentre mas bajo que las caderas con el fin de prevenir una aspiración. Llame al médico inmediatamente.

ANTÍDOTO: No hay un antídoto específico.

5. PROCEDIMIENTOS CONTRA INCENDIO

RIESGO DE FUEGO Y EXPLOSIÓN: Líquido Flamable

MEDIOS PARA EXTINGUIR EL FUEGO:

Extintores de químicos secos, Dioxido de carbono. Para fuegos grandes y prolongados utilice agua espreada, en niebla o en espuma. (1993 Emergency Response Guidebook, DOT P 5800.5).

PROCEDIMIENTOS DE RESPUESTA ANTE INCENDIOS:

Provea de protección respiratoria. Utilice agua en spray para reducir los vapores y mantener a los contenedores a una temperatura fresca.

6. DERRAMES ACCIDENTALES DEL PRODUCTO

DERRAME PEQUEÑO: Remueva o aleje si le es posible cualquier fuente de ignición. Utilice equipo de protección personal, guantes apropiados, lentes de protección y delantal. Detenga el derrame sólo si le es posible y puede hacerlo sin riesgo. Contenga el derrame con arena u otro material absorbente y colóquela en un contenedor adecuado e identifíquelo para su posterior tratamiento de desecho.

DERRAME GRANDE: Utilice el equipo de protección necesario y un equipo autónomo de respiración. Mantenga alejada a las personas del área afectada, delimite el área de riesgo y restrinja el acceso a ella. No fume, ni encienda cualquier fuente de ignición en el área contaminada. Si el derrame es verdaderamente grande y no puede seguir las indicaciones indicadas en el tipo de derrame anterior llame inmediatamente al departamento de bomberos.

7. MANEJO Y ALMACENAJE

Por se un producto FLAMABLE, debe guardarse en una área fresca, alejada de fuentes de calor, chispas y flamas abiertas. Evite el contacto con la piel y la ropa, así como los ojos. Evite respirar los vapores. Mantenga los contenedores perfectamente cerrados y colocados de forma adecuada en un estante. Lávese las manos perfectamente despues de utilizarlo. No lo almacene junto con materiales oxidantes. Un contenedor vacío debe ser tratado de la misma manera como uno lleno.

8. CONTROL DE EXPOSICIÓN (PROTECCIÓN PERSONAL)

VENTILACIÓN: Asegúre una ventilación local o general adecuada.

GUANTES: Utilice guantes resistentes para exposiciones prolongadas o repetidas con este material.

PROTECCIÓN OCULAR: Se recomienda el uso de goggles o lentes de seguridad que prevengan cualquier contacto con esta substancia.

9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

DESCRIPCIÓN: Líquido incoloro con característico olor de aromáticos.

GRAVEDAD ESPECÍFICA: 0.97 Kg/l

PUNTO DE EBULLICIÓN: 231°F (110°C)

PRESIÓN DE VAPOR: Approx. 47mm/Hg @68°F

SOLUBILIDAD EN AGUA: Insoluble

DENSIDAD DE VAPOR: Más pesado que el aire

RANGO DE EVAPORACIÓN (Butyl Acetate = 1): Más bajo que el eter

FLASHPOINT: 40°F (4.5°C)

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD:

El medio de montaje Cytoseal™ es estable en contenedores cerrados y bajo condiciones normales de presión y temperatura. El tolueno puede eaporarse al exponerse al aire.

INCOMPATIBILIDADES: Ácidos fuertes y materiales oxidantes.

ÁCIDO NITRICO: Reacción vigorosa.

ÁCIDO NITRICO + ÁCIDO SULFURICO: Puede ocurrir una violenta descomposición.

TETROXIDO de NITROGENO: Reacción explosiva.

OXIDIDANTES FUERTES: Riesgo de explosión y incendio.

PLÁSTICOS, GOMAS: Pueden ser atacadas por esta mezcla.

ÁCIDO SULFÚRICO: Reacción exotérmica.

TETRANITROMETANO: Forma una mezcl explosiva

DECOMPOSICIÓN: Los productos de la descomposicion térmica pueden liberar vapores y humos muy irritantes.

APÉNDICE B

MEDIOS DE MONTAJE ALTERNOS

BÁLSAMO DE CANADÁ

El bálsamo del Canadá es uno de los medios resinosos de montaje más comunes. Se obtiene del exudado natural de la conífera *Abies balsamica*. Para obtener buenos resultados, los cortes o especímenes se deben deshidratar perfectamente hasta alcohol absoluto y luego aclarar, pues de lo contrario las preparaciones pronto se tornan amarillentas y los tejidos se desintegra. En muchos casos, aún cuando la deshidratación y el aclaramiento se hayan efectuado con mucho cuidado, sucede que varios años después de efectuando el montaje, las preparaciones tienden a hacerse amarillentas; razón por la cual algunos investigadores prefieren efectuar sus montajes con resina sintética, euparal, zut y otros medios.

EUPARAL

El euparal es un medio de montaje resinoso considerado como "neutro", porque permite transferir los objetos directamente desde el alcohol de deshidratación. Este medio aclara y monta al mismo tiempo. Permite preparaciones excelentes de invertebrados, que puedan transferirse al euparal directamente desde el alcohol de 90%. También es propio para las preparaciones de sangre teñida.

GELATINA GLICERINADA

Este medio se utiliza para montar especímenes delicados o blandos difíciles de montar en bálsamo y en otros medios. Puede utilizarse como un medio de montaje temporal en el que no se requiere de una deshidratación completa del espécimen y en el caso de que la preparación no se selle alrededor del cubreobjetos. En tales condiciones es de mucha utilidad para la observación e identificación de algunos animales, como nemátodos, vegetales y alas filamentosas. Sin embargo, también se puede utilizar para montajes permanentes y para ello se necesita sellar la preparación perfectamente con algún cemento impermeable.

Gelatina en polvo	3.5 g
Agua destilada	21 cc
Glicerina	25 cc
Ácido fénico	1 g

Agregue agua a la gelatina, dejándola durante una a dos horas, y después la glicerina. Funda de inmediato la mezcla en baño maría, sin dejar de agitar. Una vez fundida, sáquela del fracaso y agregue el ácido fénico. Filtre en seguida a través de un lienzo fino.

RESINA SINTÉTICA

La resina sintética que se adquiere comercialmente, está preparada para usarse como medio de montaje. Con ella se pueden lograr preparaciones permanentes, que difícilmente llegan a destruirse (si la deshidratación no fue perfecta) y no llegan a tomarse amarillentas como el bálsamo de Canadá.

APÉNDICE C
DATOS ESTADÍSTICOS INEGI- SECRETARÍA DE SALUD
PRINCIPALES CAUSAS DE EGRESOS HOSPITALARIOS, 2001

Núm. de orden	Causas	Criterio de Agrupación	Egresos	Tasa	%
	Total	000	1,490,778	3,379.2	100.0
1	Parto único espontáneo	161	347,935	788.7	23.3
2	Causas obstétricas directas (excepto aborto)	160	259,407	588.0	17.4
3	Traumatismos, envenenamientos y algunas otras consecuencias de causas externas	166	124,650	282.5	8.4
	- Fracturas	166A	50,078	113.5	3.4
4	Aborto	159	75,695	171.6	5.1
5	Ciertas afecciones originadas en el período perinatal	163	70,678	160.2	4.7
	- Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el período perinatal	163I	14,760	33.5	1.0
	- trastornos relacionados con la gestación corta y el bajo peso al nacer	163C	13,808	31.3	0.9
6	Tumores malignos	049	34,653	78.6	2.3
	- Tumor maligno del cuello del útero	049O	5,022	11.4	0.3
	- Leucemias	0494	4,382	9.9	0.3
	- Tumor maligno de la mama	049M	3,431	7.8	0.2
7	Colelitiasis y colecistitis	126	30,013	68.0	2.0
8	Diabetes mellitus	061	29,237	66.3	2.0
9	Hernia de la cavidad abdominal	120	28,766	65.2	1.9
10	Enfermedades del apéndice	119	28,067	63.6	1.9
11	Enfermedades infecciosas intestinales	001	26,461	60.0	1.8
12	Enfermedades del corazón	097	25,908	58.7	1.7
13	Influenza y Neumonía	105	25,484	57.8	1.7
14	Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	165	21,504	48.7	1.4
15	Insuficiencia renal	139	19,895	45.1	1.3
16	Infecciones respiratorias agudas	104	14,721	33.4	1.0
17	Leiomioma uterino	053	12,433	28.2	0.8
18	Atención para la anticoncepción	178	11,176	25.3	0.8
19	Enfermedades del hígado	125	10,839	24.6	0.7
20	Enfermedades cerebrovasculares	098	9,793	22.2	0.7
	Síntomas, signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio no clasificados en otra parte	998	14,919	33.8	1.0
	Las demás causas	999	268,544	608.7	18.0

en a desgloses de las 10 primeras causas y no se acumulan

tal del porcentaje

bitantes de población potencial

Fuente: INEGI/SSA, Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño

APÉNDICE D
DATOS ESTADÍSTICOS INEGI-SECRETARIA DE SALUD
PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD GENERAL NACIONAL 2001

Núm. de orden	Causas	Clave CIE 10a Rev.	Defunciones	Tasa 1/	%
	Total	AOO-Y98	441004.00	436.65	100.00
1	Diabetes mellitus	E10-E14	49855.00	49.36	11.30
2	Enfermedades isquémicas del corazón	I20-I25	45421.00	44.97	10.30
3	Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	K70, K72.1,	25704.00	25.45	5.80
4	Enfermedad cerebrovascular	I60-I69	25657.00	25.40	5.80
5	Ciertas afecciones originadas en el período perinatal	P00-P96	18192.00	18.01	4.10
6	Enfermead pulmonar obstructiva crónica	J40-J44, J67	15944.00	15.79	3.60
7	Accidentes de tráfico de vehículo de motor	^{2/}	13761.00	13.63	3.10
8	Infecciones respiratorias agudas bajas	J10-J18, J2C	13101.00	12.97	3.00
9	Nefritis y nefrosis	N00-N19, A	10477.00	10.37	2.40
10	Enfermeades Hipertensivas	I10-I15	10170.00	10.07	2.30
11	Agresiones (homicidios)	X85-Y09, Yt	10165.00	10.06	2.30
12	Desnutrición calórico protéica	E40-E46	8615.00	8.53	2.00
13	Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón	C33-C34	6404.00	6.34	1.50
14	Tumor maligno de estómago	C16	4986.00	4.94	1.10
15	Enfermedades infecciosas intestinales	A00-A09	4897.00	4.85	1.10
16	Tumor maligno del cuello del útero	C53	4501.00	4.46	1.00
17	VIH/SIDA	B20-B24	4317.00	4.27	1.00
18	Uso de alcohol	F10, G31.2	4216.00	4.17	1.00
19	Tumor maligno del hígado	C22	4203.00	4.16	1.00
20	Tumor maligno de la próstata	C61	4015.00	3.98	0.90
	Causas mal definidas	R00-R99	9195.00	9.10	2.10
	Las demas		147208.00	145.75	33.40

¹ Tasa por 100,000 habitantes

Las totales no incluyen defunciones de residentes en el extranjero

^{2/} V02.V04 (.1.-9), V09.2-V09.3, V09.9, V12-V14 (.3.-9), V19.4-V19.6, V20-V28 (.3.-9), V29-V79 (.4.-9), V80.3-V80.5, V81.1, V82.1, V83-V86 (.0.-3), V87.0-V87.8, V89.9, Y85.0

Fuente: INEGI/SSA, Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño

APÉNDICE D

DATOS ESTADÍSTICOS INEGI-SECRETARÍA DE SALUD
PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD INFANTIL NACIONAL, 2001

Núm. de orden	Causas	Clave CIE 10a Rev.	Defunciones	Tasa 1/	%
	Total	AOO-Y98	35,889	1,686.8	100.0
1	Ciertas afecciones originadas en el período perinatal	POO-P96	18,192	855.0	50.7
2	Infecciones respiratorias agudas bajas	J10-J18, J20	2,819	132.5	7.9
3	Malformaciones congénitas del corazón	Q20-Q24	2,564	120.5	7.1
4	Enfermedades infecciosas intestinales	AOO-A09	1,577	74.1	4.4
5	Desnutrición calórico protéica	E40-E46	708	33.3	2.0
6	Anacefalia y malformaciones similares	Q00	299	14.1	0.8
7	Infecciones respiratorias agudas altas	J00-J06	243	11.4	0.7
8	Síndrome de Down	Q90	223	10.5	0.6
9	Defectos de la pared abdominal	Q79.2-Q79.5	205	963.0	0.6
10	Espina bífida	Q05.Q07.0	197	9.3	0.6
11	Enfermedad cerebrovascular	I60-I69	125	5.9	0.4
12	Nefritis y nefrosis	N00-N19, A39, G00, G03	121	5.7	0.3
13	Meningitis		107	5.0	0.3
14	Fístula traqueoesofágica, atresia y estenosis esfágica	Q39.0-Q39.3	107	5.0	0.3
15	Anemia	D50-D64	92	4.3	0.3
16	Accidentes de tráfico de vehículo de motor	^{2/} X85-Y09	84	4.0	0.2
17	Agresiones (homicidios)	Y87.1	80	3.8	0.2
18	Epilepsia	G40-G41	63	3.0	0.2
19	Asma	J45-J46	51	2.4	0.1
20	Enfermedades inflamatorias del corazón (exc. Fiebre reumática)	I30-I33, I38,	48	2.3	0.1
	Causas mal definidas	R00-R99	521	24.5	1.5
	Las demas		7,463	350.8	20.8

¹ Tasa por 100,000 nacimientos estimados de CONAPO

Las totales no incluyen defunciones de residentes en el extranjero

^{2/} V02.V04 (.1.-.9), V09.2-V09.3, V09.9, V12-V14 (.3.-.9), V19.4-V19.6, V20-V28 (.3.-.9), V29-V79 (.4.-.9), V80.3-V80.5, V81.1, V82.1, V83-V86 (.0.-.3), V87.0-V87.8, V89.9, Y85.0

Fuente: INEGI/SSA, Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño

APÉNDICE D
DATOS ESTADÍSTICOS INEGI-SECRETARIA DE SALUD
PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD HOSPITALARIA, 2001

Núm. de orden	Causas	Criterio de Agrupación	Defunciones	Tasa	%
	Total	000	37,282	2,500.8	100.0
1	Ciertas afecciones originadas en el período perinatal	163	6,892	462.3	18.5
	- Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el período perinatal	163I	2,611	175.1	7.0
2	Enfermedades del corazón	097	3,077	206.4	8.3
	- Enfermedades de la circulación pulmonar y otras enfermedades del corazón	097D	1,238	83.0	3.3
3	Diabetes mellitus	061	2,874	192.8	7.7
4	Tumores malignos	049	2,843	190.7	7.6
	- Leucemias	049A	429	28.8	1.2
	- Tumor maligno de la tráquea, de los bronquios y del pulmón	049J	261	17.5	0.7
	- Tumor maligno del cuello del útero	049O	226	15.2	0.6
5	Enfermedades del hígado	125	2,585	173.4	6.9
	- Enfermedad alcohólica del hígado	125A	1,165	78.2	3.1
6	Enfermedades cerebrovasculares	098	1,955	131.1	5.2
7	Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	165	1,657	111.2	4.4
	- Malformaciones congénitas del sistema circulatorio	165D	721	48.4	1.9
8	Accidentes	167	1,500	100.6	4.0
	- Accidentes de tráfico de vehículos de motor	167B	515	34.6	1.4
9	Influenza y Neumonía	105	1,368	91.8	3.7
10	Insuficiencia renal	139	1,015	68.1	2.7
11	Septicemia	015	942	63.2	2.5
12	Enfermedad por virus de la inmunodeficiencia humana (SIDA)	037	758	50.9	2.0
13	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	113	744	49.9	2.0
14	Desnutrición y otras deficiencias nutricionales	066	421	28.2	1.1
15	Tuberculosis pulmonar	002	391	26.2	1.1
16	Síndrome de dependencia del alcohol	069	340	22.8	0.9
17	Enfermedades infecciosas intestinales	001	336	22.5	0.9
18	Embarazo, parto y puerperio	157	269	18.0	0.7
19	Agresiones (homicidio)	169	196	13.2	0.5
20	Pancreatitis aguda y otras enfermedades del páncreas	127	177	11.9	0.5
	Paro cardíaco	997	0	0.0	0.0
	Síntomas, signos y hallazgos anormales clínicos y de laboratorio no clasificados en otra parte	998	598	40.1	1.6
	Las demás causas	999	6,344	425.6	17.0

Las causas que aparecen indentadas corresponden a desgloses de las 10 primeras causas y no se acumulan en el total del porcentaje - Tasa por 100,000 egresos

Fuente: INEGI/SSA, Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño