

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DETERMINACION DE LA INFLUENCIA DE DOS DETERGENTES
EN LA RECUPERACION DE OOQUISTES DE *Cyclospora cayetanensis*
DE VEGETALES Y FRUTAS CONTAMINADAS
EXPERIMENTALMENTE EN EL LABORATORIO.

Evelyn Yolanda Piedrasanta Estévez

Química Bióloga

Guatemala, octubre de 2003.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DETERMINACION DE LA INFLUENCIA DE DOS DETERGENTES
EN LA RECUPERACION DE OOQUISTES DE *Cyclospora cayetanensis*
DE VEGETALES Y FRUTAS CONTAMINADAS
EXPERIMENTALMENTE EN EL LABORATORIO.

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR

Evelyn Yolanda Piedrasanta Estévez

PARA OPTAR AL TITULO DE

Química Bióloga

Guatemala, octubre de 2003.

JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Dr. Federico Adolfo Richter Martínez	Vocal III
Br. Carlos Enrique Serrano	Vocal IV
Br. Claudia Lucía Roca Berreondo	Vocal V

DEDICATORIA

- A Dios Fuente de amor, sabiduría y paz.
- A la Virgen María Por ser siempre mi intercesora y mi modelo de mujer.
- A mis padres Luis Piedrasanta Ortiz y Yolanda Estévez de Piedrasanta
Gracias por la vida, su amor, su cariño, su apoyo y su confianza. Este es un pequeño reconocimiento de lo mucho que recibo de ustedes cada día.
- A mi esposo Marwin Estuardo Jiménez B.
Gracias por permitirme seguir adelante. Esto no es solamente el resultado de mi esfuerzo, es también el tuyo. Con todo mi amor.
- A mis hijos Luis Estuardo y Marwin Andrés
Gracias por ser la chispa que enciende mi vida. Esta es una prueba de que con mucho esfuerzo se pueden lograr metas. Los amo muchísimo.
- A mis hermanos y cuñada Luis Giovanni y María Isabel, Grettel María
Gracias por compartir cada día, cada paso, cada sueño. Ustedes saben lo mucho que los quiero.
- A mi abuelita Herminia Ortíz de Piedrasanta
Con mucho cariño.
- A mi familia, en especial Jorge y José Randolpho
Familia García Estévez
Familia Hernández Estévez
Ustedes saben lo que significan para mí. Gracias por su cariño y apoyo incondicional.
- A las familias Jiménez Bojórquez, Illescas Jiménez, Colindres Jiménez, Márquez Jiménez
Por hacerme sentir siempre parte de ustedes y por su cariño sincero.
- A mi grupo ECO Mónica y Jaime Patty y Julio
Omara y Jorge Luis Chaíto y Walter
Esta es otra oportunidad de compartir con ustedes mi alegría. Sé que siempre puedo contar con ustedes. Gracias.
- A mis amigos Claudia, Nelly, Carlos, Edna, Sucely, Ana Ruth, Izabel, Antonio (QEPD).
Gracias por su amistad sincera y por estar en los momentos importantes de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores

MSc. Rafael A. Pratdesaba

MSc. Mario A. González

Gracias por creer y confiar en mí. Gracias por su paciencia y toda la valiosa información que me brindaron, pero sobre todo gracias por su amistad.

A mis revisores

MSc. Karin L. Herrera

Lic. Martín Gil

Gracias por sus comentarios hacia mi trabajo.

Al Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)

Por permitirme realizar mi trabajo de tesis, y al personal de los Laboratorios de Microbiología y Virología “Dr. Leonardo Mata”, en especial a Ana Ruth de Burckhard, Claudia Mérida, Sucely Ixcot, Teresita Véliz, Zully Hernández, Faustina de Leiva.

A

MSc. Olga Torres de Matute

MSc. Jorge Matute

Por contribuir a hacer más valiosa esta investigación.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

INDICE

I.	Resumen	7
II.	Introducción	9
III.	Antecedentes	
	A. Generalidades	11
	1. Clasificación e historia	11
	B. Agente Etiológico	13
	C. Manifestaciones clínicas	14
	D. Histopatología	15
	E. Mecanismos de inmunidad	16
	F. Diagnóstico de laboratorio	16
	G. Tratamiento	17
	H. Epidemiología	18
	I. Asociación con agua y alimentos	20
	J. Diagnóstico en muestras de alimentos	22
IV.	Justificación	25
V.	Objetivos	26
VI.	Hipótesis	27
VII.	Materiales y métodos	28
VIII.	Resultados	35
IX.	Discusión de Resultados	47
X.	Conclusiones	49
XI.	Recomendaciones	50
XII.	Referencias	51
XIII.	Anexos	61

I. RESUMEN

Cyclospora cayetanensis es un patógeno recientemente descrito. Es un coccidio emergente, cuyo ciclo de vida, reservorios y su prevalencia en los humanos no ha sido sistemáticamente estudiada (1). Fue descrita por primera vez por Ashford en 1979 (2) y clasificada por Ortega *et al.* en 1994 (3). Este parásito puede causar gastroenteritis y produce varios síntomas entre los que se incluyen diarrea prolongada, pérdida de peso y fatiga que se hacen presentes entre una a cinco semanas (4, 5, 6). La diarrea responde a una terapia antibiótica a base de trimetopin-sulfametoaxole (4). Durante los años 1996 a 1998 fue asociado a brotes de diarrea en Estados Unidos y Canadá por consumo de vegetales y frutas frescas, especialmente frambuesas de Guatemala, por lo que las exportaciones de éstas han sido restringidas por la sospecha de que estén contaminadas por este coccidio (1), basándose únicamente en observaciones epidemiológicas. Esta medida trajo como consecuencia problemas económicos y desempleo en el país. Sin embargo, nadie pudo demostrar la presencia de ooquistes en las frutas.

El análisis para la detección de *C. cayetanensis* en alimentos es un procedimiento relativamente nuevo, en este estudio se utilizó el método de epifluorescencia (método estándar). Se conoce que la eficiencia de éste, depende de que los procedimientos de lavado y recuperación de ooquistes sean los adecuados (68). Se evaluaron tres diferentes vegetales (apio, lechuga, espinaca) y tres diferentes frutas (mora, frambuesa, fresa). A cada uno se le aplicó siete tratamientos diferentes: agua destilada (como método estándar), tres concentraciones de Laureato (0.5%, 1%, 2%) y tres concentraciones de Tween 80 (0.05%, 0.1%, 0.2%). A cada tratamiento se les agregó una cantidad conocida de ooquistes purificados de *C. cayetanensis* (2000 ooquistes/100 g de vegetal o fruta). Al momento de analizar las muestras se incluyó un control negativo y después de los lavados correspondientes se observó el sedimento por microscopía de epifluorescencia.

Por lo que al evaluar los dos diferentes detergentes (Laureato y Tween 80) contra el agua destilada (método estándar), se encontró que el agua destilada es la que demuestra la mayor tasa de recuperación de ooquistes (30.9%). También se observó

que mientras más alta sea la concentración del detergente, por ejemplo en Laureato 2% y Tween 80 0.2%, la tasa de recuperación de ooquistes es menor.

La tasa de recuperación de ooquistes entre las tres frutas analizadas no muestra tanta diferencia (24.75% – 25.88%), debido a que las estructuras físicas de éstas son similares y desprenden mucho debris al momento de realizar los lavados, pero en los tres vegetales analizados, la lechuga muestra la más alta tasa de recuperación (26.4% – 30.9%), debido a que su estructura es lisa en comparación del apio y la espinaca. Hay que tomar en cuenta que los ooquistes poseen un efecto de adherencia, por lo que si a esta característica se suman las estructuras físicas de los vegetales y las frutas, se vuelve muy difícil removerlos y recuperarlos, lo cuál se refleja en una baja en el porcentaje de recuperación de los mismos.

II. INTRODUCCION

Cyclospora cayetanensis es un patógeno humano recientemente descrito cuyos ooquistes son esféricos, miden de 8 a 10 μm de diámetro, son auto fluorescentes y alcohol ácido resistentes teñidos en Ziehl-Neelsen (1-3). Se conoce que los ooquistes esporulados son el estadio infectivo, siendo el humano el único hospedero conocido para este parásito (1-5).

Las infecciones por *Cyclospora* son del tipo estacional, coincidiendo generalmente con la época lluviosa y se han reportado casos en toda América, el Caribe, Inglaterra, este de Europa, Africa, India, el sudeste de Asia, Alemania y Australia (1, 2, 4, 5). Desde 1996 fue asociado con brotes de diarrea en Estados Unidos y Canadá por consumo de vegetales y frutas frescas, lo que causó que las exportaciones de frambuesas frescas de Guatemala hayan sido restringidas por la sospecha de que estén contaminadas por *Cyclospora cayetanensis*, por lo que los productores nacionales deben contar con una metodología de detección rápida y eficiente (4).

El análisis de muestras de alimentos para determinar la presencia de ooquistes de *C. cayetanensis* se realiza actualmente por dos metodologías diferentes: microscopía de epifluorescencia y análisis molecular por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (4 - 6). El FDA considera un resultado positivo para *C. cayetanensis* si tanto por epifluorescencia como por PCR el resultado es positivo (Ann Adams com. per.).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha revelado una sensibilidad de alrededor del 60-65 % siendo la posible causa de esa baja sensibilidad los inhibidores presentes en el jugo de frambuesas (1, 4). La microscopía de epifluorescencia, que es el método de referencia (método estándar), cuenta con el problema que debido a la estructura compuesta de la frambuesa, con drupeolos y vellos, sumado al efecto de adherencia que tienen los ooquistes los hacen difíciles de remover con los procedimientos de lavado existentes resultando en análisis falsos negativos. La tasa de recuperación de ooquistes de las frambuesas después del proceso de lavado es

alrededor del 10%. Se puede establecer entonces que el proceso de recuperación y extracción de ooquistes de la fruta es un factor limitante en el proceso de detección del PCR y que el procedimiento de lavado es el factor limitante en el método de microscopía de epifluorescencia (1).

En este estudio, se utilizó el método de microscopía de epifluorescencia, evaluando la tasa de recuperación de ooquistes al emplear agua destilada (método estándar)(4), Laureato (0.5%, 1%, 2%) y Tween 80 (0.05%, 0.1%, 0.2%) como soluciones de lavado, en vegetales y frutas previamente contaminadas en el laboratorio con cantidades conocidas de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*.

III. ANTECEDENTES

A. GENERALIDADES:

Cyclospora cayetanensis es un patógeno humano recientemente descrito, considerado como un microorganismo emergente (1). Se observó por primera vez en 1979, por Ashford que lo reportó como un coccidio parecido a *Isospora* en muestras de heces de personas infectadas en Papua, Nueva Guinea (7- 10). Se pensó inicialmente que era un alga azul verdosa, un coccidio no esporulado, o bien una especie de *Cryptosporidium* (11). Este organismo ha sido identificado en heces de pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes que presentan diarrea (12). En 1980, varios investigadores encontraron estructuras similares en muestras fecales de pacientes con diarrea y determinaron que este organismo era el agente causal (10). Fue identificado como un parásito unicelular conocido como cuerpos semejantes a cianobacterias o cuerpos semejantes a coccidios (coccidian like bodies -CLB's-) (10,13). Por su apariencia y sus características variables de tinción, en 1993, Ortega y colaboradores, caracterizaron estos cuerpos parecidos a coccidios (coccidian like bodies -CLB's-) como ooquistes pertenecientes a las especies de *Cyclospora* (12). En 1994, estas estructuras fueron designadas como *Cyclospora cayetanensis* (1,14).

1. Clasificación e Historia:

El reino protista propuesto por Haeckel, incluye el subreino Protozoa (protozoos y protozoarios) y sus cuatro Phyla: Sarcomastigophora (amebas y flagelados, Ciliophora (ciliados), Apicomplexa (protozoos con un estadio infectivo móvil que presentan un complejo apical) y Microspora (microsporidios) (15). El subphylum Apicomplexa se subdivide en diferentes clases: Sporozoea que incluye la subclase Coccidia y el orden Eucoccidiidae y el cual se subdivide en tres familias, incluyendo la familia Eimeriidae a la que pertenece *Cyclospora cayetanensis* (3).

Cyclospora es un patógeno intestinal emergente con relaciones de evolución no muy claras (16). La familia Eimeriidae comprende 16 géneros los cuales pueden distinguirse por el número de esporoquistes y esporozoitos dentro de los maduros dentro (1). Se ha demostrado por análisis filogenéticos que el género *Cyclospora* está

íntimamente relacionado con el género *Eimeria*, que infecta principalmente a los pollos (1,16). Esta relación permite el poder predecir la especificidad con el hospedero de *Cyclospora*, ciclo de vida (aún no bien definido) y epidemiología, así como el desarrollo de un ensayo específico de diagnóstico por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (1,5).

El género *Cyclospora* fue propuesto por Schneider en 1881, cuando estaba describiendo nuevas especies de parásitos coccidios de miriápodos (*Glomeris* sp) creando el género *Cyclospora* para el parásito *C. glomerica* (17). En 1870, Eimer había descrito este tipo de parásito en el intestino de topes y roedores (4,16).

A principios de 1979, se detectaron ooquistes en una muestra fecal de una niña con diarrea, que previamente se le había detectado *Isospora*, siendo este el primer caso de infección en humanos reportado por Ashford en Papua, Nueva Guinea, quien solamente describió el ooquiste del parásito (9). En 1986, se reportó un síndrome diarreico en cuatro pacientes inmunológicamente competentes, tres de ellos habían visitado Haití y uno México, en quienes el análisis coprológico reveló la presencia de numerosas estructuras de 8-10 um de diámetro con una pared celular exterior bien definida y abundante material granular intracelular (4,8). En 1990 un organismo similar fue asociado con diarrea en pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (9). En ese mismo año se reportaron ocho casos de personas con diarrea asociada a este organismo, el cual presentaba características similares a ooquistes de coccidios, pero al observarlos por microscopía electrónica, estos presentaban organelos tilacoides, presentes en las algas azul verdosas (18). Por esta razón, en 1991, se propuso el término de cuerpos parecidos a cianobacterias o cuerpos parecidos a coccidios (CLB's) para este organismo (19). Todos los CLB's obtenidos, se recolectaron y fueron sometidos a diferentes estudios, observándose organelos característicos de los coccidios, por lo que Ortega y colaboradores en 1992 lo clasificaron como perteneciente al género *Cyclospora* (10) nombrándolo *Cyclospora cayetanensis* en honor a la Universidad Cayetano Heredia en Lima, Perú, donde realizaron los diferentes estudios epidemiológicos (16,20).

B. AGENTE ETIOLOGICO:

El ciclo de vida para *Cyclospora cayetanensis* no está todavía debidamente descrito, al igual que los mecanismos de patogenicidad, rutas de transmisión, selección del hospedero y el reservorio natural (7,10,21). Se cree que su ciclo de vida (Fig.1) involucra ambas fases de proliferación (sexual y asexual) (5). *Cyclospora cayetanensis* es específica para los humanos, considerándole como único hospedero (4,12). En cortes histológicos del intestino de animales (entre los que se incluyen cerdos, conejos, patos, gallinas, ratas, gatos y aves silvestres), no se ha podido observar ningún estadio de *C. cayetanensis*, por lo que se considera que estos no son infectados (4), pero se cree que sí pueden actuar como vectores (22). En Guatemala, se realizó un estudio epidemiológico, donde se demostró que la presencia de gallinas y otras aves domésticas (patos y gansos) en el lugar desempeña un papel importante en el riesgo de infecciones (23), pero no se encontró relación con *Cyclospora cayetanensis* y se concluyó que está presente sólo en humanos (24).

Las personas infectadas con *C. cayetanensis* excretan ooquistes no esporulados en las heces, pero estos no son infectivos ya que requieren de condiciones ambientales favorables (temperatura y humedad) así como de 5 días a 2 semanas para esporular, y volverse infectivos (2,4,13,20,25,26). Cada ooquiste esporulado contiene 2 esporoquistes y cada esporoquiste contiene 2 esporozoitos (10,25,26) (Fig.2).

C. caryolitica esporula a temperatura ambiente entre 4 -5 días, mientras que *C. talpae* y *C. cayetanensis* requieren más o menos dos semanas (4). Este período que requiere el ooquiste para volverse infectivo, sugiere que la contaminación de fruta fresca ocurre solamente con ooquistes completamente esporulados y ya que los ooquistes no esporulados requieren de un tiempo y condiciones óptimas del ambiente para esporular, la vida de anaquel de la fruta fresca puede expirar antes que estos ooquistes se vuelvan infectivos (4).

La transmisión de *C. cayetanensis* directamente de una persona infectada a otra, se ha descartado ya que la infección es causada solamente por ooquistes esporulados (12,14). Sin embargo, la transmisión indirecta sí puede ocurrir y aunque no se sabe con exactitud la dosis de infección, se presume que es considerablemente

baja, de 10 a 100 ooquistes (2,4,27). Se ha demostrado en estudios preliminares que el 40% de los ooquistes preservados en dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 2.5% a temperatura ambiente (25-32 °C), presentan una esporulación completa entre 5 y 13 días (4,10,16). Los ooquistes mantenidos a 4 °C retardan su esporulación, hasta 6 meses, mientras que los ooquistes sometidos a temperatura de – 20 °C durante 24 horas y los que son sometidos a 60 °C durante una hora, no pueden inducir la esporulación (25). Estos ensayos refuerzan el rechazo a la posible transmisión directa de este microorganismo (2).

C. MANIFESTACIONES CLINICAS:

Las manifestaciones clínicas de la ciclosporiasis incluyen cuadros típicos de diarrea acuosa prolongada con evacuaciones frecuentes siendo de 3 ó más veces al día, sin presencia de moco o sangre, algunas veces explosivas y con tendencia a ser recurrentes (5,14,28-30). Otros síntomas presentes son anorexia, pérdida de peso, distensión abdominal, flatulencia, calambres abdominales, náusea, vómitos, dolor muscular, fiebre (en el 25 por ciento de los casos), mialgia y fatiga extrema (12,13,27-32).

Las personas infectadas con *C. cayetanensis* presentan un período de incubación que va de 2 a 11 días, con promedio de una semana (12 - 14). La infección puede durar desde 1 a 4 semanas (12,33) y se han observado remisiones y relapsos después de 4 semanas de superada la infección (19).

En pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se han diagnosticado enfermedades biliares asociadas con infecciones por *C. cayetanensis* como otra manifestación clínica importante (34). En países en desarrollo, en donde la enfermedad es endémica, la frecuente exposición puede resultar en inmunidad adquirida que se incrementa con la edad y por lo tanto, predisponer a infecciones asintomáticas en niños y a la ausencia de la infección en adultos (24), así como a la existencia de personas infectadas asintomáticas (13, 29). En estos lugares solamente el 30 por ciento de los niños infectados presenta diarrea, en contraste con los adultos inmunodeficientes en quienes la infección es constantemente asociada con diarrea que

puede durar más de un mes, particularmente sin tratamiento, siendo el tratamiento de elección Trimetopim-sulfametozaxole (SXT) (13, 14, 35).

Las manifestaciones clínicas de la cyclosporiasis son comunes y por lo tanto no puede distinguirse clínicamente de otras infecciones diarreicas causadas por microorganismos como: *C. parvum*, *I. belli*, *Giardia lamblia* y microsporidios (5, 36).

D. HISTOPATOLOGIA:

En aspirados de yeyuno realizados a personas infectadas con *C. cayetanensis* se han observado ooquistes (29). Exámenes de biopsias del yeyuno muestran una inflamación de leve a moderada de la lámina propia y alteraciones de la superficie epitelial con varios grados de atrofia que comprenden: desprendimiento y fusión de las vellosidades o acortamiento y ensanchamiento de las mismas, infiltración linfocítica de la lámina propia y un incremento en el número de linfocitos intraepiteliales (7, 32, 37). En algunos pacientes se observó un aumento en la eosinofilia extratisular y la formación de matriz fibrosa dentro del vello desordenado (32).

Al final del lumen en el citoplasma de las células epiteliales, se localizaron vacuolas parasitóforas conteniendo formas asexuales y sexuales de *C. cayetanensis* (7, 38). Por microscopía de luz se observaron dos tipos de merontes (tipo I y tipo II) completamente desarrollados (forma asexual). Los merontes tipo I poseían de 8 a 12 merozoitos completamente maduros. Los merontes tipo II poseían 4 merozoitos bien diferenciados. También se observaron gametocitos (forma sexual) del parásito. Los merozoitos de ambos tipos de merontes poseían estructuras características de los coccidios, roptrias, micronemas y núcleo. La observación microscópica fue corroborada por microscopía electrónica (32).

La presencia de estos dos tipos de merontes y estadios sexuales así como la presencia de merontes asexuales en enterocitos del yeyuno en muestras de biopsias de pacientes infectados excretando ooquistes, confirman que el ciclo de vida puede ser completado en un solo hospedero: el humano (32, 38).

Debido a que *C. cayetanensis* infecta los enterocitos del intestino delgado, las personas infectadas tienen una absorción reducida de vitamina B12 y xilosa tanto como una elevada excreción de materia fecal. Todavía no está definido qué proporción de las personas infectadas desarrolla estas anomalías (16, 25, 38).

E. MECANISMOS DE INMUNIDAD:

Ciertos estudios realizados sugieren que la baja prevalencia de este microorganismo observada en países endémicos se debe a la frecuente exposición a éste desde niños (24). El pico máximo de infección se observa en niños entre 2 y 4 años y no es detectable en niños mayores de 11 años ni en adultos que viven en regiones endémicas (24, 39). Se desconoce si hay algún tipo de relación con la defensa inmunológica que proveen las madres a sus niños por medio de la lactancia materna antes de los 2 años, que haga que las infecciones por *C. cayetanensis* no los afecten o posiblemente el riesgo de exposición aumente al disminuir los anticuerpos maternos proporcionados y al cambiar su tipo de alimentación y actividades (24, 39). Por estas razones, se sugiere que la inmunidad a *C. cayetanensis* puede ser adquirida (24, 39).

F. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO:

El diagnóstico de laboratorio se basa en la identificación del microorganismo por medio del examen microscópico de una preparación en fresco de muestras de heces. En éstas donde se observan estructuras que posean las características morfológicas de los ooquistes de *C. cayetanensis*: esferas no refráctiles, que contienen citoplasma no definido o glóbulos refráctiles que miden de 8 a 10 μ m de diámetro (14,40,41)(Fig.2). Para maximizar la recuperación de ooquistes, ya que la cantidad de estos en las heces es muy pequeña, se hace necesario la concentración de los mismos, utilizando procedimientos de concentración como lo son: la técnica de flotación de Sheather y la técnica de formalina-acetato de etilo (Procedimiento de Ritchie) (40 - 43). Sin embargo, para una identificación definitiva se utilizan diferentes métodos de tinción (14), al utilizar la tinción de Ziehl-Neelsen modificada, la técnica más utilizada en los laboratorios, los ooquistes de *Cyclospora* se muestran como ácido-resistentes variables, ya que pueden teñirse perfectamente o no, con una coloración desde rosado claro hasta rojo profundo

(40). Utilizando la técnica de safranina, los ooquistes se tiñen uniformemente, presentado una coloración rojo-naranja brillante si las preparaciones son calentadas en un microondas durante la tinción (44)(Fig.3).

Aunque los ooquistes de *Cyclospora* son observados fácilmente por microscopía de contraste de fases, la microscopía de epifluorescencia es una técnica sensible, en la cual la autofluorescencia de los ooquistes es una característica útil y distinguible, autofluorescen de color azul si se utilizan filtros de excitación entre 330 - 380 nm (365 nm) y verde con filtros a 450 - 490 nm (2, 40, 45). El tamaño de los ooquistes (8 a 10 um) es un criterio importante que no se debe olvidar en la identificación de este microorganismo, no importando la técnica que se emplee, ya que ayuda a establecer el diagnóstico correcto (16).

Además de la microscopía, actualmente se desarrolló un método molecular de PCR, para tamizar las muestras de heces y confirmar aquellos resultados positivos obtenidos por microscopía. El método de PCR detecta y amplifica una región del gen ribosomal rRNA 18S de *Cyclospora* sp. Y es un ensayo altamente específico y sensible (3, 46, 47). Actualmente se ha desarrollado un protocolo de PCR basado en filtros de extracción de ADN. Estos filtros están impregnados con desnaturalizantes, agentes quelantes y radicales libres, que causan lisis por contacto a la gran mayoría de las células y secuestran el ADN dentro de su matriz. Los residuos son fácilmente removidos por lavados con diferentes buffers y los filtros son utilizados para el análisis por PCR. Este método ha detectado de 10 a 30 ooquistes de *C. cayetanensis* en 100 g de frambuesas (48, Orlandi P. com. per.).

G. TRATAMIENTO:

El tratamiento consiste principalmente en medidas de soporte y el mantenimiento de una adecuada rehidratación (flúidos y equilibrio electrolítico), así como el alivio de los síntomas y una correcta terapia antibiótica (5, 16).

Las infecciones con *C. cayetanensis* pueden ser exitosamente tratadas con Trimetopim-sulfametoxazole (SXT), el cual se ha comprobado es el único antibiótico disponible que es realmente efectivo en la erradicación de este microorganismo (6, 21,

49 - 51). Es importante hacer notar que en pacientes con VIH, se utiliza actualmente este medicamento como un tratamiento profiláctico (14, 24, 36, 49).

H. EPIDEMIOLOGIA:

Las infecciones por *C. cayetanensis* han sido confirmadas en toda América, el Caribe, Reino Unido, Europa del Este, África, Bangladesh, Pakistán, Nueva Guinea, Indonesia, Medio Oriente, el subcontinente de la India, el sur-este de Asia y Australia (5, 8,9,31,38,52- 54). En Estados Unidos, Inglaterra y Australia, fueron observados casos en personas que habían viajado a diferentes áreas endémicas de países en vías de desarrollo y la mayor cantidad de brotes por *C. cayetanensis* en Estados Unidos y Canadá están asociados a eventos sociales en los que se ingirieron “berries” (frambuesas, moras, fresas) o alimentos que las tuvieran como ingrediente principal (55, 57).

Aunque las infecciones por *Cyclospora* han sido documentadas en humanos alrededor del mundo desde 1979 (7), ha sido solamente en los últimos años que este parásito ha empezado a ser relevante, como resultado de los brotes por contaminación de alimentos en los Estados Unidos y Canadá (21), por lo que actualmente, *C. cayetanensis* se ha descrito como la nueva bomba biológica (58).

Aunque no se conocen todavía a profundidad las rutas de transmisión, las postuladas que incluyen la ingestión de alimentos especialmente frutas, vegetales frescos y el agua de beber, se consideran como las causantes de la transmisión de la infección (5,17,14,19,51,58 - 61). La transmisión directa (contacto persona a persona) se ha descartado por la necesidad de diferentes condiciones ambientales ideales para que el ooquiste se vuelva infectivo (2,4,20,25,26,40).

Antes de 1995 *C. cayetanensis* fue reportado como un agente causal de gastroenteritis en niños que vivían en condiciones de pobreza extrema y pocas condiciones sanitarias (12,39) y en adultos que viajaban a países endémicos (21,28,62 - 64). La prevalencia de infecciones en estos países va desde 1.1% hasta 5% (23,24,39,65); sin embargo, se observó una incidencia hasta del 12 por ciento tanto en

niños como en adultos extranjeros que vivían en regiones endémicas en ciertas épocas del año (18,39). Existe una prevalencia baja reportada en pacientes con VIH en Norte América y Europa en comparación con los países en desarrollo, debido al uso de Trimetopim-sulfametoxazole (antibiótico de elección en la infecciones por *C. cayetanensis*) como profiláctico en las infecciones por *Pneumocystis carinii* (4, 36).

La cyclosporiasis presenta una marcada estacionalidad coincidiendo con la estación calurosa y lluviosa, observada en países endémicos en donde se ha realizado la mayor cantidad de estudios epidemiológicos (4,12,14,18,35,37,40,59), ya que en invierno, su prevalencia disminuye tanto, posiblemente porque el descenso en la temperatura del ambiente, no favorece la esporulación del protozoo (12,24,59). Se ha observado que la diferencia en las áreas geográficas puede resultar en distintas formas de estacionalidad que presenta *C. cayetanensis*; así Nepal y Guatemala, que se encuentran en el mismo plano ecuatorial, presentan infecciones en los meses de abril a agosto, con un pico máximo en los meses de mayo y junio que coincide con la época lluviosa para estos países (4,12,23,37,66,67). En Perú, casi todas las infecciones ocurren durante los meses de diciembre a julio (verano en ese país), con un pico máximo en abril y junio; es extremadamente raro que se reporten infecciones en cualquier otra época del año (12,24,68). Sin embargo, en Haití, otro país endémico para *C. cayetanensis*, los meses pico son enero a marzo que son los meses fríos del año, debido a que las temperaturas de verano son tan elevadas que se consideran un factor crítico en la sobrevivencia de los ooquistes de este parásito (27). Se podría creer, según estas observaciones, que las fluctuaciones de temperatura son el factor predominantemente asociado con las prevalencias de infecciones de *Cyclospora* (27).

Muy pocos estudios epidemiológicos se han realizado en Guatemala y ninguno prospectivo a lo largo de las estaciones lluviosas. El primer caso de infección por *C. cayetanensis* fue descrito por Tamara Velásquez en 1991 (69). Entre 1996 y 1997, se realizaron estudios de prevalencia de este parásito en pacientes con SIDA, obteniéndose un 12% y 17% respectivamente (66,67). En uno de estos estudios, se incluía una población pediátrica menores de 5 años, quienes también presentaron una prevalencia del 17% (66,67). En 1998, un estudio epidemiológico reportó una prevalencia de 3.5% en niños entre 1.4 y 4 años y 3.8% en niños entre 5 y 9 años, con

un drástico aumento en la prevalencia de casos en niños entre 1.5 y 9 años (19%), al inicio de la época lluviosa (23).

I. ASOCIACION CON AGUA Y ALIMENTOS:

Debido a que las rutas de transmisión no han sido totalmente identificadas para *C. cayetanensis*, ciertos datos epidemiológicos sugieren dos vías de contaminación que son la ingestión de agua y alimentos que posean ooquistes de *C. cayetanensis* (59).

En 1995, se reportó un brote de ciclosporiasis en el personal de un Hospital de Chicago. La infección fue asociada epidemiológicamente con el consumo de agua de un grifo posiblemente contaminado con agua estancada de un depósito de reserva que se encontraba en el techo del hospital (70). En un caso aislado, que también ocurrió en Chicago, un niño de 8 años presentó un cuadro de diarrea y empezó a excretar ooquistes en sus heces de un coccidio todavía no identificado, después de haber nadado en el lago Michigan (55) y en Utah un hombre presentó diarrea acuosa después de haber limpiado su sótano, el cual se había inundado con aguas residuales posterior a una fuerte tormenta (71).

En Nepal, dos brotes de infección por *Cyclospora* también fueron atribuidos a agua contaminada. El primero ocurrió en un grupo de refugiados durante el verano de 1992, por ingerir agua no tratada y leche reconstituida con esa agua. El segundo fue en soldados británicos, supuestamente debido a la mala cloración del agua. Sin embargo, en este brote, los ooquistes del parásito fueron identificados por primera vez en el agua que se estaba usando para beber (supuestamente potable) la cual era una mezcla de agua de río y agua municipal (59,72).

La transmisión de *C. cayetanensis* por alimentos fue sugerida por primera vez en 1995 cuando un piloto aviador sufrió diarrea en un vuelo entre Haití y Miami y este se asoció a la comida preparada en una cocina de Haití y llevada a bordo (73). Ya que *C. cayetanensis* es endémico en Haití, y se sugirió que este tipo de infección podría ser adquirida en comidas que se lleven a bordo de aviones, sin necesidad de visitar un país endémico (73).

En Estados Unidos, fue reportada por primera vez en 1995 (70,74) y ampliamente reportada en 1996 y 1997 (74-81). En 1996, en reportes preliminares, se implicó el consumo de fresas como fuente de contaminación, pero después de reunir datos epidemiológicos la atención cambió drásticamente al consumo de frambuesas (75,76).

En 1996, en Estados Unidos, de un total de 1465 casos de diarrea, sólo se pudieron documentar 740 casos donde las personas recordaban haber ingerido algún tipo de fruta (frambuesas y fresas) en algún evento social y estas frutas fueron parte del buffet (76). Datos bien documentados implican a las frambuesas como fuente de transmisión de *C. cayetanensis* en 29 eventos, de los cuáles en 21 eventos, después de un rastreo epidemiológico, se concluyó que la fuente eran frambuesas de Guatemala (77). En 1997, se reportaron otros 1450 casos de ciclosporiasis, 550 de ellos confirmados en el laboratorio (81). Muchos de los casos fueron fuertemente asociados por epidemiología e involucraban nuevamente a las frambuesas importadas de Guatemala (82).

Aunque las frambuesas importadas de Guatemala han sido asociadas con los brotes de ciclosporiasis en Estados Unidos durante tres años consecutivos desde 1996, a la fecha no se ha podido comprobar la presencia de ooquistes de *C. cayetanensis* en las mismas. Sin embargo, éste sí ha sido aislado de vegetales cosechados en regiones endémicas de Perú y Nepal (68,83).

Después de las implicaciones de 1996 y 1997, el gobierno y la Comisión de Bayas de Guatemala informaron al Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y a la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) que voluntariamente suspenderían las exportaciones de frambuesas a Estados Unidos (84-86). En 1997, una comisión de la FDA representada por los Drs. Ann Adams y Eugene LeClerc visitaron los laboratorios del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), en donde conjuntamente con el MSc. Mario González trabajaron en la implementación de la metodología y búsqueda de *C. cayetanensis* en muestras de frambuesas de las fincas exportadoras. En esta ocasión no se encontraron ooquistes de *C. cayetanensis* en ninguna de las muestras analizadas (González M. com.pers.).

Ese mismo año, la Asociación Gremial de Productos no Tradicionales de Guatemala (AGEXPRONT), implementó un Plan Modelo de Excelencia para mejorar las condiciones sanitarias que se manejaban en las fincas; dejando solamente 5 fincas certificadas para poder exportar (Flores L. com. per.). A pesar de esto, en 1998, las frambuesas de Guatemala estuvieron implicadas en un nuevo brote de ciclosporiasis en Ontario, Canadá (87), por lo que nuevamente fueron suspendidas las exportaciones a Estados Unidos y Canadá (88,89).

En un estudio realizado en pequeños mercados de los suburbios periurbanos de Perú, durante las estaciones de alta y baja incidencia, fueron muestreados varios vegetales entre los que se encuentran puerros, hierbabuena, brócoli, apio, cebolla, lechuga, cilantro, perejil, albahaca, espinaca, rábanos, arvejas, repollo, chile pimiento. Este estudio tenía dos finalidades: Una, demostrar la presencia de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* y *C. cayetanensis* en vegetales expendidos en los mercados urbanos de Perú y la otra demostrar experimentalmente que el lavado de vegetales no remueve por completo los ooquistes de *C. parvum* y *C. cayetanensis*. Se encontró que el repollo, la lechuga, perejil, cebollas y puerros estaban contaminados con *C. parvum*. La lechuga y la hierbabuena estaban contaminadas con ooquistes de *C. cayetanensis*. En la inoculación experimental de vegetales se encontró que se recuperaba del 13-15% ciento del inóculo original (100 ooquistes/100 ul) de *C. cayetanensis* y 25-35% del inóculo original (100 ooquistes/100 ul) de *C. parvum* (68), demostrándose así que el lavado no remueve los ooquistes por completo.

J. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO EN MUESTRAS DE ALIMENTOS:

El análisis para la detección de *C. cayetanensis* es un procedimiento relativamente nuevo. Actualmente, se han desarrollado métodos para detectar e identificar ooquistes de *Cyclospora* en muestras de alimentos y agua: Microscopía de epifluorescencia, PCR y el protocolo de PCR basado en filtros de extracción de ADN (4-6, 48).

En contraste con las muestras clínicas, el número de ooquistes presentes en las muestras de alimentos es considerablemente bajo y la inexistencia de protocolos de

enriquecimiento para este parásito han hecho que los métodos de detección sean deficientes (1,4). La eficiencia de los métodos de análisis, en este caso, depende de los procedimientos de recuperación de ooquistes y de los procedimientos de lavado (68).

Los procedimientos de lavado han sido modificados por varios laboratorios en un esfuerzo de aumentar la recuperación de ooquistes. Sin embargo, en experimentos comparando agua destilada y diferentes soluciones de detergentes (1x Tris-EDTA, pH 7.4 con 0.1% de Laureato 12 (PPG Industrial), o dodecilsulfato de sodio con Tween 1%), no se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de recuperación (4), por lo que el agua destilada sigue siendo la solución de elección (4,68). Por lo que se utilizarán Laureato y Tween 20 en tres concentraciones diferentes (R. Pratdesaba com. per.).

La microscopía de epifluorescencia es el método estándar hasta la fecha. Las láminas fijas y la observación de frotos teñidos con la coloración de Kinyoun modificado no son aceptables para el análisis de muestras de alimentos, debido a que otros componentes presentes en el sedimento tales como polen, hongos, mohos, otros organismos y cualquier otro artefacto puede interferir en la detección de los ooquistes y generar resultados falsos-positivos (4).

La microscopía de epifluorescencia en donde se analizan preparaciones en fresco de las muestras de alimentos es un método mucho más sensible y requiere de la observación microscópica de toda la preparación, la cual es sellada con silicona, para prevenir la desecación de la muestra. Los ooquistes de *Cyclospora* son esféricos, miden de 8-10 μm de diámetro y autofluorescen de color azul con un filtro de excitación dicróico entre 330-380 nm (365 nm), sin embargo, siempre es necesario corroborar su presencia utilizando la microscopía de luz visible para observar sus estructuras internas características (4).

En análisis de alimentos es de suma importancia verificar la presencia de ooquistes de *Cyclospora* ya que los ooquistes de *Eimeria*, que es otro coccidio no patógeno en humanos y estrechamente ligado al género *Cyclospora*, ha sido aislado de muestras de frambuesas (1,3,4,6,90). Por esta razón, es necesaria la aplicación de

otros métodos que confirmen la presencia de ooquistes de *Cyclospora* en muestras de alimentos.

El método de PCR para la detección del gen rRNA 18S de *Cyclospora* sp. Desarrollado por Relman *et al.* (3) y Yoder *et al.* (46) provee un ensayo altamente específico y sensible que puede ser aplicado a una gran variedad de muestras de alimentos. La ventaja de este método de PCR sobre otros métodos de detección es su alta especificidad y que no produce amplificación de fragmentos de otras especies de coccidios relacionados (2). Actualmente se ha desarrollado un protocolo de PCR basado en filtros de extracción de ADN, los cuales están impregnados con desnaturalizantes, agentes quelantes y radicales libres que causan lisis por contacto a las células y secuestran el ADN dentro de su matriz. Los residuos son fácilmente removidos por lavados con diferentes buffers y estos filtros son utilizados para el análisis por PCR. Este método ha detectado de 10 a 30 ooquistes de *C. cayetanensis* en 100 g de frambuesas (48, Orlandi P. com. per.).

IV. JUSTIFICACION

Guatemala es un país que cuenta con diversidad de vegetales y frutas debido a la variedad climática que posee. Por esta razón, el país tiene la capacidad de exportar gran cantidad de productos lo que genera crecimiento económico y empleo.

Entre los productos de exportación están las frambuesas, las que recientemente han sido asociadas con brotes de diarrea en Estados Unidos causados por *Cyclospora cayetanensis*. Hasta la fecha no ha sido posible demostrar la presencia de ooquistes de *C. cayetanensis* en frambuesas de Guatemala, por lo que la evidencia que apoya esta restricción es únicamente epidemiológica (10,11).

El reconocimiento de *C. cayetanensis* como un patógeno importante asociado con alimentos ha generado un gran interés en la búsqueda de una metodología diagnóstica apropiada para su identificación. El procedimiento de análisis de muestras de alimentos para determinar la presencia de *C. cayetanensis* es relativamente nuevo. Actualmente se realiza por medio de microscopía de epifluorescencia y análisis molecular por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (1,13,14).

En este estudio se utilizó el método de epifluorescencia, evaluando la tasa de recuperación de ooquistes al emplear Laureato (0.5%, 1%, 2%) y Tween 80 (0.05%, 0.1%, 0.2%), ambos detergentes, no maximizan la recuperación de ooquistes de *C. cayetanensis*, en comparación con el método estándar en donde se emplea agua destilada (1). Además se comparó el efecto de adherencia de los ooquistes en diferentes superficies físicas de diferentes vegetales y frutas, después del proceso de lavado, lo que se evaluó por el método de epifluorescencia.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL:

Mejorar la eficiencia en la recuperación de ooquistes, ensayando con diferentes soluciones de lavado.

B. ESPECIFICOS:

1. Purificar y cuantificar ooquistes de *C. cayetanensis* provenientes de heces fecales contaminadas.
2. Evaluar la tasa de recuperación de ooquistes al emplear Laureato, Tween 80 y agua destilada como soluciones de lavado.
3. Comparar la efectividad de Laureato y Tween 80, en tres concentraciones diferentes, para maximizar la recuperación de ooquistes de *C. cayetanensis* de vegetales y frutas contaminadas experimentalmente en el laboratorio.
4. Comparar diferentes superficies físicas de vegetales y frutas, evaluar la adherencia de ooquistes a éstas.

VI. HIPOTESIS

La utilización de los detergentes Laureato y/o Tween 80 en el proceso de lavado, maximizan la recuperación de ooquistes de *C. cayetanensis* a partir de diferentes vegetales y frutas contaminados en el laboratorio .

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de Trabajo

Vegetales (espinaca, lechuga, apio) y frutas (fresas, moras, frambuesas) contaminadas en el laboratorio con una alta concentración de ooquistes purificados de *Cyclospora cayetanensis*.

B. Recursos

1. Recursos Humanos:

M. Sc. Rafael Pratdesaba (asesor)

M. Sc. Mario González (asesor)

M. Sc. Olga Torres de Matute (co-asesor)

Br. Evelyn Yolanda Piedrasanta Estévez (tesista)

2. Recursos Institucionales:

Laboratorio de Microbiología Dr. Leonardo Mata del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)

Asociación Gremial de Exportadores de Productos no Tradicionales (AGEXPRONT).

3. Recursos Físicos:

a. Material de Laboratorio

Botellas de vidrio de 50, 100, 500, 1000 mL.

Probetas 100, 500, 1000 mL.

Bolsas plásticas para alimentos

Cucharas plásticas para alimentos

Espátula

Toallas de papel

Beakers 100, 500, 2000 mL.
Pipetas Pasteur estériles
Pipetas plásticas desechables
Micropipetas de 20-200 uL, 50-250 uL, 100-1000 uL.
Tips amarillos sin filtro
Tips azules sin filtro
Pipetor automático
Tubos cónicos Falcon de 15 mL.
Tubos cónicos Falcon de 50 mL.
Mechero
Gradilla
Recipientes de plástico
Porta-objetos
Cubre-objetos
Grasa de silicone
Pintura de uñas transparente
Frambuesas frescas
Moras frescas
Fresas frescas
Lechugas frescas
Apios frescos
Espinacas frescas
Contador de células

b. Reactivos:

Formalina salina
Acetato de etilo
Dicromato de potasio al 2.5%
Carbol-Fuschina
Azul de metileno
Alcohol ácido
Lugol
Cloruro de cesio (CsCl)

Tris (2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanodiol)
EDTA (ácido etilendiamintetraacético)
PBS pH 7.4
Percoll
Agua bidestilada
Agua destilada estéril
Solución salina 0.85%
Etanol 70%
Cloro 3%
Tween 80
Laureato

c. Equipo:

Balanza
Vortex
Plataforma de rotación
Microscopio de luz
Microscopio de epifluorescencia
Centrífuga refrigerada para tubos cónicos de 50 mL.
Centrífuga para tubos cónicos de 15 mL.
Refrigeradora

C. Métodos

1. Análisis de muestras de heces para la búsqueda de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*.

Analizar muestras de heces provenientes de diferentes centros asistenciales, el número de muestras no es relevante, pues lo que interesa es la obtención de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*.

Realizar el procedimiento de Ritchie a cada una de las muestras, el cual consiste en: Transferir una pequeña porción de la muestra a tubos Falcon de 15 mL.;

agregar 8 mL. De formalina salina y 4 mL. De acetato de etilo. Agitar vigorosamente durante 30 segundos. Centrifugar a 2000 RPM durante 5 minutos y observar en el tubo la formación de diferentes fases. Con un palillo, raspar las paredes del tubo y decantar el sobrenadante; luego, limpiar las paredes del tubo con un hisopo y agregar 1 mL. De formalina salina al sedimento. Homogenizar la muestra.

Realizar un frote del sedimento utilizando la tinción de Kinyoun modificado y observarlo en microscopía de luz en 10x y 40x. Realizar dos preparaciones en fresco de la muestra en formalina salina y lugol para observación por microscopía de luz y confirmando en epifluorescencia.

Preservar las muestras positivas para *C. cayetanensis* en dicromato de potasio al 2.5%.

2. Purificación de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* con gradientes de cloruro de cesio (CsCl).

Las muestras que se utilizan son las de heces positivas para *C. cayetanensis* preservadas en dicromato de potasio al 2.5%.

Realizar un recuento inicial de ooquistes, en un frote teñido con Kinyoun modificado, observándolo por microscopía de luz (40X) y confirmando por epifluorescencia.

Preparar una solución stock de CsCl (2 g. de CsCl por mL. de agua bidestilada) y un buffer de CsCl que contiene 500 mL. De agua bidestilada, 3.03 g. de Tris y 1.86 g. de EDTA. A partir de esto se preparan 3 soluciones de trabajo; Solución A: solución stock diluida 1:2 con el buffer; Solución B: Solución A diluida 1:3 con el buffer; Solución C: Solución A diluida 1:7.5 con el buffer.

Preparar los gradientes en tubos cónicos Falcon de 50 mL. Con las soluciones A, B y C, más la muestra de heces diluída en buffer PBS en una relación 1:3. Centrifugar a 5000 RPM durante 3 horas.

Remover la banda de ooquistes (aproximadamente 2-3 cms. arriba del sedimento o pellet) con una pipeta Pasteur con sumo cuidado y transferirla a un tubo cónico de 50 mL.; diluir 1:2 con agua bidestilada, centrifugar nuevamente a 5000 RPM durante 10 minutos.

Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL. De agua bidestilada para transferirlo a tubos Eppendorf debidamente identificados.

Centrifugar los tubos Eppendorf a 5000 RPM durante 3 minutos. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 0.5 mL. de PBS y 0.5 mL. De Percoll/PBS al 40%, el cuál se agrega cuidadosamente.

Centrifugar a 10000 RPM durante 5 minutos.

Lavar el pellet (ooquistes obtenidos) dos veces con agua bidestilada diluida en PBS 1:2 y centrifugar a 5000 RPM durante 5 minutos. Dejar los ooquistes resuspendidos en 500 uL de agua bidestilada/PBS 1:2 y guardar a 4° C para su utilización posterior.

3. Contaminación de muestras de alimentos

Preparar bolsas plásticas para análisis de alimentos debidamente identificadas. Utilizar 8 bolsas por cada ensayo para cada vegetal y/o fruta a analizar: Un control negativo, 1 para lavado con agua destilada, 3 para diferentes concentraciones de Tween 80 (0.05%,0.1% y 0.2%) y 3 para diferentes concentraciones de Laureato (0.5%,1% y 2%).

Pesar 100 g del vegetal (espinaca, apio, lechuga) o fruta (fresa, mora, frambuesa) a analizar y colocar en las bolsas.

Inocular con 2000 ooquistes las bolsas (exceptuando la del control negativo), dejar las bolsas ya inoculadas a temperatura ambiente por 24 horas.

4. Procedimiento de recuperación de ooquistes: Centrifugación

Al cumplirse las 24 horas de exposición, agregar a cada bolsa lo siguiente:

Bolsa 1 Control negativo: 100 mL agua destilada

Bolsa 2 Control positivo: 100 mL agua destilada

Bolsa 3: 100 mL Laureato 0.5%

Bolsa 4: 100 mL Laureato 1%

Bolsa 5: 100 mL Laureato 2%

Bolsa 6: 100 mL Tween 80 0.05%

Bolsa 7: 100 mL Tween 80 0.1%

Bolsa 8: 100 mL Tween 80 0.2%

Homogenizar bien y dejar a temperatura ambiente por 20 minutos. Colocar las bolsas en una plataforma de agitación a 100 RPM durante 20 minutos (10 minutos cada lado de la bolsa).

Transferir el sobrenadante a tubos cónicos de 50 mL y centrifugar a 3000 RPM durante 20 minutos. Descartar el sobrenadante y agregar al pellet obtenido una cantidad equivalente de agua destilada.

Guardar los pellets a 4° C para su análisis posterior.

5. Método de detección: Análisis por microscopía de epifluorescencia

Preparar las láminas de la manera siguiente:

Agregar a toda la orilla de un cubre-objetos grasa de silicone (se puede utilizar pintura de uñas transparente también), con la ayuda de un tip. Colocar el cubre-objetos sobre un papel absorbente o servilleta y agregar 10 uL del sedimento a observar en la parte de arriba del cubreobjetos. Colocar encima un porta-

objetos y presionar suavemente; obteniendo así los montajes de las preparaciones a observar.

Observar las preparaciones bajo luz UV a 400x. Los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* fluorescen azul intenso con un filtro de excitación entre 330-380 nm (365 nm), por microscopía de luz visible se puede verificar la presencia de estructuras internas características. Observar las preparaciones en su totalidad para realizar el recuento de ooquistes de *C. cayetanensis*.

D. Diseño Experimental

1. Análisis de Resultados

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) utilizando para ello el programa SAS, versión 6 a través de su modelo PROC GLM.

Posteriormente al análisis ANDEVA, se realizó la Prueba de Duncan y Test de Hipótesis.

VIII. RESULTADOS

Previo a la realización de cada uno de los ensayos se realizó una pequeña investigación en diferentes centros asistenciales, con el fin de encontrar una muestra positiva para *C. cayetanensis*. Se analizaron un total de 256 muestras (la cantidad no era relevante), solo cinco fueron positivas, de las cuales solo una fue útil para la purificación por medio de gradientes de cloruro de cesio, para obtener una considerable cantidad de ooquistes purificados, necesarios para la posterior inoculación en los ensayos. La muestra original eran 1000 mL, después de colarla en gasa y lavarla con agua destilada, se obtuvieron 103.5 mL de muestra limpia, a la cual se le agregó dicromato de potasio en una relación 1:2, para guardarla en refrigeración, teniendo un volumen final de 207 mL. De esta muestra se tomaron 10 mL para realizar la primera purificación y se obtuvieron al final 230,500 ooquistes purificados. Para hacer el conteo de ooquistes, se procedió según se describe en la sección C. de materiales y métodos.

Se evaluaron tres vegetales diferentes (lechuga, apio, espinaca) y tres frutas diferentes (fresa, mora, frambuesa), cada muestra se analizó con siete soluciones de lavado: tres concentraciones diferentes de Laureato (0.5%, 1%, 2%), Tween 80 (0.05%, 0.1%, 0.2%), un control negativo (sin inoculación de ooquistes) y un control positivo, cada control se analizó con agua destilada como solución de lavado (en total, 8 ensayos por cada vegetal o fruta) y cada ensayo se realizó por duplicado.

Para hacer el conteo de ooquistes, se procedió de la misma manera que con la muestra, observándose toda la preparación.

El promedio de observación de ooquistes de *C. cayetanensis* por el método de epifluorescencia en vegetales se muestra a continuación en la tabla No. 1 donde el agua destilada es el mejor tratamiento para remover ooquistes.

TABLA No. 1

PROMEDIO DE OBSERVACIONES DE OOQUISTES EN VEGETALES

TRATAMIENTO	APIO	LECHUGA	ESPINACA
AGUA DESTILADA	23 (+/- 4)	28 (+/- 4)	21 (+/- 4)
TWEEN 0.05 %	21 (+/- 3)	26 (+/- 4)	20 (+/- 4)
TWEEN 0.1 %	19 (+/- 3)	25 (+/- 3)	18 (+/- 3)
TWEEN 0.2 %	18 (+/- 3)	24 (+/- 3)	17 (+/- 2)
LAUREATO 0.5 %	22 (+/- 4)	26 (+/- 3)	20 (+/- 1)
LAUREATO 1 %	20 (+/- 2)	25 (+/- 4)	17 (+/- 2)
LAUREATO 2 %	18 (+/- 4)	24 (+/- 4)	16 (+/- 2)

El promedio de observación de ooquistes en frutas muestra diferencia con el de los vegetales como puede observarse en la tabla No. 2, debido a las características propias de cada una de las frutas analizadas.

TABLA No. 2

PROMEDIO DE OBSERVACIONES DE OOQUISTES EN FRUTAS

TRATAMIENTO	MORA	FRAMBUESA	FRESA
AGUA DESTILADA	22 (+/- 3)	23 (+/- 2)	20 (+/- 3)
TWEEN 0.05 %	19 (+/- 2)	22 (+/- 3)	19 (+/- 4)
TWEEN 0.1 %	18 (+/- 2)	16 (+/- 2)	18 (+/- 3)
TWEEN 0.2 %	18 (+/- 2)	14 (+/- 2)	18 (+/- 3)
LAUREATO 0.5 %	20 (+/- 3)	20 (+/- 3)	19 (+/- 2)
LAUREATO 1 %	19 (+/- 2)	17 (+/- 2)	19 (+/- 2)
LAUREATO 2 %	18 (+/- 2)	14 (+/- 3)	18 (+/- 3)

En la tabla No. 3 se detallan los porcentajes de recuperación obtenidos en vegetales después de los siete tratamientos realizados. Se observa que sigue siendo el agua destilada el mejor tratamiento de los utilizados. El mayor porcentaje con agua destilada lo presenta la lechuga con un 30.90% y la espinaca el menor porcentaje con un 23.30%.

TABLA No. 3

PORCENTAJES DE RECUPERACION OBTENIDOS EN VEGETALES

TRATAMIENTO	APIO	LECHUGA	ESPINACA
AGUA DESTILADA	26.16%	30.90%	23.30%
TWEEN 0.05 %	23.10%	28.69%	21.90%
TWEEN 0.1 %	21.38%	28.10%	20.25%
TWEEN 0.2 %	20.25%	26.40%	19.10%
LAUREATO 0.5 %	24.75%	28.69%	21.90%
LAUREATO 1 %	22.50%	27.56%	19.10%
LAUREATO 2 %	20.25%	27.00%	18.00%

Como se muestra en la tabla No. 4, en los porcentajes de recuperación obtenidos en frutas no se observa una diferencia significativa con los detergentes utilizados, siendo nuevamente el tratamiento con agua destilada el que presenta el mayor porcentaje de recuperación.

TABLA No. 4

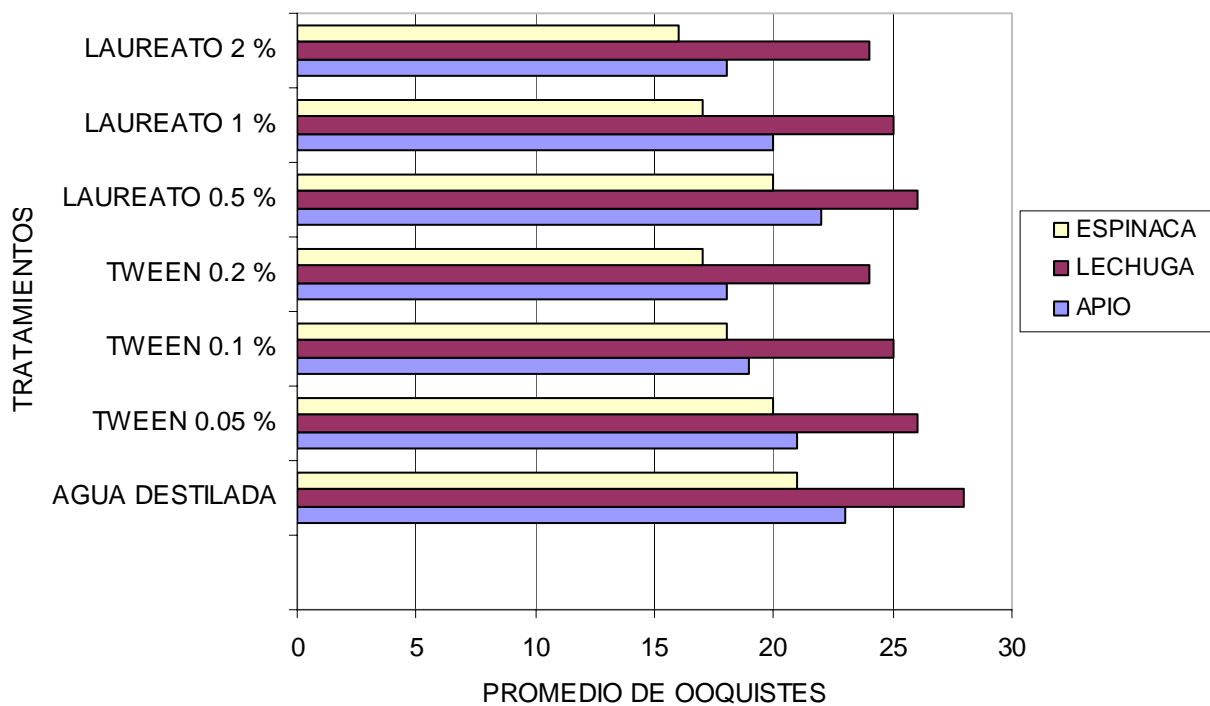
PORCENTAJES DE RECUPERACION OBTENIDOS EN FRUTAS

TRATAMIENTO	MORA	FRAMBUESA	FRESA
AGUA DESTILADA	24.75%	25.88%	22.50%
TWEEN 0.05 %	21.38%	24.75%	20.81%
TWEEN 0.1 %	20.53%	18.00%	20.25%
TWEEN 0.2 %	19.69%	15.19%	20.25%
LAUREATO 0.5 %	22.50%	22.22%	21.38%
LAUREATO 1 %	21.38%	18.56%	20.81%
LAUREATO 2 %	20.25%	15.00%	20.25%

En esta gráfica, destaca la lechuga en los 7 tratamientos realizados, observándose la mayor cantidad de ooquistes recuperados en el agua destilada. Por la textura de las hojas de la lechuga, es la que menos retiene ooquistes de los tres vegetales analizados.

GRAFICA 1

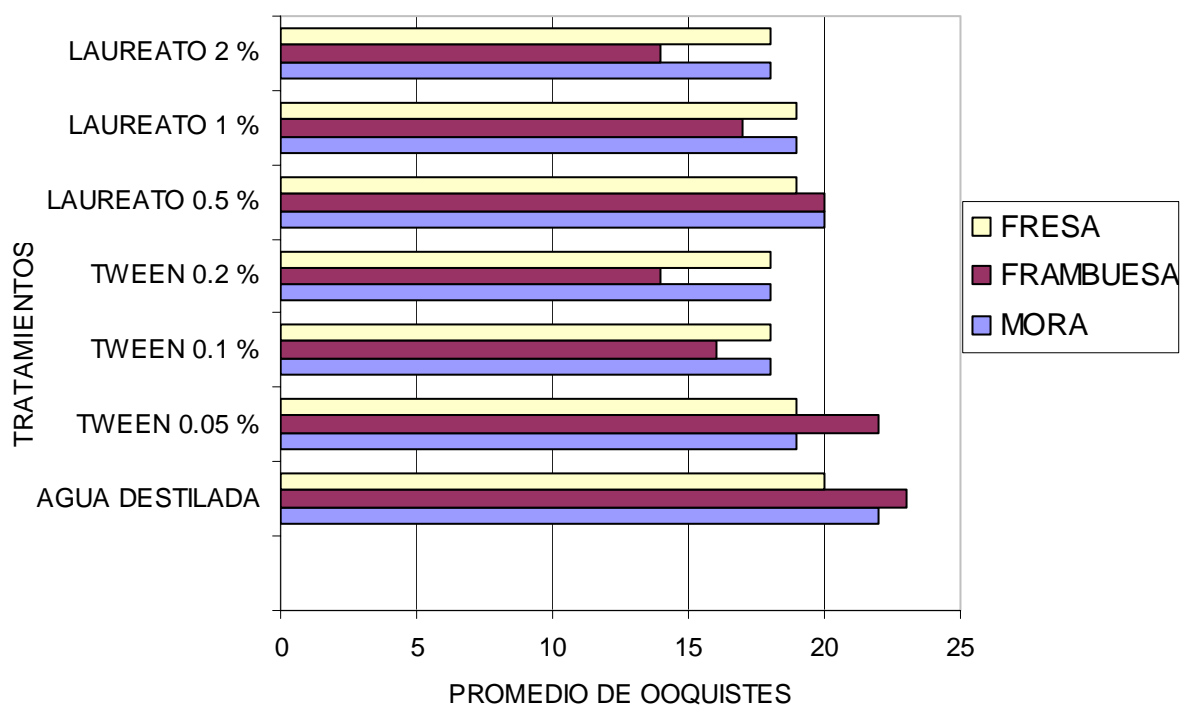
PROMEDIO DE OBSERVACION DE OOQUISTES EN VEGETALES



Por las características propias de cada una de las frutas analizadas, el comportamiento en la observación de ooquistes se ve influido por la concentración utilizada de cada detergente, a menor concentración del detergente, mayor fue la observación de ooquistes.

GRAFICA 2

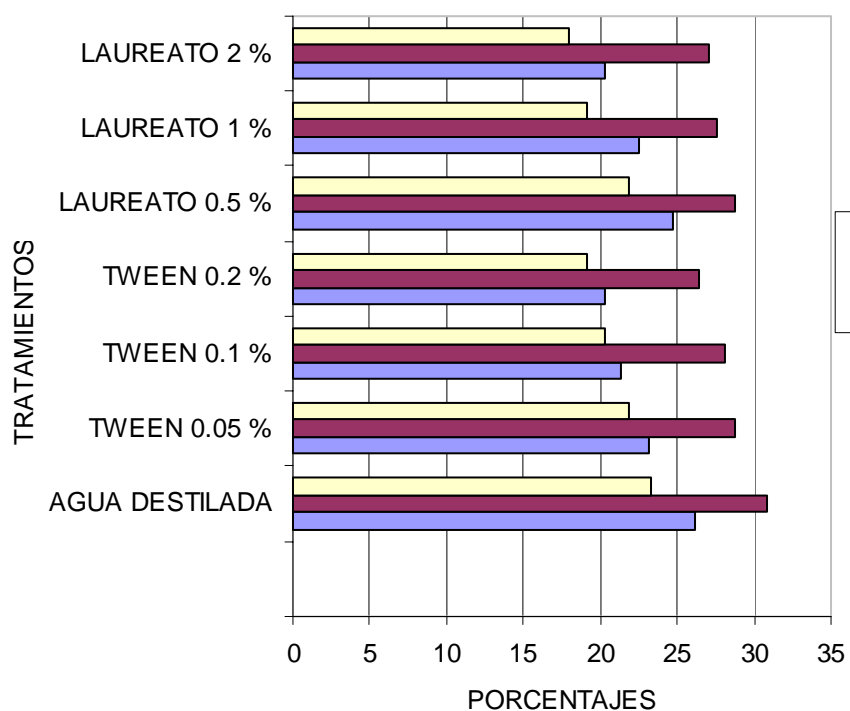
PROMEDIO DE OBSERVACION DE OOQUISTES EN FRUTAS



En esta gráfica se puede observar que de los 7 tratamientos realizados en los tres vegetales, es con el agua destilada donde se obtiene el mayor porcentaje de recuperación de ooquistes. En la lechuga presenta el mayor porcentaje que es de 30.90%.

GRAFICA 3

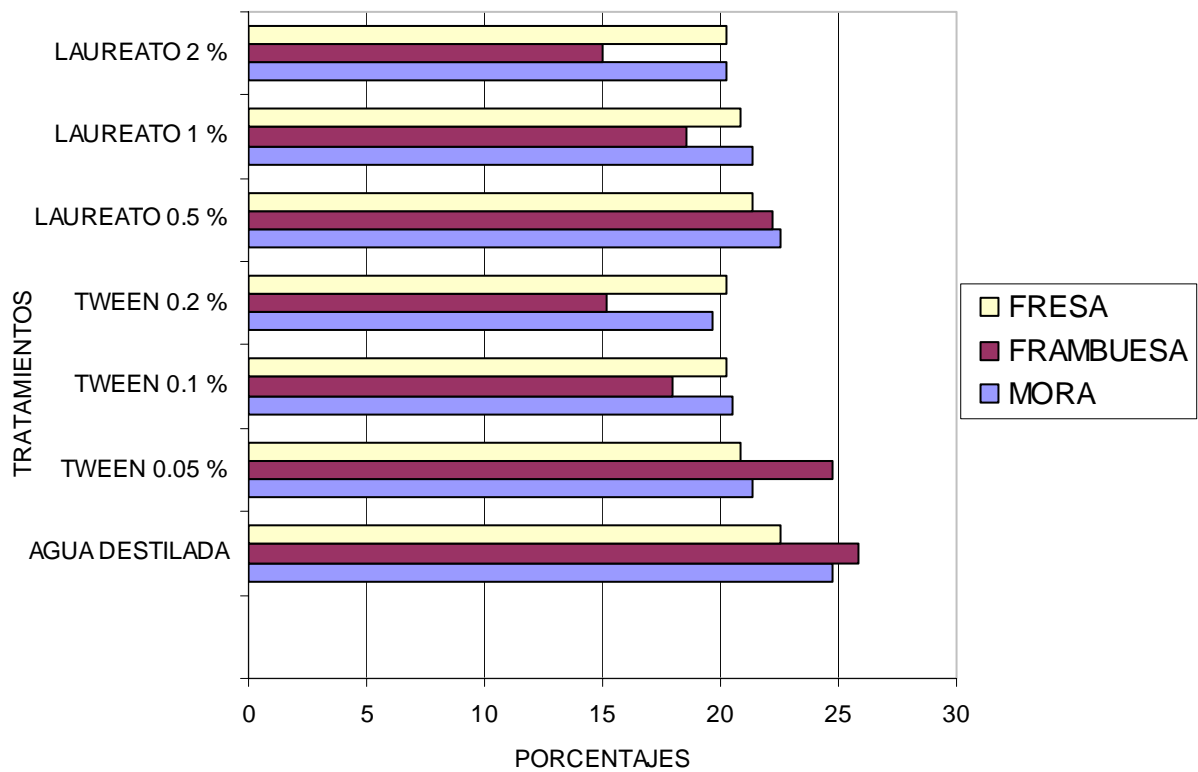
PORCENTAJES DE RECUPERACION OBTENIDOS EN VEGETALES



En esta gráfica se puede observar que de los 7 tratamientos realizados en las tres frutas, al igual que en los vegetales, es con el agua destilada donde se obtiene el mayor porcentaje de recuperación de ooquistes. En la frambuesa es más fácil remover los ooquistes, ya que presenta el mayor porcentaje que es de 25.88%.

GRAFICA 4

PORCENTAJES DE RECUPERACION OBTENIDOS EN FRUTAS



Resultados del análisis estadístico

TABLA 1, resultados de ANDEVA para vegetales
Modelo General del Procedimiento Lineal

Variable Dependiente: OOQUISTE

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Media al Cuadrado	Valor de F	Pr > F
Modelo	27	4063.321429	150.493386	43.62	0.0001
Error	308	1062.666667	3.450216		
Total Corregido	335	5125.988095			

La varianza total es 1062.666667

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Media al Cuadrado	Valor de F	Pr > F
Modelo	29	4073.380952	140.461412	40.83	0.0001
Error	306	1052.607143	3.439893		
Total Corregido	335	5125.988095			

R-Cuadrado	C.V.	Raíz MSE	Media de OOQUISTES
0.794653	8.624100	1.854695	21.5059524

Esta tabla muestra la varianza total después de realizar el cálculo con todas las medias correspondientes. El valor de la varianza total es de 1052.607143 (3.44).

Fuente	DF	Tipo III SS	Media al Cuadrado	Valor de F	Pr > F
VEGETAL	2	2956.166667	1478.083333	429.69	0.0001
TRAT	6	1025.529762	170.921627	49.69	0.0001
TRAT*VEGETAL	12	60.916667	5.076389	1.48	0.1319

El factor VEGETAL se refiere a los tres vegetales estudiados y las dos repeticiones realizadas. El factor TRAT se refiere a los siete diferentes tratamientos realizados, y el factor TRAT*VEGETAL se refiere a la interacción entre los dos factores. Como se observa, el valor de Pr > F de Vegetal y de Tratamiento nos indica que sí hay diferencia

significativa entre ellos. El valor 0.1319 nos indica que no hay interacción entre tratamiento y vegetal.

Fuente	DF	Tipo III SS	Media al Cuadrado	Valor de F	Pr > F
TUBO (TRAT)	6	5.279762	0.879960	0.26	0.9567
OBSERVA (TUBO)	2	10.059524	5.029762	1.46	0.2333

En los datos anteriores se observa que la Media al Cuadrado tanto del tubo(TRAT) como de observa(TUBO) no muestran interacción entre sí y el Test de Hipótesis lo confirma con el valor de Pr > F.

Test de Hipótesis

Fuente	DF	Tipo III SS	Media al Cuadrado	Valor de F	Pr > F
TRAT	6	1025.529762	170.921627	194.24	0.0001

En estas agrupaciones de Duncan los números 1, 2 y 3 corresponden a: apio, lechuga y espinaca respectivamente donde se tiene la media mas alta de 25.536 que corresponde a la lechuga.

Agrupaciones de Duncan	Mean	N	VEGETAL
A	25.536	112	2
B	20.500	112	1
C	18.482	112	3

En estas Agrupaciones de Duncan se muestran a los 7 tratamientos realizados donde el 2 corresponde al agua destilada y el 1 al control positivo también tratado con agua destilada siendo estos los que presentan valores mas altos.

Agrupaciones de Duncan	Media	N	TRAT
A	24.062	48	2
A			
A	23.562	48	1
B	22.625	48	5

C	20.646	48	3
C			
C	20.562	48	6
D	19.562	48	7
D			
D	19.521	48	4

Los Intervalos de Confianza de un 95% oscilan para el agua destilada entre 23.73 y 24.32.

Agrupaciones de Duncan	Media	N	VEGETAL/FRUTA
A	25.536	112	2
B	20.500	112	1
C	19.134	112	4
C			
C	18.821	112	6
D	18.482	112	3
E	17.848	112	5

En esta tabla se observa que vegetal o que fruta muestra mayor recuperación de ooquistes tomando en cuenta la estructura física del vegetal ó fruta a analizar, el 1, 2 y 3 corresponden a los vegetales apio, lechuga y espinaca y el 4, 5 y 6 corresponden a las frutas mora, frambuesa y fresa.

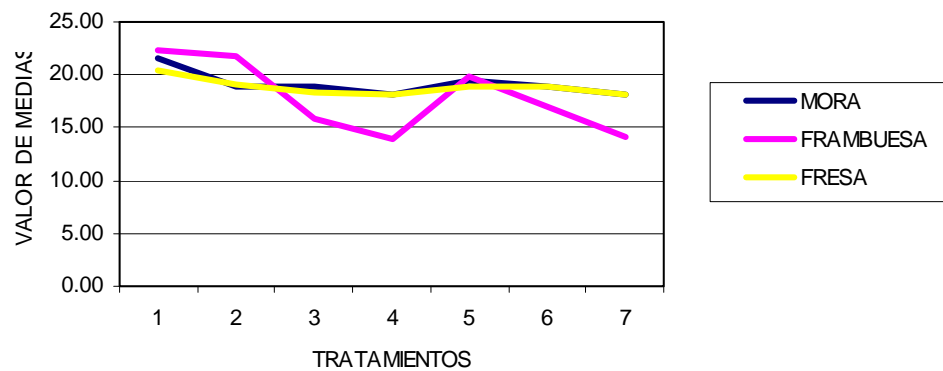
TABLA 2, resultados de ANDEVA para frutas

Fuente	DF	Tipo III SS	Media al Cuadrado	Valor de F	Pr > F
VEGETAL	2	100.7202381	50.3601190	50.76	0.0001
TRAT	6	859.3928571	143.2321429	144.36	0.0001
TRAT*FRUTA	12	480.5714286	40.0476190	40.36	0.0001
TUBO(TRAT)	6	3.4523810	0.5753968	0.58	0.7463

El factor VEGETAL se refiere a las tres diferentes frutas analizadas y sus repeticiones, el factor TRAT a los siete tratamientos realizados, los factores TRAT*FRUTA y TUBO(TRAT) se refiere a la interacción, que en este caso si existe, entre los dos factores, dado a que el valor de $Pr > F$ es muy pequeño (0.0001), por esta razón se toman las medias de cada una y se busca si hay interacción entre ellas.

TRATAMIENTO	MORA	FRAMBUESA	FRESA
1	21.50	22.30	20.50
2	18.80	21.70	19.10
3	18.90	15.90	18.30
4	18.10	14.00	18.10
5	19.50	19.90	18.90
6	18.90	17.00	18.80
7	18.10	14.20	18.10

INTERACCION ENTRE FRUTAS Y TRATAMIENTOS



IX. DISCUSION DE RESULTADOS

De *Cyclospora cayetanensis* se han realizado muy pocos estudios epidemiológicos en Guatemala y ninguno prospectivo a lo largo de las estaciones lluviosas. El primer caso de infección por *C. cayetanensis* fue descrito por Tamara Velásquez en 1991 (69). Entre 1996 y 1997, se realizaron estudios de prevalencia de este parásito en pacientes con SIDA, obteniéndose un 12% y 17% respectivamente (66, 67).

Como primer paso en este estudio, se procedió a la recolección de muestras de heces de pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) de diferentes centros asistenciales. El objetivo era la obtención de ooquistes frescos purificados de *C. cayetanensis*. Se muestreó de marzo a noviembre de 1999, de 256 muestras sólo 5 de ellas fueron positivas para *C. cayetanensis*. El proceso de purificación utilizado está descrito en la sección C de materiales y métodos, inciso 2.

Se realizó un ensayo anterior donde se utilizaba 250 g. de fruta y/o vegetal con una concentración de 500 ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*, con 250 mL. de las diferentes soluciones de lavado (agua destilada, Tween 0.05%, Tween 0.1%, Tween 0.2%, Laureato 0.5%, Laureato 1% y Laureato 2%). El problema fue que era mucha cantidad de vegetal y/o fruta, y la inoculación de los ooquistes era muy poca y al hacer las observaciones en el microscopio de epifluorescencia se encontraban muy pocos ooquistes, obteniéndose un porcentaje de recuperación muy bajo. Se recibió la visita de la Dra. Ann Adams*, y con ella se realizó un pequeño estudio con perejil, albahaca y frambuesa, probando otras soluciones (leche descremada al 5%, agua mineral), y una de las conclusiones de este estudio fue que no era necesario tener mucha cantidad del vegetal y/o fruta, pero sí de la concentración de ooquistes, entonces se determinó trabajar con 100 g. de vegetal y/o fruta, una concentración de 2000 ooquistes purificados para la inoculación y 100 mL. de las diferentes soluciones de lavado.

*Investigadora de Seafood Products Research Center, US FDA, Washington

En los porcentajes de recuperación obtenidos se observa que el más alto fue de 30.9 %, que corresponde a la lechuga, utilizando agua destilada, y en las frutas se obtuvo un 25.88 % que corresponde a la frambuesa, también utilizando agua destilada. Se puede observar que en los vegetales hay diferentes texturas o superficies físicas, lo que podría influir en la adherencia de los ooquistes en cualquier vegetal, y que, en el momento de hacer los lavados correspondientes, queden ooquistes adheridos a la superficie del vegetal. En cuanto a las frutas, son de estructura física similar, con vellos y drupeolos, los ooquistes tienen más posibilidad de adherirse a la superficie, y que los procedimientos de lavado, no sean lo suficientemente capaces de removerlos, y esto influya en el porcentaje de recuperación.

Al realizar el análisis estadístico, se determinó que no hay interacción entre los vegetales y los tratamientos realizados, pues se obtuvo un valor de $P > F$ de 0.1319, con un intervalo de confianza del 95%. En las agrupaciones de Duncan se demuestra que es el vegetal 2, en este caso la lechuga, donde se recuperan la mayor cantidad de ooquistes y el agua destilada el mejor tratamiento empleado. En el caso de las frutas el valor de $P > F$ es 0.0001, que es muy pequeño y demuestra que sí hay interacción entre los tratamientos y las frutas analizadas. Se graficó esta interacción, usando las medias obtenidas, y se comprobó que aunque existe esta interacción, el tratamiento 1, que en este caso es el agua destilada, presenta la mayor recuperación de ooquistes y que la fruta donde más se recuperaron ooquistes fue en la frambuesa.

X. CONCLUSIONES

1. De 256 muestras de pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), solo 5 fueron positivas para *C. cayetanensis*, lo que representa aproximadamente el 2 %.
2. La cantidad de ooquistes purificados de *Cyclospora cayetanensis* para la inoculación en el laboratorio de vegetales o frutas, no debe ser menor de 2000 ooquistes por 100 gramos de vegetal o fruta.
3. Sí existe estadísticamente una diferencia significativa entre los 6 tratamientos con el control positivo (agua destilada).
4. La mejor solución de lavado fue el agua destilada (método estándar).
5. De las tres concentraciones de Laureato (0.5%, 1%, 2%) y Tween 80 (0.05%, 0.1%, 0.2%), las de menor concentración son las más parecidas al control positivo (agua destilada).
6. Sumado al efecto de adherencia de los ooquistes de *C. cayetanensis*, hay que tomar en cuenta la estructura física del vegetal y/o fruta, pues el porcentaje de recuperación fue mayor en la lechuga (30.9 %) que en las frambuesas (25.88 %).

XI. RECOMENDACIONES

1. Por todas las restricciones que la FDA (Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) ha impuesto a las fincas frambueseras adheridas al Plan Modelo de Excelencia, se considera necesario realizar estos procedimientos en algunos de los lotes de frambuesas de exportación, para certificar la no contaminación con ooquistes de *C. cayetanensis*.
2. Implementar este ensayo en muestras de alimentos, utilizando el equipo adecuado, como el utilizado en los laboratorios de Virología y Microbiología del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), donde podría darse la transferencia de tecnología y conocimiento.
3. Realizar otro tipo de análisis, como el PCR y el protocolo de PCR basado en filtros de extracción de ADN, pues esta tecnología es específica y altamente sensible, y ya se han realizado estudios que apoyan estos análisis y demuestran buenos resultados.
4. Realizar un estudio ciego para la validación del método utilizado en este estudio, utilizando además de agua destilada y los detergentes Tween 80 y Laureato en las concentraciones aquí estudiadas, otras concentraciones de estos detergentes y diferentes concentraciones de ooquistes purificados en diferentes vegetales y frutas.

XII. REFERENCIAS

1. Jinneman K; *et al.* Template preparation for PCR and RLFP of amplification products for the detection and identification of *Cyclospora* and *Eimeria* spp. J FOOD PROT 1998;61:1497-1503.
2. Sterling C.; Ortega Y. *Cyclospora*: An enigma worth unraveling. EMERG INFECT DIS 1999;5(1):48-53.
3. Relman D; Schmidt T; *et al.* Molecular Phylogenetic Analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggests that it is closely related to *Eimeria* species. J INF DIS 1996;173:440-445.
4. Adams A; Ortega Y; Jinneman K. *Cyclospora*. ENCYCLOPEDIA OF FOOD MICROBIOLOGY 1998;425:1-16.
5. Ortega YR; Sterling CR; Gilman RH. *Cyclospora cayetanensis*. ADV PARASITOL 1998;40:339-418.
6. FDA. *Cyclospora cayetanensis* Protocol: Concentration and preparation of oocysts from produce for the polimerase chain reaction (PCR) and microscopy. 1997:1-9.
7. Ashford RW. Ocurrance of an undescribed coccidian in man in Papua New Guinea. ANN TROP MED PARASITOL 1979;73:497-500.
8. Soave R; Dubey J; *et al.* A new intestinal pathogen? CLIN RES 1986;34:533.
9. Hart AS; Ridinger M; *et al.* Novel organism associated with chronic diarrhoea in AIDS. LANCET 1990;335:169-170.

10. Herwaldt BI; Ackers and the *Cyclospora* working group. An outbreak in 1996 of cyclosporiasis associated with imported raspberries. *N ENGL J MED* 1997; 336:1548-1556.
 11. Eberhard M; Pieniazek N; Arrowood M. Laboratory diagnosis of *Cyclospora* infections. *ARCH PATHOL LAB MED* 1997;121:793-797.
 12. Ortega Y; Sterling CR; Gilman R; Cama V; Díaz F. *Cyclospora* species: A new protozoan pathogen of humans. *N ENG J MED* 1993:1308-1312.
-
1. Cáceres VM, *et al.* A foodborne outbreak of Cyclosporiasis by imported raspberries. *J FAM PRACT* 1998;47(3):231-4.
 2. Lepes T. Newly established causes of diarrhoea: the protozoan *Cyclospora cayetanensis* (Coccidia, Apicomplexa). *MED PROG* 1998;51:5-6,242-4.
 3. Levine ND; *et al.* A newly revised classification of the Protozoa. *J PROTOZOOL* 1980;27:37-58.
 4. Chiodini PL. A new parasite: human infection with *Cyclospora cayetanensis*. *TRANS TROP MED HYG* 1994;88:369-371.
 5. Brown GH, Rotschafer JC. *Cyclospora*: review of an emerging parasite. *PHARMACOTHERAPY* 1999;19(1):70-75.
 6. Long EG, *et al.* Alga associated with diarrhea in patients with acquired immunodeficiency syndrome in travellers. *J CLIN MICROBIOL* 1990;28:1101-1104.
 7. CDC. Outbreaks of diarrheal illness associated with cyanobacteria (blue-green algae)-like bodies, Chicago and Nepal, 1989 and 1990. *MMWR* 1991;40:325-327.

8. Ortega YR, Sterling CR, Gilman RH. A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from humans. *J PARASITOL* 1994;80:625-629.
9. Soave R, Herwaldt BL, Relman DA. *Cyclospora*. *INFECT DIS CLIN NORTH AM* 1988;12:1-12.
10. Nuñez FA, Gálvez MD, Finlay Cm. The first report in Cuba of human intestinal infection by *Cyclospora cayetanensis*. *REV CUBANA MED TROP* 1995;47:211-214.
11. Bern C, *et al.* Epidemiologic studies of *Cyclospora cayetanensis* in Guatemala. *EMERG INFECT DIS* 1999;5(6):766-774.
12. Madico G, *et al.* Epidemiology and treatment of *Cyclospora cayetanensis* infection in Peruvian children. *CLIN INFECT DIS* 1997;24:977-981.
13. Smith HV, Paton CA, Girdwood RW. Sporulation of *Cyclospora* sp. oocysts. *APPL ENVIR MICROBIOL* 1997;63:1631-1632.
14. Levine ND. Introduction, history and taxonomy. In: Hammond DM, Long PL. *The coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related genera*. Baltimore: University Park Press 1973:1-22.
15. Eberhard ML, *et al.* *Cyclospora cayetanensis* infections in Haiti: A common occurrence in the absence of watery diarrhea. *AM J TROP MED HYG* 1999;60(4):584-586.
16. Shlim DR, *et al.* An alga-like organism associated with an outbreak of prolonged diarrhea among foreigners in Nepal. *AM J TROP MED HYG* 1991;45:383-389.
17. Pollok RC, *et al.* Traveller's diarrhea associated with cyanobacterium-like bodies. *Lancet* 1992;340:556-557.

18. Logaar J, Poijsak-Prijateij M, Andlovic A. *Cyclospora cayetanensis*, potencial cause of diarrhoea. J INFECT DIS 1997;284-285.
19. Gascon J, *et al.* Cyanobacteria-like body (CBL) in travellers with diarrhoea. SCANDINAVIAN J INFECT DIS 1993;25:253-257.
20. Ortega YR, *et al.* Pathologic and Clinical findings in patients with Cyclosporiasis and a description of intracellular parasite life-cycle stages. J INFECT DIS 1997;176:1584-1589.
21. Nassef NE, el-Ahl SA, el-Shafee OK, Nawar M. *Cyclospora*: a newly identified protozoan pathogen of man. J EGYPT SOC PARASITOL 1998;28:213-219.
22. Sifuentes OJ, *et al.* *Cyclospora cayetanensis* infection in patients with and without AIDS: biliary disease as another clinical manifestation. CLIN INFECT DIS 1995;21:5 1092-1097.
23. Taylor DN, *et al.* Etiology of diarrhea among travelers and foreign residents in Nepal. JAMA 1988;260:1245-1248.
24. Pape JW, *et al.* *Cyclospora* infection in adults infected with HIV. Clinical manifestations, treatment and prophylaxis. ANN INTERN MED 1994;121:654-657.
25. Connor BA, *et al.* Pathogenic changes in the small bowel in nine patients with diarrhoea associated with a coccidia-like body. ANN INTERN MED 1993;119:377-382.
26. Bendall RP, *et al.* Diarrhoea associated with cyanobacterium-like bodies: a new coccidial enteritis of man. LANCET 1993;34 1:590-592
27. Hoge CW, *et al.* Prevalence of *Cyclospora* species and other enteric pathogens among children less than 5 years of age in Nepal. J CLIN MICROBIOL 1995;33:3058-3060.

28. CDC. *Cyclospora* infection. Information for Health Care Providers. 1999;www.cdc.gov
29. Ash LR, Orihel TC. Parasites: A guide to laboratory procedures and identification. AM SOC CLIN PATHOL 1987;328:18-53.
30. Pratdesaba RA. Investigación de *Isoospora belli* y comparación de métodos diagnósticos en grupos de riesgo en Guatemala. Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala;1991:54p.
31. Sheather AL. The detection of intestinal protozoa and other parasites by a flotation technique. J COMP PATHOL 1983;36:266-275.
32. Visvesvara GS, et al. Uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating. J CLIN MICROBIOL 1997;35:730-733.
33. Varea M, et al. Fuchsin fluorescence and autofluorescence in *Cryptosporidium*, *Isoospora* and *Cyclospora* oocysts. INT J PARASITOL 1998;28:12 1881-1883.
34. Yoder KE, Sethabutr O, Relman DA. PCR-based detection on the intestinal pathogen *Cyclospora* in PCR protocols for emerging infectious diseases, a supplement to diagnostic molecular microbiology: Principles and applications. Persing DH (ed.) ASM Press, Washington DC. 1996;169-176.
35. Pieniazek NJ, et al. PCR confirmation of infection with *Cyclospora cayentanensis*, EMERG INFECT DIS 1996;3:57-358.
36. Orlandi PA, Lampel KA. Extraction-free, filter based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. J CLIN MICROBIOL 2000;38:2271-2277.

37. Hoge CW, *et al.* Placebo-controlled trial of cotrimoxazole for *Cyclospora* infections among travellers and foreign residents in Nepal. LANCET 1995;345:691-693.
38. Colomina RJ, Villar SJ, Morphological, clinical and therapeutic characteristics of *Cyclospora cayetanensis*. BOL CHIL PARASITOL 1997:26-32.
39. Madico G, *et al.* Treatment of *Cyclospora* infections with cotrimoxazole (letter). LANCET 1993;342:122-123.
40. Soave R. *Cyclospora*: an overview. CLIN INFECT DIS 1996;23:429-437.
41. Oli WW, Zimmerman SK, Needham CA. *Cyclospora* species as a gastrointestinal pathogen in immunocompetent hosts. J CLIN MICROBIOL 1995;33:1267-1269.
42. Markus MB, Frea JA. Occurrence of human *Cyclospora* infection in sub-Saharan Africa. S AFR MED J 1993;83:862-863.
43. Wurtz R. *Cyclospora*: a newly identified intestinal pathogens of humans. CLIN INFECT DIS 1994;18:620-623.
44. Bendall RP, Chiodini PL. The epidemiology of human *Cyclospora* infection in the UK. In: Detts WB, Casemore D, Fricker C, Smith H, Watkins J, editors. Protozoan parasites and water. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham house. 1995:26-29.
45. McDougall TJ, Tandy MW. Coccidia/cyanobacterium-like bodies as a cause of diarrhea in Australia. PATHOLOGY 1993;25:375-378.
46. CDC. *Cyclospora*: A new biological bomb. 1999:www.cdc.gov

47. Hoge CW, *et al.* Epidemiology of diarrhoeal illness associated with coccidian-like organism among travellers and foreign residents in Nepal. LANCET 1993;341:1175-1179.
48. Wurtz RM, *et al.* Clinical characteristics of seven cases of diarrhea associated with a novel acid-fast organism in the stool. CLIN INFECT DIS 1993;16:136-138.
49. Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. Waterborne protozoan pathogens. CLIN MICROBIOL REV 1997;10:67-85.
50. Pellerdy LP, Tany J. *Cyclospora talpae* from the liver of *Talpae europaea*. FOL PARASITOL (Praha) 1968;15:275-277.
51. Berlin OWG, *et al.* Recovery of *Cyclospora* organisms from patients with prolonged diarrhea. CLIN INFECT DIS 1994;18:606-609.
52. Drenaggi D, *et al.* Cyclosporiasis in a traveller returning from South America. J TRAVEL MED 1998;5:3 153-155.
53. Jelinek T, *et al.* Prevalence of infection with *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* among international travellers. INF DIS TROP MED 1997;801-804.
54. Cuéllar N. Prevalencia de infecciones intestinales causadas por coccidios: *Cryptosporidium* sp., *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli* en pacientes con SIDA. Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala;1997:71 p
55. Alvarado K. *Cyclospora cayetanensis* como agente causal de diarrea en pacientes de la consulta externa del Hospital General San Juan de Dios. Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala;1998:41 p.

56. Ortega YR, *et al.* Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. AM J TROP MED HYG 1997;57(6):683-686.
57. Velásquez, T. Prevalencia de rotavirus en niños de 0 a 3 años de edad con diarrea aguda diagnosticados por el método de ELISA y microscopía electrónica en el departamento de Pediatría del Hospital General San Juan de Dios. Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala;1992:63 p.
58. Huang P, *et al.* The first reported outbreak of diarrheal illness associated with *Cyclospora* in the United States. ANN INTER MED 1995; 123:409-414.
59. Hale D, Aldeen W, Carroll K. Diarrhea associated with cyanobacteria-like bodies in an immunocompetent host. An unusual epidemiological source. JAMA 1994; 271:144-145.
60. Rabold JG, *et al.* *Cyclospora* outbreak associated with chlorinated drinking water (letter). LANCET 1994;344:1360-1361.
61. Connor BA, Shlim DR. Foodborne transmission of *Cyclospora*. LANCET 1995; 346:1634.
62. Koumans, EHA. An outbreak of cyclosporiasis in Florida in 1995: a harbinger of multistate outbreak in 1996 and 1997. AM J TROP MED HYG 1998; 235-242.
63. Sturbaum GD, *et al.* *Cyclospora cayetanensis* in sewage water. APPL ENVIRON MICROBIOL 1998; 64:2284-2286.
64. Cáceres VM, *et al.* A foodborne outbreak of cyclosporiasis caused by imported raspberries. J FAM PRACT 1998; 47(3):231-234.
65. CDC. Update: Outbreak of *Cyclospora cayetanensis* infection in the United States and Canada. MMWR. 1996; 45(28):549-551.

66. Jacquette G, *et al.* Update: Outbreaks of Cyclosporiasis-United States, 1997. MMWR 1997; 46:461-462.
67. Hofman J, *et al.* Update: Outbreaks of *Cyclospora cayetanensis* infection-United States and Canada. MMWR 1996; 45:611-612.
68. Chambers J, *et al.* Outbreaks of *Cyclospora cayetanensis* infection-United States. 1996; 45:549-551.
69. Pritchett R, *et al.* Outbreak of cyclosporiasis. Northern Virginia-Washington, DC., Baltimore, Maryland, Metropolitan Area. MMWR 1997; 46:689-691.
70. Herwaldt BL, Beach MJ. The return of *Cyclospora* in 1997: another outbreak of cyclosporiasis in North America associated with imported raspberries. ANN INTERN MED 1999; 130(3):210-220.
71. Kocka F, *et al.* Outbreaks of diarrheal illness associated with Cyanobacteria (blue-green algae)-like bodies in Chicago and Nepal. 1989-1990. MMWR 1991; 40:325-327.
72. FDA. FDA warns of Cyclosporiasis in Guatemalan raspberries. Bethesda, Maryland. Jun 12, 1997.
73. NYC DOH. Health Commissioner Warns: Cyclospora is back-avoid Guatemalan raspberries. New York City Department of Health. Office of External Affairs. Jun 4, 1997.
74. FDA. Outbreaks of Cyclosporiasis and Guatemalan raspberries. FDA Talk Paper. Jun 10, 1997.
75. CDC. Outbreak of Cyclosporiasis- Ontario, Canada. MMWR 1998; 47(38):806-809.

76. CFIA. CFIA restricts entry of Guatemalan raspberries. The Canadian Food Inspection Agency (CFIA). 1998.
77. The Siglo News. Raspberries under scrutiny. Guatemala, August 1998.
78. Jinneman KC, *et al.* Differentiation of *Cyclospora* sp and *Eimeria* spp by using the polymerase chain reaction products and restriction fragment length polymorphisms. FDA LAB INFO BULL 1996; 4044.

ANEXOS

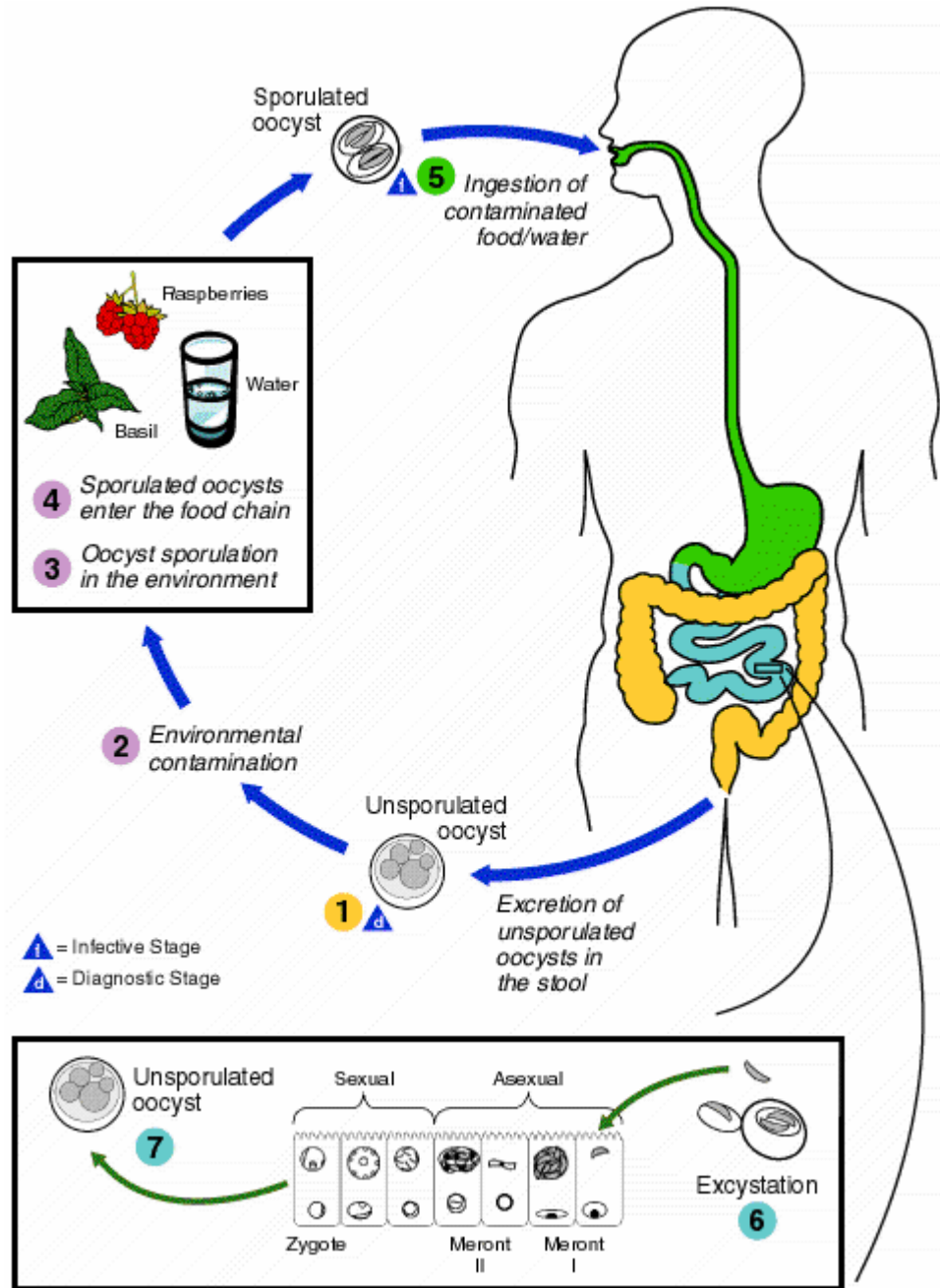


FIGURA No. 1

ANEXO No. 1

CICLO DE VIDA PROPUESTO

FIGURA No. 2

ANEXO No. 2

PROCESO DE ESPORULACION DE *C. cayetanensis*



FIGURA No. 3
ANEXO No. 3
OOQUISTES EN SAFRANINA

