

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

**DIAGNOSTICO DE PARASITOS INTESTINALES EMERGENTES EN  
PERSONAS QUE VIVEN CON VIH / SIDA QUE ASISTEN A LA CLINICA  
FAMILIAR “LUIS ANGEL GARCIA” DEL HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE  
DIOS**

Informe de tesis

Presentado por

KARLA ODETT ESCOBAR CASTRO

Para optar al título de

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, Noviembre 2003

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

**DIAGNOSTICO DE PARASITOS INTESTINALES EMERGENTES EN  
PERSONAS QUE VIVEN CON VIH / SIDA QUE ASISTEN A LA CLINICA  
FAMILIAR “LUIS ANGEL GARCIA” DEL HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE  
DIOS**

KARLA ODETT ESCOBAR CASTRO

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, Noviembre 2003

**JUNTA DIRECTIVA**

<i>M.Sc.</i> 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

## **ACTO QUE DEDICO**

### *A DIOS Y A LA VIRGEN DE LA MEDALLA MILAGROSA*

Por ser mi guía en todos los momentos de la vida.

### **A MIS PADRES**

José Rubén Escobar y Escobar y Evangelina Castro Paiz de Escobar

Con todo mi amor, respeto y admiración, gracias por todo su apoyo.

### **A MIS HERMANOS**

Mario Rubén, Roberto L. (QEPD), y Erick Leonel, por ser mis amigos y compañeros de toda la vida.

### **A MI ESPOSO**

Erwin Rolando Borrayo Gómez, por todo el amor y todo el apoyo durante la carrera.

### **A MIS AMIGOS Y AMIGAS**

Licenciados María Luisa de López, Miriam Alcázar, Roberto Cáceres, Osberth Morales por todos los buenos momentos compartidos

### **A MIS COMPAÑERAS DE PROMOCIÓN**

Rebeca, Nancy, Isabel, Claudia, Luisa Fernanda, Egly por su amistad y apoyo durante la carrera.

### **A MIS CATEDRÁTICOS**

Especialmente a los Licenciados Rafael Pratdesaba, Armando Cáceres, Alba Marina de García, y Gerardo Arroyo, por todos sus conocimientos transmitidos.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MIS ASESORES**

MSc. Blanca Samayoa y MSc. Rafael Pratdesaba.

Por la orientación y apoyo y todo el tiempo que invirtieron en la realización de este trabajo.

### **A MIS REVISORES**

Licda. Amanda Gálvez de Matheu y Lic. Nestor Martín Gil (USAC).

Licda Olga Torres de Matute (INCAP).

Dr. Eduardo Arathoon (HGSJDD).

Por que gracias a sus valiosos aportes este trabajo se enriqueció.

### **AL PERSONAL DE COPROLOGÍA DEL LABORATORIO CLINICO HGSJDD**

Especialmente a Sonia Morales, Marisol Luna, Brenda Verbena y Griselda. Por toda su colaboración durante el proceso de recolección de muestras.

### **AL LIC. FRANCISCO CULAJAY**

Por su asesoría técnica y todo su apoyo.

### **A LAS DIFERENTES INSTITUCIONES**

Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. –INCAP-

Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios.

Clínica Familiar “Luis Ángel García”.

Por su enorme colaboración.

## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>RESUMEN</b>	1
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>III.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	4
<b>A.</b>	<b>Síndrome de inmunodeficiencia adquirida</b>	
1.	Generalidades	4
2.	Etiología	5
3.	Estructura del VIH	5
4.	Manifestaciones clínicas e infecciones oportunistas	6
5.	Epidemiología	8
<b>B.</b>	<b>Parásitos intestinales asociados a VIH/SIDA</b>	
<b>1.</b>	<i>Cryptosporidium parvum</i>	
a.	Agente causal	8
b.	Distribución geográfica	9
c.	Características clínicas	10
d.	Diagnóstico	11
e.	Tratamiento	12
<b>2.</b>	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	
a.	Agente causal	13
b.	Distribución geográfica	14
c.	Características clínicas	14
d.	Diagnóstico	15
e.	Tratamiento	15
<b>3.</b>	<i>Isospora belli</i>	

a.	Agente causal	16
b.	Distribución geográfica	17
c.	Características clínicas	17
d.	Diagnóstico	18
e.	Tratamiento	18
<b>4</b>	<b>Microsporidios</b>	
a.	Agente causal	19
b.	Distribución geográfica	20
c.	Características clínicas	21
d.	Diagnóstico	21
e.	Tratamiento	22
<b>IV.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>V.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>VI.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>25</b>
<b>VII.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>IX.</b>	<b>DISCUSION DE RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>XI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>50</b>
<b>XII.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>55</b>
<b>XIII.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>57</b>

## I. RESUMEN

Entre los principales problemas de salud asociados a PVVS (Personas que viven con VIH/SIDA) se encuentran la tuberculosis, las micosis y las parasitosis, estas últimas causadas por parásitos emergentes (1).

El objetivo principal de este estudio fue validar cuatro coloraciones utilizadas para la detección de parásitos intestinales de las clases *Coccidia* y *Microsporidia*. Se utilizó como estándar de oro para la detección de coccidios, la coloración de Zielh Neelsen (ZN).

Durante un período de 6 meses se recolectaron cien muestras de heces de cien PVVS que asistieron a la Clínica Familiar “Luis Ángel García” del Hospital General Juan de Dios. Sesenta y dos por ciento pertenecían al género masculino, 66 por ciento refirieron proceder de la ciudad capital y las distintas zonas metropolitanas, 56 por ciento se dedicaban principalmente a la economía informal, y 49 por ciento referían haber cursado al menos un año de escuela primaria. La edad mínima registrada fue de 1 año y la máxima de 66 años. Ochenta y dos de los pacientes se encontraban entre los 15 y 45 años.

Las muestras conservadas en formalina sódica aceto-acética (SAF) fueron trasladadas al Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), donde fueron procesadas para su evaluación microscópica. Fueron centrifugadas a 3000 RPM (revoluciones por minuto) durante 10 minutos, del sedimento se preparó cuatro frotos que se dejaron secar y posteriormente fueron teñidos con las coloraciones, Zielh Neelsen, y Hematoxilina férrica modificada para coccidios, Blanco de Calcoflúor y Tinción Tricromica modificada para microsporidios. Los análisis estadísticos a un nivel de riesgo de 0.05% se realizaron en Epi – info 6.04 b, a partir de los datos obtenidos de las historias clínicas de los pacientes y de la boleta de datos y recolección de muestra la exactitud y la precisión se evaluaron a través de análisis *kappa*.

La sensibilidad de la coloración Hematoxilina férrica modificada para la detección de *Cryptosporidium parvum* comparada con la coloración de Zielh Neelsen fue de 100% (IC<sub>95%</sub> = 56.1-100), la especificidad del 98% (IC<sub>95%</sub> = 91.7-99.6), el valor predictivo positivo de 77% (IC<sub>95%</sub> = 40.2-96.1), y el valor predictivo negativo de 100% (IC<sub>95%</sub> = 95-100) , la eficacia del test fue de 98% y el coeficiente de concordancia Kappa fue de 0.87. La prevalencia encontrada fue del 7%.

La sensibilidad de la coloración Hematoxilina férrica modificada para la detección de *Cyclospora cayatanensis* con respecto de la coloración de Zielh Neelsen fue de 100% (IC<sub>95%</sub> = 31-100), la especificidad del 98.96% (IC<sub>95%</sub> = 93.6-99.9), el valor predictivo positivo de 75% (IC<sub>95%</sub> = 21.9-98.7) y el valor predictivo negativo de 100% (IC<sub>95%</sub> = 95.2-100), la eficacia del test fue de 99% y el coeficiente de concordancia Kappa fue de 0.86. La prevalencia encontrada en este caso fue solamente del 3%. Los tres casos de *C. cayatanensis* así como los siete de *C. parvum* fueron reportados oportunamente a la Clínica familiar “Luis Ángel García” del Hospital General San Juan de Dios. En cuanto a *Isospora belli* y a microsporidios la prevalencia encontrada fue de 0%.

Entre los factores asociados a riesgo se pudo observar que hervir el agua que se bebe es un factor de protección [(IC<sub>95%</sub> = 0.00-0.48), OR<sup>1</sup> = 0.05, valor p = 0.001], así como beber refrescos callejeros se considera un factor de riesgo a la infección [ (IC<sub>95%</sub> = 1.01-51.62), OR = 6.44 valor p = 0.016].

Las pruebas para la detección de coccidios evaluadas en este estudio mostraron un grado de concordancia óptimo, por lo que pueden ser utilizadas alternativamente para la detección de coccidios intestinales.

Una de las recomendaciones más importantes de este estudio es utilizar como prueba de rutina la coloración de Zielh – Neelsen en los laboratorios de microbiología para la detección de coccidios intestinales en PVVS.

## II. INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), es una enfermedad viral transmitida a través de relaciones sexuales, contacto con sangre o hemoderivados y /o vía perinatal. Fue descrito en 1981 como una enfermedad humana nueva, se caracteriza por adenopatía generalizada, falla de la respuesta inmune, y consecuentemente frecuentes infecciones, diarrea crónica, y pérdida de peso (1). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaba que a finales del año 2000, las personas infectadas con VIH/ SIDA alrededor del mundo serian cerca de 36.1 millones; esta cifra fue un 50% superior a la proyectada por la OMS en 1991 (2). En Guatemala, de junio de 1984 al 30 de junio del año 2001, eran 4197 las personas notificadas con SIDA; es decir, que manifiestan la sintomatología clínica del síndrome, sin tomar en cuenta a aquellos con serología positiva para VIH (2). Las personas de los países en vías de desarrollo infectadas con VIH/ SIDA, están frecuentemente expuestas a parásitos entéricos, oportunistas y no oportunistas, tales como Coccidios y Microsporidios que causan diarreas crónicas en pacientes inmunocomprometidos especialmente en aquellos con recuento de linfocitos menores de 200 células /mm<sup>3</sup> (3).

Uno de los mayores problemas para los pacientes viviendo con VIH/ SIDA que padecen infecciones parasitarias es que los tratamientos además de ser específicos para determinado microorganismo a menudo fallan, causando infecciones crónicas que disminuyen la calidad de vida de la persona infectada, por lo tanto es importante establecer la metodología diagnóstica más apropiada para implementarla de manera rutinaria en los laboratorios clínicos de referencia que reciben muestras de personas viviendo con VIH/ SIDA. En la presente investigación se compararon métodos diagnósticos de parásitos intestinales emergentes y se estableció la prevalencia de los mismos en personas que viven con VIH /SIDA que asistieron a la Clínica Familiar “Luis Ángel García” del Hospital General San Juan de Dios durante un período de 6 meses.

### **III. ANTECEDENTES**

#### **A. Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida**

##### **1. Consideraciones generales**

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH – 1 y VIH – 2 ); en adelante VIH es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En promedio 3 a 6 semanas después de ser infectados con el VIH, entre 50 - 70% de los individuos, presentan historia de síndrome viral agudo. Los signos de la infección aguda incluyen: candidosis bucofaríngea, ulceraciones en el esófago o canal anal, desórdenes gastrointestinales o encefalitis aguda. Algunas de estas condiciones pueden durar de 1 a 3 semanas, y luego desaparecer (4). Desde el inicio de la infección se desarrollan una serie de eventos comenzando con la rápida diseminación del virus a través del cuerpo, infectando células blancas, particularmente en tejidos linfoides, pero también incluyendo células tipo en el cerebro, intestino y otros órganos. Algunas células tales como fibroblastos, no mueren y podrían servir como reservorios para la replicación viral (1,5). El linfocito T- CD<sub>4</sub> coordina un número importante de funciones inmunológicas y la pérdida de esas funciones resultan en deterioro progresivo de la respuesta inmune (1). La subsiguiente reacción del sistema inmune del hospedero en contra del virus lleva al desarrollo de anticuerpos neutralizantes y respuestas celulares tipo CD<sub>8+</sub>, que previenen el avance del virus, y colaboran con la reducción de la infección. Este periodo de relativa resistencia al VIH puede durar meses, o varios años. Finalmente el deterioro del sistema inmune lleva al aumento de la replicación del VIH y consecuentemente a la aparición de variantes patogénicas (4,6).

## 2. Etiología

VIH está clasificado como un virus de la familia de los retrovirus, la que incluye tres subfamilias: oncovirus, espumavirus y lentivirus, en esta subfamilia se incluye al VIH (1, 4,6).

Al SIDA, se han relacionado tres virus: el VIH – 1 grupo M (main), VIH – 1 grupo (outlier) y el VIH – 2, que ha sido relacionado con los lentivirus que infectan a los monos verdes del África, monos rizados, mandriles y chimpancés (4,7).

El VIH – 1 fue el primero en ser reconocido y aislado en tres diferentes laboratorios durante los años 1983 y 1984, mientras que el VIH – 2 fue aislado en 1986 en África. Se cree que el grupo M del VIH – 1 es el causante del 99% de los 12.9 millones de casos acumulados de SIDA hasta la fecha, en contraste con el grupo O que ha causado menos del 0.1%, posiblemente porque el virus O al igual que el VIH – 2, es menos transmisible (7).

## 3. Estructura del VIH

El VIH tiene una estructura de forma icosaédrica y al igual que otros retrovirus, el virión del VIH posee una cápside viral, la cual consiste de: a) una proteína principal de la cápside de 24,000 daltons llamada p24 b) una proteína de la nucleocápside p7 / p9, c) el genoma ARN (ácido ribonucleico) diploide de cadena sencilla, d) las tres enzimas virales: una proteasa, una transcriptasa inversa, que es capaz de transcribir su genoma ARN en una cadena doble de ADN (ácido desoxirribonucleico) y una integrasa. (7). La cápside viral está rodeada por una matriz interna de proteína de 17,000 daltons, que se encuentra por debajo de la envoltura del virión llamada p17, La matriz de proteínas está involucrada en los estadios tempranos de la replicación viral y juega parte en la formación y transporte de la pre-integración del ADN dentro del núcleo de la célula hospedera (6,7).

La envoltura del virión consiste de una membrana de doble capa lipídica, derivada de la célula huésped, y de una envoltura viral proteica compleja con forma tetrámerica en la que cada unidad consiste de dos proteínas de membrana unidas; las proteínas *gp* 120 (proteína externa o SU) y *gp* 41 (proteína transmembrana o TM). La proteína *gp* 41, es una proteína glicosilada de 41,000 daltons que esta prácticamente pegada a la *gp* 120. La proteína *gp* 120 que también es una proteína glicosilada, pero con un peso de 120,000 daltons, contiene una secuencia de aminoácidos que reconoce y fomenta la adhesión a la moléculas CD<sub>4</sub>, que son proteínas de 55 kD que se encuentran predominantemente en los linfocitos T ayudadores (linfocitos CD<sub>4</sub>). Así mismo, algunos monocitos/macrófagos y linfocitos B comparten secuencias parecidas con los linfocitos CD<sub>4</sub> en su superficie, por lo que también se ven perjudicados al verse infectados por el virus el cuál interfiere en el desarrollo y la función celular normal (7,8).

#### **4. Manifestaciones clínicas e infecciones oportunistas**

El SIDA se caracteriza por una profunda depleción de linfocitos T ayudadores que predispone al paciente a infecciones por protozoos, hongos, virus y bacterias oportunistas. Se ha demostrado que el riesgo de desarrollar enfermedad, es particularmente alto en personas VIH infectadas con un conteo de células CD<sub>4</sub> menor de 200 células / mm<sup>3</sup> (1,4).

La diarrea es una de las condiciones más comunes que complican la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana, y ocurre en al menos 50 - 60 % de los pacientes infectados, algunos autores la refieren como enteropatía del SIDA, y se caracteriza por malabsorción y atrofia de las vellosidades (9). Se ha postulado como mecanismo potencial la disfunción debida a invasión de los nervios autónomos del tracto gastrointestinal por el virus VIH (1,5). Además varios estudios establecen que el virus por sí mismo puede infectar las células enterocromafines, produciendo cambios estructurales en los enterocitos que alteran la permeabilidad intestinal, contribuyendo así a

esta diarrea idiopática (9,10). Se han reportado varios tipos de patógenos entéricos, incluyendo especies que anteriormente no se conocía que infectaran al humano, sin embargo la diarrea inexplicable permanece como un problema clínico común en esta población de pacientes. Se han postulado varias razones incluyendo efectos directos del VIH, disregulación inmune y patógenos no identificados (10).

En pacientes con SIDA, la diarrea crónica puede ser causada por diversos organismos, desde agentes bacterianos hasta protozoos (1). Entre las micobacterias que infiltran el intestino delgado en el marco de una enfermedad sistémica, el complejo *M. avium* es la más común, también puede presentarse *M. tuberculosis*, *M. kansasii* y *M. malmoense*, en este caso la micobacteria infiltra el intestino delgado, rompe las vellosidades e interrumpe la función absorptiva del intestino. Los pacientes con VIH/SIDA son particularmente susceptibles a infecciones severas por parásitos protozoos, coccidios y microsporidios. Coccidios de interés por su asociación al VIH/SIDA son *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli* (11).

Los microsporidios causan diarrea crónica y pérdida de peso en personas infectadas con VIH/SIDA, sin embargo la microsporidiasis es cada vez menos frecuente en pacientes infectados con VIH/SIDA debido al uso de la terapia antiretroviral (12,13).

Además de estos géneros los estudios reportan altas tasas de parásitos patógenos asociados al VIH/SIDA especialmente en países en vías de desarrollo. Tal es el caso de un estudio realizado en Brazil en 1995 que reporta altas tasas de prevalencia *Ascaris lumbricoides*, *Giardia lamblia* y *Strongyloides stercoralis* en heces de pacientes infectados con Virus de Inmunodeficiencia Humana (10).

## 5. Epidemiología

Los reportes epidemiológicos de *Cryptosporidium parvum* y *Cyclospora cayetanensis*, indican bajas prevalencias de los mismos aún en personas con algún tipo de inmunodeficiencia, Bern *et.al* reporta en 1997-1998 una prevalencia de 2.1% para *C. cayetanensis* y 1.2% para *C. parvum*, indicando además que *C. cayetanensis* tiene una mayor estacionalidad que *C. parvum*, y esta más fuertemente asociado con diarrea (14,15).

Pratdesaba *et.al* reportan distintas prevalencias para grupos a riesgo, en un estudio realizado en 1999–2000, *C. cayetanensis* fue observada en 7 de 747 (1.5%) muestras, distribuida como sigue: en 6 de 157 personas con VIH/SIDA, (3.8 %) y en 1 de 111 niños desnutridos (0.9%) (16). Vela C. Reporta en un estudio realizado en 1999-2000 prevalencia de 4.20% para *C. parvum* y 0.70% para *Isospora belli* (17). Medina, M. reporta una prevalencia del 1% de microsporidiosis en pacientes con SIDA, en su trabajo de tesis realizado durante 1999 en el Hospital Roosevelt de esta capital (13).

## B. Parásitos intestinales

A continuación se detallan los parásitos intestinales que se consideran emergentes, debido a su asociación al VIH / SIDA, todos cuentan con la característica de infectar de manera activa a las personas que poseen algún tipo de inmunodeficiencia; En los últimos 20 años se ha observado una mayor incidencia de los mismos, la que coincide más o menos con el tiempo de los primeros reportes de casos de VIH /SIDA.

### 1. *Cryptosporidium parvum*

#### a. Agente causal

Los parásitos protozoos del género *Cryptosporidium* infectan una amplia variedad de hospederos. Son transmitidos a humanos a través de beber agua contaminada, el contacto con

animales infectados y el contacto con personas infectadas (18). En 1885 J.J. Clarke, fue el primero en observar especies de *Cryptosporidium*, describiéndolas como “multitud de esporas viviendo bajo el epitelio gástrico del ratón”. Estos organismos eran probablemente merozoítos de *C. muris*, especie descrita doce años después por el parasitólogo E.E. Tyzer. En 1912, Tyzzer describió mucho de la morfología y ciclo de vida de una segunda especie, *C. parvum* en ratones de laboratorio, subsecuentemente fue encontrado en pollos, ratas, perros, gatos y humanos. (19,20). Taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera: Reino Protista, Subreino protozoa, Phylum *Apicomplexa*, Clase *Sporozoa*, Subclase *Coccidia*, Orden *Eucoccidia*, Suborden *Eimeriina*, Familia *Cryptosporidiida*, Género *Cryptosporidium* (17,20). *Cryptosporidium parvum* es un pequeño protozoo que invade y se replica dentro de las microvellosidades de las células epiteliales digestivas y órganos respiratorios de vertebrados, el ooquiste posee forma redonda o ligeramente ovalada, mide de 4 a 6 micras de diámetro, contiene 4 esporozoitos, estos infectan las células epiteliales del intestino para transformarse en trofozoítos, es importante mencionar que todos los estadios del parásito se encuentran en la superficie de varias membranas epiteliales, nunca a dentro del citoplasma.(20,21).

El ciclo de vida completo de *Cryptosporidium* ocurre en un solo hospedero. La infección en humanos se inicia con la ingestión de ooquistes, seguida de la exquistación o liberación de cuatro esporozoitos en el lumen del tracto gastrointestinal. Los esporozoitos, se pegan en las células epiteliales, luego se desarrollan a esquizontes en la superficie luminal del epitelio. Después de la implantación, el esporozoito evoluciona a trofozoito y seguidamente a esquizonte o meronte tipo I que contiene ocho distintos merozoitos. Estos merozoitos son liberados y pueden reiniciar la esquizogonia o entrar en la fase sexual del ciclo donde el meronte tipo II evoluciona a gametocito. La fertilización de los microgametocitos y macrogametocitos da como resultado la formación del ooquiste, el cual es excretado al medio ambiente por medio de las heces (Anexo 1) (21,22).

Se conocen dos tipos de ooquistes: uno de pared gruesa que constituye cerca del 80% de la población de ooquistes, no sufre cambios durante el paso por el intestino, se secreta en las heces y puede infectar hospederos susceptibles por vía oral. El otro tipo de ooquiste tiene la pared delgada, puede exquistarse de manera endógena, liberar esporozoitos y dar origen a un ciclo endógeno (22). *Cryptosporidium*, es un parásito de localización intracelular, extracitoplásmica, cada estadio intracelular se ubica dentro de una vacuola parasitofora dentro de la región de las microvellosidades de la célula del hospedero, los ooquistes se mantienen en esporogonia mientras permanecen en la célula hospedera y se hacen inmediatamente infectivos cuando pasan a las heces (20-22).

#### **b. Distribución Geográfica**

Desde el primer caso reportado de criptosporidiosis humana en 1976, *Cryptosporidium* ha sido encontrado a escala mundial, se han reportado epidemias de criptosporidiosis en muchos países, la más notoria ocurrió en 1993 en Milwaukee (Wisconsin), relacionada a una fuente de agua, afectando a más de 400,000 personas (20, 23).

Más de 40 mamíferos sirven como reservorios para *Cryptosporidium*, por lo que para personas que viven y trabajan en medio ambiente en el cual están expuestos a contaminación fecal la transmisión es potencialmente zoonótica, aunque ésta, también puede ocurrir de persona a persona vía feco-oral. Los ooquistes de *Cryptosporidium* son altamente infecciosos cuando son liberados en las heces aún en pequeña cantidad, por lo que el potencial de transmisión entre hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y que practican sexo oro-anal es alto. *Cryptosporidium* posee variación estacional, se ha encontrado con mayor frecuencia durante el inicio de la época lluviosa (24,25).

#### **c. Características Clínicas**

La infección por *Cryptosporidium parvum* tiene un amplio rango de manifestaciones que van desde infección asintomática a infección severa y enfermedad de por vida. La diarrea acuosa es

el signo más frecuente, y puede estar acompañada por deshidratación, pérdida de peso, dolor abdominal, fiebre, náusea y vómitos. En personas inmunocompetentes, los síntomas son usualmente de corta duración (1 a 2 semanas); estos pueden volverse crónicos y más severos en pacientes inmunocomprometidos, especialmente aquellos con recuentos de células CD<sub>4</sub> menores a 200 células / mm<sup>3</sup>. El intestino delgado es el sitio más comúnmente afectado por las infecciones sintomáticas de *Cryptosporidium*, aunque se ha encontrado en otros órganos incluyendo los del tracto digestivo, pulmones y posiblemente el tejido conjuntivo (25-27).

Además de la diarrea, la criptosporidiosis puede presentar otros tipos de manifestaciones clínicas dependiendo del grado de inmunocompromiso. Se pueden hallar infecciones por *C. parvum* en el tracto respiratorio y presentarse como neumonías, se puede encontrar en las vías pancreáticas y en vías biliares, con desenlaces que varían desde colecistitis aguda hasta colangitis esclerosante. Como conclusión a su estudio Valkil *et.al* plantean que toda persona infectada con *Cryptosporidium parvum* que además presente valores de CD<sub>4</sub> menores de 50 células/mm<sup>3</sup> están en riesgo de desarrollar algún problema biliar por esta causa (28).

#### **d. Diagnóstico**

Antes de 1980, el diagnóstico de criptosporidiosis requería la identificación de *Cryptosporidium parvum* en la región de las microvellosidades de la mucosa del intestino con material obtenido por biopsia, con el desarrollo de técnicas alternativas para el análisis de muestras de heces, este procedimiento invasivo no es necesario (29,30).

Actualmente el diagnóstico de la infección se puede realizar por métodos de microscopía, ensayos enzimáticos inmunológicos, y por métodos moleculares (28-30). El método de referencia usado en los laboratorios clínicos es la tinción con Ziehl-Neelsen modificado en la que los ooquistes aparecen como estructuras esféricas, ácido resistentes de 4 a 6 micras de diámetro, este método se

puede aplicar con o sin concentración de las heces, la técnica de concentración más utilizada es la flotación en sucrosa de Sheather. En los laboratoris dedicados a la investigación, la microscopia de inmunofluorescencia es el método de elección, debido a su gran sensibilidad y especificidad seguido muy de cerca por los inmunoensayos enzimáticos, actualmente no se dispone comercialmente de ensayos serológicos para la detección de anticuerpos específicos contra *Cryptosporidium*, sin embargo los exámenes de inmunoblots para detección de los antígenos 17 y 27 kdaltons del esporozoito asociados a infección reciente pueden ser usados para investigaciones epidemiológicas. Los métodos moleculares son principalmente una herramienta de investigación (29,31).

#### **e. Tratamiento**

No existe tratamiento específico para la criptosporidiosis. En las personas con VIH/SIDA se considera a la paromomicina el tratamiento de elección aunque aparezcan recidivas (32,33). La respuesta de la criptosporidiosis de las vías biliares no alcanza ni a la mitad de los pacientes tratados (33). Como terapia adyuvante se puede utilizar loperamida o los opiáceos. En todos los casos es necesario realizar rehidratación por vía oral o parenteral. Otro fármaco utilizado ha sido la espiramicina cuya eficacia se sugirió en personas inmunocompetentes pero que en las personas con VIH/SIDA es de valor limitado. Las inmunoglobulinas derivadas del calostro bovino se han administrado en forma de polvo, consiguiendo una mejoría significativa en el número de deposiciones y su volumen, pero continúa sin ser establecida la dosis óptima del tratamiento (33,34).

## 2. *Cyclospora cayetanensis*

### a. Agente causal

*Cyclospora* es un protozoo intestinal causante de diarrea, fue observado por primera vez por Eimer en 1870 en el intestino de un topo (30). Inicialmente se pensó que se trataba de un microorganismo propio únicamente de animales, pero en 1979 Ashford, lo reportó por primera vez como un coccidio desconocido en algunas muestras de heces recogidas de tres habitantes de Papua, Nueva Guinea (35,36). Desde 1979 hasta 1993 este parásito fue conocido como “Cyanobacterium like bodies” cuerpos parecidos a cianobacterias, por considerarlos algún tipo de alga verde azul, y también como *Cryptosporidium* grande, sin embargo, gracias a las investigaciones realizadas por Ortega *et al.*, en la Universidad Peruana Cayetano Heredia de 1988 a 1991, se estableció un nuevo género dentro de los coccidios. El nombre otorgado por el equipo de investigadores al nuevo género fue *Cyclospora cayetanensis*, en honor al lugar donde se realizaron las investigaciones (38,39). Esta ubicado taxonómicamente en: Reino Protista, Subreino protozoa, Phylum *Apicomplexa*, Clase *Sporozoa*, Subclase *Coccidia*, Orden *Eucoccidia*, Suborden *Eimeriina*, Familia *Eimeriidae*, Género *Cyclospora* (37,38). *Cyclospora cayetanensis* se observa como un ooquiste de forma esférica u ovoide de 8 a 10 micras de diámetro, no refráctil, con pared lisa (37). Para su reconocimiento a la microscopía de luz, se tiñe con métodos tintoriales de alcohol ácido resistencia, adicionalmente, los ooquistes pueden observarse con un microscopio de epifluorescencia con filtro de 450nm. Los ooquistes autoflorecen de color azul verdoso (37).

El ciclo de vida completo de *Cyclospora cayetanensis*, aún permanece en estudio. Ortega *et al.* demostró que en las heces de la persona infectada se encuentra el estado inmaduro del organismo, requiriendo de 5 a 7 días para la maduración de los ooquistes con la consecuente formación de 2 esporozoitos cada uno (40). Se conoce poco acerca del periodo de incubación, sin embargo se ha reportado que los pacientes desarrollan la infección entre 2 y 11 días después de que se sospecha que se ha infectado (41,42). Se desconoce si el humano es el único hospedero definitivo para

*Cyclospora cayetanensis* y si existe la posibilidad de que un hospedero intermediario participe en el ciclo de vida (Anexo 2) (20).

### **b. Distribución Geográfica**

La infección por *Cyclospora cayetanensis* se ha reportado en personas que viven o que han visitado Asia, Papua nueva Guinea, Indonesia, Pakistán, Nepal, Medio Oriente, Norte y Sur de África, Reino Unido, Islas del Caribe, Estados Unidos de América, Centro y Sur América (18,20).

El primer reporte de infección humana en Guatemala, fue hecho por Velásquez. T. en 1994 (37). Desde entonces, el organismo se ha reportado entre personas con VIH/SIDA y en algunos casos en pacientes externos en los hospitales departamentales (35,36). Antes de 1995 fue reportado principalmente como causa de gastroenteritis entre niños que viven en condiciones sanitarias pobres, y en adultos de países industrializados que viven o viajan en países en vías de desarrollo (29). *Cyclospora cayetanensis* esta relacionada, a fuentes de agua contaminada, y contaminación fecal-oral (34).

### **c. Características Clínicas**

En personas con VIH/SIDA la infección con *Cyclospora cayetanensis*, se asocia con una enfermedad diarreica crónica y posiblemente fatal (20,22). Las manifestaciones en general incluyen malestar y baja fiebre, seguido por diarrea acuosa explosiva, dolor abdominal severo, náusea, fatiga y pérdida de peso. La remisión de la diarrea ocurre después de 3-4, días pero es seguida por un ciclo de recaídas y remisiones que puede durar más de 4 semanas. Durante los períodos de remisión los pacientes pueden padecer de malestar y anorexia, algunas veces acompañadas de tenesmo. La enfermedad puede tener una duración media de 7 semanas. En estudios realizados en poblaciones grandes de pacientes con SIDA se ha reportado una duración media de la enfermedad de 43+/- 24 días (14, 18, 22).

#### **d. Diagnóstico de Laboratorio**

El diagnóstico de laboratorio se basa en la visualización del organismo en la muestra de heces. El parásito es observado en preparaciones en fresco, usando microscopía de contraste de fases o de campo claro. Su presencia puede ser confirmada mediante luz ultravioleta o mediante un frote delgado de heces teñido con Ziehl-Neelsen modificado (35). En preparaciones en fresco, aparece como ooquistes hialinos, no refráctiles de 8 a 10 micras de diámetro, con una pared externa bien definida, contienen una morula verdosa de 6 a 7  $\mu\text{m}$  de diámetro compuesto de 6 a 9 glóbulos de material claro semejante a lípido por su refractilidad (34,36). La esporulación de los ooquistes puede ser inducida por medio de incubación en dicromato de potasio acuoso al 2.5% (14). Otros métodos diagnósticos de utilidad y que poseen una sensibilidad y especificidad mayor que las tinciones son los métodos de fluorescencia, los que permiten observar el ooquiste autofluorescen de color verde o azul en epifluorescencia azul sin que sus estructuras internas reaccionen (37-39). Actualmente se utilizan los métodos de diagnóstico molecular pero principalmente como una herramienta de investigación (40,41).

#### **e. Tratamiento**

El tratamiento de elección es trimetoprim - sulfametoxazol, que consigue la curación clínica en un plazo inferior a tres días en el 100% de los casos, pero no la parasitológica: después de 3 días de tratamiento aparece el parásito en el 71% de las muestras y después de siete días en el 6%; si se repite el esquema de tratamiento, a los siete días no parecen existir recaídas (36). La profilaxis secundaria con trimetoprim-sulfametoxazol tres veces por semana ha demostrado ser eficaz, en estudios no controlados, para prevenir recidivas en tratamientos de corta duración. En todos los casos es necesaria la terapia de rehidratación oral (32).

### 3. *Isospora belli*

#### a. Agente Causal

Fue descrito por primera vez en 1860 por Virchow, pero fue denominado *Isospora belli* hasta 1923 (34,36). Afecta a adultos y niños de forma transitoria, pero puede llegar a hacerse crónico en pacientes inmunocomprometidos, en los que la diarrea es grave. También ha sido implicado como agente etiológico de la diarrea del viajero. Es la única especie de *Isospora* que parasita al hombre, ya que la especie inicialmente descrita como *Isospora hominis* es actualmente una especie de *Sarcocystis* (18,19). El hombre es el único hospedero conocido de *I. belli*, aunque se desconoce si algunos animales podrían actuar como hospederos paraténicos, lo que explicaría su transmisión por un mecanismo distinto a la contaminación fecal del agua o alimentos en áreas con adecuadas condiciones sanitarias. Los ooquistes son muy resistentes a las condiciones medioambientales, pudiendo permanecer viables durante meses en ambientes frescos y húmedos. También se ha descrito la transmisión sexual como consecuencia de prácticas de sexo oro-anal (37,39). *Isospora belli* es un protozoo, coccidio taxonómicamente clasificado en la siguiente forma: Reino Protista, Subreino *protozoa*, Phylum *Apicomplexa*, Clase *Sporozoa*, Subclase *Coccidia*, Orden *Eucoccidia*, Suborden *Eimeriina*, Familia *Eimeriidae*, Género *Isospora* (19,20). Los ooquistes de *Isospora belli* tienen forma ovalada con un tamaño de 20 a 30  $\mu\text{m}$  por 10 a 19  $\mu\text{m}$ . En su interior contiene dos esporoquistes que a su vez contienen 4 esporozoitos cada uno, todo esto rodeado de una membrana de doble contorno (20-22). La infección se adquiere por la ingestión del ooquiste esporulado a partir de agua y alimentos contaminados. El ciclo evolutivo puede durar de 21 a 120 días y se ha descrito como monoxeno, el ooquiste se esquista liberando esporozoitos 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 trofozoitos. Estas formas entran en la fase de esquizogonia, un estado asexual en el que desarrollan a esquizonte maduro conteniendo múltiples merozoitos. Estos merozoitos son liberados y pueden infectar otras células

epiteliales. Algunos merozoítos dan origen a microgamontes que maduran a macrogametos. La fertilización del macrogameto por el microgameto produce un ooquiste inmaduro, de esta forma se completa el ciclo de vida (Anexo 3) (18,19).

#### **b. Distribución Geográfica**

Las infecciones por *Isoospora belli*, aunque de distribución cosmopolita, son más frecuentes en regiones tropicales y subtropicales, especialmente en Haití, México, Brasil, El Salvador, África tropical y sureste asiático y se han asociado con brotes diarreicos en instituciones cerradas, inmigrantes y personas infectadas con VIH/SIDA. La incidencia de infección por *Isoospora belli* varía de un 0.2 a 0.3% en pacientes con SIDA en Estados Unidos, a un 8 a 20% en África (38,39).

#### **c. Características Clínicas**

La sintomatología de la infección por *Isoospora belli* aparece aproximadamente una semana después de la ingestión de los ooquistes. Se caracteriza por diarrea, dolor abdominal, febrícula, pérdida de peso y deshidratación, pudiéndose observar eosinofilia en algunos pacientes. En pacientes inmunocompetentes el síntoma principal es una diarrea intensa con 6 a 8 deposiciones acuosas diarias acompañadas de mala absorción. La enfermedad es autolimitada en un periodo de 2 a 3 semanas, aunque la eliminación de ooquistes puede persistir durante 2 a 3 semanas más. Se han descrito formas crónicas con eliminación de ooquistes durante meses, siendo comunes las recurrencias. La enfermedad es más grave en niños y adolescentes. Los pacientes inmunodeprimidos, especialmente pacientes con VIH/SIDA, presentan síntomas graves que pueden persistir durante meses o indefinidamente y producir deshidratación, requiriendo hospitalización. Se han descrito presentaciones atípicas de la infección, como colecistitis o artritis reactiva. En pacientes con SIDA se han documentado infecciones extraintestinales (23,33).

#### **d. Diagnóstico de laboratorio**

El examen directo de las heces frescas o concentradas es el método de detección de la infección por *I.belli*, ya que los ooquistes son visibles al microscopio óptico sin teñir. Es frecuente la aparición de cristales de Charcot-Leyden (37,38). En las heces recién emitidas los ooquistes son ovalados, de 20 a 30 micras por 10 a 19 micras y generalmente contienen uno o dos esporontes inmaduros. El ooquiste maduro, que a su vez incluye dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno, aunque se desarrolla en el medio externo, puede ocasionalmente observarse en las heces, siendo la forma infecciosa para el hombre. También puede ser visualizada por epifluorescencia en muestras frescas (39, 22).

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*. Los métodos de tinción sobre frotis de muestras concentradas pueden ayudar a la detección de los ooquistes de *I. belli*. La tinción de ácido resistencia modificada (Ziehl-Neelsen modificado) tiñe los ooquistes de rosa y los esporontes o esporoblastos de rojo. Los ooquistes 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* (37,38).

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 (39).

## **e.Tratamiento**

Se han usado muchos agentes para tratar las infecciones por *I. belli*. Las combinaciones de inhibidores de la dihidrofolato reductasa timidilato sintetasa, como el trimetoprim (TMP) o la pirimetina, con sulfonamidas como el sulfametoxazol (SMT) sulfadiazina son de probada eficacia, siendo el cotrimoxazol (TMP SMX) el tratamiento de elección (34,35). En un estudio de pacientes con VIH/SIDA tratados con TMP SMX cuatro veces al día durante 10 días, la diarrea y el dolor abdominal desaparecía al cabo de uno a seis días después del tratamiento y todas las muestras de heces examinadas al final del mismo fueron negativas. Se ha sugerido que los pacientes con VIH/SIDA que viajen a zonas endémicas reciban quimioprofilaxis con TMP SMX (35,37).

## **4. Microsporidiosis**

### **a. Agentes Causales**

Se consideran como patógenos del hombre 6 géneros de microsporidios *Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*, *Pleistophora*, *Nosema*, *Vittaforma*, y *Trachiplestophora* (42,43). Estos parásitos son muy pequeños, del tamaño de las bacterias cocoides, miden alrededor de 1 micrómetro, contienen 1 ó 2 núcleos y un filamento polar, también denominado túbulo polar, el cuál se encuentra en espiral en el interior de la célula, no se les conocen ni mitocondrias, ni ribosomas. Los túbulos polares permiten la penetración del esporoplasma (núcleo y citoplasma) en el interior de la célula a parasitar (43,44). *Enterocytozoon bienersi*, mide de 2 a 4 micras, se identifica dentro de los enterocitos de la pared del intestino del hombre, al nivel de la región supranuclear del citoplasma, penetra al citoplasma del enterocito a través de los túbulos polares. Ya en el interior de la célula, los parásitos se multiplican por merogonia (división binaria) y por esporogonia (producción de esporas) (43). Se asocia en forma muy importante a pacientes con VIH/SIDA, en los que provoca diarrea crónica, en todo el mundo. La infección se adquiere por la ingestión de

esporas por contaminación fecal o urinaria, con los productos biológicos de un ser humano infectado pero también es posible que la fuente de infección sea a partir de animales

infectados (41 ). *Encephalitozoon cuniculi* y *E. hellem*, este es uno de los microsporidios con mayor capacidad de diseminación tisular sistémica, se diagnostican casos en el hombre a nivel peritoneal, riñón, pulmón, hígado, ojo y sistema nervioso central, de hecho esta última localización es la más frecuente (43). *Encephalitozoon intestinalis*, se localiza en intestino, vías biliares, respiratorias, urinarias y ojo (45). *Nosema connori* o *corneum*, se localiza en intestino, vías biliares, vías respiratorias, urinarias, ojo y además en el aparato cardiovascular (43). Una vez que el parásito llega al intestino delgado, invade los enterocitos, y en una misma célula se divide utilizando 3 mecanismos distintos: fisión binaria o merogonia, multiplicación múltiple o esquizogonia, y por producción de esporas o esporogonia, todo esto sucede dentro de una vacuola parasitofora, la cuál finalmente se rompe y deja libres a las esporas, las que pasan a través de los túbulos o filamentos polares a una nueva célula. La excreción de las formas parasitarias se realiza en las heces, pero también pueden salir del huésped parasitado en la orina (Anexo 4) (43,44).

#### **b. Distribución geográfica**

En la literatura los reportes de prevalencia generalmente se refieren a grupos de población muy específicos tales como personas que viven con VIH/SIDA o niños desnutridos (43-46). En 1985 se reportó el primer caso de *E. bienersi* como patógeno oportunista asociado al SIDA (45). Los casos iniciales de microsporidiosis se relacionan a pacientes de Estados Unidos de América y el oeste de Europa, los últimos casos han sido documentados en África y Australia, más recientemente se han documentado casos en España, Italia, Brasil, Chile, Mali, Nueva Zelanda y Tailandia ( 43). En Guatemala se realizó un estudio entre los años 1999 y 2000 sobre la prevalencia de

microsporidios en pacientes con SIDA que acuden a la Clínica de infectología del Hospital Roosevelt, encontrándose una prevalencia del 1% de estos microorganismos (13,42).

### **c. Características clínicas**

La enfermedad en pacientes con microsporidiosis varía considerablemente. El síndrome clínico asociado con infección por *E. intestinales* y *E. bienewisi* son similares y típicos de mala absorción un pequeño porcentaje de pacientes no presenta diarrea, pero si evidencias de mala absorción. Los pacientes típicamente tienen de 3 a 10 deposiciones diarreicas diarias no asociadas a fiebre. El volumen de cada deposición puede variar ampliamente y la diarrea se ha descrito como acuosa (44,45). Los episodios de diarrea ocurren a intervalos regulares durante el día a menudo acompañados de flatulencia excesiva, puede haber alteración en el olor de las heces y el flato, el cuál es pútrido (46). Los pacientes con enfermedad ligera describen una intolerancia específica a la lactosa y las grasas, mientras aquellos con síntomas más severos se ven afectados por casi todos los alimentos que consumen. En los casos severos hay deshidratación y anormalidades electrolíticas, particularmente hipocalemia, hipomagnesemia y concentraciones disminuidas de bicarbonato serico (43,45). Algunos pacientes voluntariamente comen menos para evitar los síntomas, mientras en otros no se ve afectado el apetito. Problemas asociados incluyen resequedad de boca, hipoclorhidria, disminución de la secreción pancreática y prolongación del tránsito intestinal y pérdida de peso (43,44).

### **d. Diagnóstico de laboratorio**

El cromótopo 2R, y la tinción tricrómica modificada se han utilizado para detectar esporas en heces. Ocasionalmente las levaduras o las bacterias toman la tinción del cromótopo pero difieren de *E. bienewisi* en forma y tamaño (41,44). La ventaja de usar esta tinción es que se pueden usar muestras de heces sin preparación especial o fijación en formalina. Un método alternativo

usando el fluorocromo calcoflúor, es efectivo. Se ha encontrado que la tinción tricrómica y el calcoflúor son equivalentes en el número de detecciones exitosas de microsporidios (43). Algunos laboratorios han obtenido resultados exitosos identificando microsporidios en heces y otras muestras clínicas, con una variedad de técnicas tales como la hibridación *in situ* o la reacción en cadena de la polimerasa PCR (42-45)

#### **e. Tratamiento**

Dos agentes fumagillina y albendazol han demostrado tener actividad contra microsporidios tanto *in vivo* como *in vitro* (45,47,49). A pesar de los reportes iniciales favorables del tratamiento con metronidazoles para la infección intestinal por *E. bienersi*, esta droga no ha sido efectiva en estudios posteriores y no muestra actividad *in vitro* contra *E. cuniculi* (46). Otros agentes usados sin éxito en el tratamiento de microsporidiosis intestinal son azitromicina, paromomicina y quinacrina (43,48, 49).

## IV. JUSTIFICACIÓN

La diarrea es un problema clínico particularmente común en pacientes que viven con VIH/SIDA. La etiología de estas diarreas puede ser bacteriana, viral o parasitaria.

Algunos estudios alrededor del mundo asocian la presencia de parásitos coccidios como causantes de diarrea crónica en pacientes inmunocomprometidos. Coccidios de interés por su asociación al VIH/SIDA son *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*. La forma infectiva de estos es el ooquiste, el cual suele ser expulsado en las heces de animales y humanos que se encuentran infectados. Además de los coccidios, se han asociado al VIH/SIDA los microsporidios cuya forma infectiva es la espora.

Los pacientes viviendo con VIH/ SIDA que padecen infecciones parasitarias necesitan de tratamientos diferentes que a menudo fallan, por lo que el microorganismo es difícil de erradicar causando síndromes diarreicos crónicos, por lo tanto, el diagnóstico apropiado es de suma importancia.

Por lo anteriormente expuesto, fue importante establecer la metodología diagnóstica más adecuada para implementarla de manera rutinaria en los laboratorios clínicos de referencia que reciben muestras de personas viviendo con VIH/ SIDA.

#### **IV. OBJETIVOS**

1. Comparar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la hematoxilina férrica modificada con respecto a la tinción de Zielh-Neelsen para el diagnóstico de coccidios intestinales.
2. Comparar la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la tinción Tricrómica modificada, con respecto a la Tinción Blanco de Calcoflúor para el diagnóstico de Microsporidios.
3. Determinar la prevalencia de parásitos intestinales emergentes en personas viviendo con VIH/SIDA, que asisten a la Clínica Familiar “Luis Ángel García” del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala.
4. Determinar factores asociados con la presencia de parásitos intestinales emergentes en personas viviendo con VIH/SIDA, que asisten a la Clínica Familiar “Luis Ángel García” del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala.

## **VI. HIPÓTESIS**

1. La sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la coloración Ziehl-Neelsen usada como método de referencia para el diagnóstico de coccidios intestinales, son similares, a la observada cuando se utiliza la hematoxilina férrica modificada.
2. La sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la coloración tricrómica modificada son similares a la observada cuando se utiliza la coloración blanco de calcoflúor para el diagnóstico de microsporidios.

## **VII. MATERIALES Y METODOS**

### **A. Universo:**

El universo de trabajo lo constituyeron todas las muestras de heces de personas que viven con VIH / SIDA, que consultaron por primera vez la clínica familiar “Luis Ángel García” del Hospital General San Juan de Dios.

### **B. Muestra:**

Muestras de heces de 100 personas que viven con VIH / SIDA que consultaron a la clínica familiar “Luis Ángel García” del Hospital General San Juan de Dios, por primera consulta durante los meses de octubre de 2002 a febrero de 2003.

### **C. Recursos Humanos:**

Tesista: Br. Karla Odett Escobar Castro

Asesores: *MSc.* Blanca Samayoa Herrera

*MSc.* Rafael Pratdesaba Zea

### **D. Recursos institucionales**

Hospital General San Juan de Dios

Clínica Familiar Luis Ángel García

Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá

## **E. Recursos Materiales**

### **1. Equipo:**

- Centrífuga
- Hielera
- Microscopio de luz
- Microscopio de fluorescencia
- Balanza analítica
- Micropipeta automática
- Tubos de centrífuga
- Viales de 10 ml
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos

### **2. Reactivos:**

- Cloruro de sodio
- Agua desmineralizada
- SAF
- Hematoxilina
- Etanol
- Sulfato ferroso amónico
- Sulfato férrico amónico

- Ácido clorhídrico
- Lugol
- Ácido Pírico
- Fucsina básica
- Fenol
- Aceite de inmersión

## **F. Metodología**

El proceso de muestreo se llevó a cabo del mes de septiembre 2002 al mes de febrero 2003. Las muestras fueron colectadas en recipientes especiales en el Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios, de lunes a viernes de 8.00 AM a 9:00 AM. Posteriormente fueron transportadas al Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), donde fueron procesadas y evaluadas microscópicamente.

Se elaboró una boleta de solicitud de muestra y colección de datos, que incluyó una serie de preguntas relacionadas con datos personales de los pacientes, así como hábitos y costumbres de relevancia para el estudio, y una boleta de datos epidemiológicos que fue llenada por la tesista consultando las historias clínicas de los pacientes en la Clínica Familiar “Luis Ángel García” por lo que no se solicitó el consentimiento escrito a cada paciente (Anexos 5 y 6).

Las muestras procesadas se evaluaron microscópicamente por 4 coloraciones Zielh–Neelsen modificado, para identificar *C. cayetanensis*, *C. parvum* . Calcoflúor y Tricrómico modificado para microsporidios, Hematoxilina férrica modificada para *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum*, además se evaluó frotis en fresco con solución salina al 0.85% y con Lugol, para determinar la presencia de otros parásitos intestinales de importancia clínica.

Los resultados de la evaluación microscópica de las muestras fueron reportados oportunamente al personal médico de la Clínica Familiar, en apoyo al diagnóstico clínico de los pacientes durante el estudio.

#### **G. Diseño de estudio:**

Este es un estudio de prevalencia, descriptivo, no probabilístico, transversal. Todos los datos obtenidos de la boleta de colección de datos y de la historia clínica así como de la evaluación microscópica fueron debidamente tabulados e ingresados en el programa Epi-info versión 6.04 b donde posteriormente fueron analizados.

El análisis de datos se hizo con la información tabulada de las boletas de datos e historia clínica con el fin de evaluar factores asociados en la población en estudio y los resultados obtenidos con las tinciones realizadas para determinar prevalencia.

La prevalencia se determinó dividiendo el número de muestras positivas de cada parásito, sobre el número total de muestras evaluadas y multiplicando este por 100.

Se llevó a cabo un análisis univariado a través del uso de frecuencias seguido de un análisis bivariado por la prueba de chi-cuadrado.

Se determinó además la Sensibilidad y Especificidad de cada coloración así como el Valor predictivo positivo y el Valor predictivo negativo, eficacia y coeficiente de concordancia.

## **H. Procedimiento experimental:**

Cada muestra se proceso de la siguiente manera:

### **1. Observación en fresco:**

- Se colocó una porción de heces aprox. 1 gr. En tubo de fondo cónico
- Se agregó 5 mL. de solución salina al 0.85%
- Se mezcló con varilla de vidrio y se tapo con papel parafilm
- Se centrifugó durante 5 minutos
- Se decantó el sobrenadante
- Se colocó en una lámina portaobjetos una porción del sedimento, se mezcló con solución salina y se cubrió con cubreobjetos, luego se colocó otra porción igual de sedimento y se mezcló con solución de lugol, se y cubrió con cubreobjetos.
- Se observó al microscopio en busca de trofozoítos móviles de protozoos, larvas y huevos de helmintos, así como quistes y ooquistes de protozoos.

### **2. Coloraciones:**

#### **a. Zielh Neelsen Modificado**

- Se hizo un frote delgado de heces del sedimento y se fijó al calor
- Se colocó en una gradilla para colorear, y cubrirlo con carbolfucsina
- Se flameó hasta que el colorante despidió vapores blancos o durante 5 minutos. No se dejó que hierviera
- Se lavó en agua corriente
- Se decoloró con alcohol ácido 2 minutos

- Se lavó con agua corriente
- Se cubrió con azul de metileno durante 1 minuto
- Se lavó con agua y se dejó secar al aire
- Se observó al microscopio en busca de ooquistes alcohol ácido resistentes

#### **b. Hematoxilina Férrica Modificada**

- Se hizo un frote delgado del sedimento: Se colocó una gota del sedimento en una lámina portaobjetos y se mezcló con una gota de albúmina de Mayer
- Se dejó secar a temperatura ambiente
- Se colocó el frote en etanol al 70% por 5 minutos
- Se lavó bajo el agua del chorro por 2 minutos
- Se colocó en carbol fucsina por 5 minutos
- Se lavó bajo el agua del chorro por 1 minuto
- Se colocó en alcohol ácido por 4 minutos
- Se lavó bajo el agua del chorro por 1 minuto
- Se colocó en solución de hematoxilina por 8 minutos
- Se colocó en agua destilada por 1 minuto
- Se colocó en solución de ácido picríco por 3-5 minutos
- Se lavó bajo el agua del chorro por 10 minutos
- Se colocó en etanol al 70% con amoníaco por 3 minutos
- Se colocó en etanol al 95% por 5 minutos
- Se colocó en etanol al 100% por 5 minutos

- Se dejó secar al aire y se observó en busca de quistes y ooquistes de protozoos, así como huevos de helmintos.

#### **c. Calcoflúor**

- Se hizo un frote delgado del sedimento
- Se dejó secar a temperatura ambiente
- Se colocó en metanol absoluto durante 5 minutos
- Se añadió calcoflúor por 5 minutos
- Se lavó con agua del chorro
- Se añadió Azul de Evans por 1 minuto
- Se lavó con agua del chorro
- Se dejó secar
- Se examinó al microscopio de fluorescencia con aumento de 1000x utilizando un filtro de 395 ó 415 nm, en busca de esporas de color celeste (2-4  $\mu\text{m}$  x 1-2  $\mu\text{m}$ ) sobre fondo oscuro

#### **d. Tricrómico modificado**

- Se hizo un frote delgado del sedimento
- Se dejó secar a temperatura ambiente
- Se colocó en metanol absoluto durante 5 minutos
- Se agregó Chromotrope 2R y se mantuvo durante 30 minutos a 37°
- Se lavó con alcohol ácido por 10 segundos
- Se lavó con etanol al 95% por 10 segundos
- Se colocó en jarra de Koplík con etanol al 95% por 5 minutos (repetir)
- Se colocó en jarra de Koplík con etanol al 100% por 10 minutos
- Se colocó en jarra de Koplík con xileno por 5 minutos

- Se dejó secar al aire
- Se examinó bajo el microscopio en aumento 1000X en busca de esporas color rojo (2-4  $\mu\text{m}$  x 1-2  $\mu\text{m}$ ) sobre fondo verde grisáceo.

## VIII. RESULTADOS

Durante un periodo de 6 meses se evaluaron muestras de heces provenientes de PVVS que asistían a la Clínica Familiar “Luis Ángel García” del Hospital General San Juan de Dios para primera consulta, con el objetivo de determinar la presencia de parásitos emergentes de la clase *Coccidia* y *Microsporidia*. Este estudio se realizó durante los meses de septiembre de 2002 a febrero de 2003. En este periodo se recolectaron 100 muestras correspondientes a 100 PVVS, a quienes se les realizaron algunas preguntas relacionadas con sus hábitos y costumbres, así mismo se consultó las historias clínicas de los mismos para obtener datos epidemiológicos relevantes para el estudio.

De acuerdo con las características demográficas la mayoría de las PVVS incluidas en el estudio pertenecían al genero masculino (62 por ciento) (Tabla 1). En relación a escolaridad y ocupación (49 por ciento) referían haber cursado al menos un año de escuela primaria y (56 por ciento) se dedicaban principalmente a la economía informal como medio de vida. La procedencia referida fue en mayoría la ciudad capital y las distintas zonas metropolitanas (66 por ciento). La edad mínima registrada fue de 1 año y la máxima de 66, ochenta y dos personas se encontraban entre los 15 y 45 años de edad con una media de 33 años. En cuanto a la preferencia sexual 89 referían ser heterosexuales.

Con respecto a la prevalencia de coccidios y microsporidios (Tabla 2) se encontró una prevalencia de 7 por ciento para *Cryptosporidium parvum* y de 3 por ciento para *Cyclospora cayetanensis*, reportada según la coloración de Zielh Neelsen que fue considerado el estándar de oro. La prevalencia para *Isospora belli* y para microsporidios fue de 0 por ciento ya que no se encontró ningún caso durante los meses en que se llevó a cabo el estudio.

Tabla 1 **Características demográficas de las PVVS que asisten a la Clínica Familiar "Luis Ángel García" Hospital General San Juan de Dios Septiembre 2002- Febrero 2003** (N = 100)

<b>Características</b>		<b>n</b>	<b>( % )</b>
Género	Masculino	62	62
	Femenino	38	38
Escolaridad	Analfabeta	25	25
	Nivel Primario	49	49
	Secundaria o		
	Superior	26	26
Ocupación	Agricultor	11	11
	Técnico	28	28
	Profesional	2	2
	Informal	56	56
	Sexo trabajador /a	3	3
Procedencia	Capital	66	66
	Escuintla	11	11
	Santa Rosa	5	5
	Peten	4	4
	Otros	14	14
Edad <sup>1</sup>	< 14 años	4	4
	15 a 30 años	42	42
	31 a 45 años	40	40
	46 a 55	12	12
	> 55 años	2	2
Preferencia sexual	Heterosexual	89	89
	Homosexual	11	11

<sup>1</sup> Edad mínima = 1 año, máxima = 66 años, Desviación estándar = +/-11.7, media =32.7

Tabla 2 Prevalencia de ooquistes de coccidios intestinales (N = 100)

Nmbre del coccidio <sup>1</sup>	n	%	Intervalo de confianza
<i>C. parvum</i>	7	7	(2.9 – 13.9)
<i>C. cayetanensis</i>	3	3	(0.6 – 8.5)
<i>I. belli</i>	0	0	ND <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estándar de oro : Zielh – Neelsen

<sup>2</sup> No determinado

La descripción demográfica de las PVVS incluidas en el estudio (Tabla 3), se reportó solamente para *Cryptosporidium parvum* no se observó ninguna asociación entre la infección y las características demográficas reportadas ( $P > 0.05$ ). Se estableció que de siete PVVS positivas para *Cryptosporidium parvum*, 6 (9.7%) pertenecían al género masculino y sólo 1 (2.6%) al género femenino; 3 (12%) eran analfabetas, 4 (7.1%) se dedicaban a la economía informal, 2 (18.2%) refirieron ser agricultores y 1(3.6%) dedicarse a trabajos técnicos. Dos de ellas (3%) residían en la capital y 5 (50.5%) en otros departamentos, 4 (9.9%) tenían entre 15 y 45 años de edad y 6 (6.7%) refirieron ser heterosexuales.

Tabla 3 Descripción demográfica de las PVVS incluidas para el estudio de *Cryptosporidium parvum* Septiembre 2002 - Febrero 2003 ( N = 100 )

Características	Totales		Positivos		Negativos		OR <sup>1</sup>	IC 95%	Valor p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)			
<b>Género</b>									
Masculino	62	(62)	6	(9.7)	56	(90.3)	3.96	0.45 - 34	0.18
Femenino	38	(38)	1	(2.6)	37	(97.4)			
<b>Escolaridad</b>									
Analfabeta	25	(25)	3	(12.0)	22	(88.0)	2.42	0.33 - 15.37	0.26
Nivel Primario	49	(49)	2	(4.1)	47	(95.9)	0.39	0.04 - 2.56	0.26
Secundaria o Superior	26	(26)	2	(7.7)	24	(92.3)	1.15	0.10 - 7.60	0.87
<b>Ocupación</b>									
Agricultor	11	(11)	2	(18.2)	9	(81.8)	3.73	0.31 - 26.84	0.12
Técnico	28	(28)	1	(3.6)	27	(96.4)	0.41	0.01 - 3.64	0.4
Profesional	2	(2)	ND <sup>2</sup>	(0.0)	2	(100.0)	ND	0.00 - 74.97	0.69
Informal	56	(56)	4	(7.1)	52	(92.9)	1.05	0.17 - 7.58	0.94
Sexo trabajador/a	3	(3)	ND	(0.0)	3	(100.0)	ND	0.00 - 35.40	0.63
<b>Procedencia</b>									
Capital	66	(66)	2	(3.0)	64	(97.0)	0.18	0.02 - 1.21	0.031
Escuintla	11	(11)	1	(9.1)	10	(90.9)	1.38	0.03 - 13.37	0.77
Santa Rosa	5	(5)	1	(20.0)	4	(80.0)	3.71	0.06 - 45.74	0.24
Petén	4	(4)	ND	(0.0)	4	(100.0)	ND	0.00 - 21.17	0.56
Otros	14	(14)	3	(21.4)	11	(78.6)	5.59	0.70 - 37.14	0.023
<b>Edad <sup>1</sup></b>									
< 14 años	4	(4)	1	(25.0)	3	(75.0)	5	0.75 - 14.19	0.15
15 a 30 años	42	(42)	1	(2.4)	41	(97.6)	0.21	0.00 - 1.87	0.125
31 a 45 años	40	(40)	3	(7.5)	37	(92.5)	1.14	0.16 - 7.13	0.87
46 a 55	12	(12)	2	(16.7)	10	(83.3)	3.32	0.28 - 23.51	0.16
> 55 años	2	(2)	ND	(0.0)	2	(100.0)	ND	0.00 - 74.97	0.69
<b>Preferencia sexual</b>									
Heterosexual	89	(89)	6	(6.7)	83	(93.3)	0.72%	0.07 - 36.54	0.77
Homosexual	11	(11)	1	(9.1)	10	(90.9)			

<sup>1</sup> OR; (Razón de momios) odds ratio - Chi cuadrado - Mantel Haenzel, IC 95%;  $\alpha = 0.05$

La comparación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, eficacia y coeficiente *Kappa* de las coloraciones para detectar *Cryptosporidium parvum* se observa en la Tabla 4. La sensibilidad de la coloración de Hematoxilina férrica modificada cuando se comparó con la coloración de Zielh Neelsen (considerada estándar de oro) fue de 100% (IC<sub>95%</sub> =56.1–100). La especificidad fue del 98% (IC<sub>95%</sub> = 91.7–100), el valor predictivo positivo fue del 77% (IC<sub>95%</sub>, = 40.2–96.1), el valor predictivo negativo fue del 100% (IC<sub>95%</sub> = 95.0–100) , la eficacia de Hematoxilina férrica modificada contra Zielh Neelsen fue de 98% y el coeficiente Kappa de 0.87%.

Tabla 4 **Comparación de las coloraciones para ooquistes de *Cryptosporidium parvum*** ( N = 100 )

Coloración Hematoxilina Férrica modificada	Coloración Zielh-Neelsen		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	7	2	9
Negativo	0	91	91
Total	7	93	100

	Resultado	Intervalo de Confianza del 95%
Sensibilidad:	100%	56.1 – 100
Especificidad:	98%	91.7 – 99.6
Valor predictivo positivo:	77%	40.2 – 96.1
Valor predictivo negativo:	100%	95.0 – 100
Eficacia HF vrs ZN <sup>1</sup> :	98%	
Coeficiente Kappa:	0.87	
Prevalencia:	7%	

<sup>1</sup> Hematoxilina férrica versus Zielhn - Neelsen

En la detección de *Cyclospora cayetanensis* los resultados de la comparación de Hematoxilina férrica con respecto a Zielh Neelsen (considerado como estándar de oro) (Tabla 5), se estableció una sensibilidad del 100% (IC<sub>95%</sub> = 31–100), especificidad del 98.96% (IC<sub>95%</sub> = 93.6–99.9), valor predictivo positivo del 75% (IC<sub>95%</sub> = 21.9–98.7), valor predictivo negativo 100% (IC<sub>95%</sub> = 95.2–100), eficacia de Hematoxilina férrica contra Zielh Neelsen 99% y coeficiente *Kappa* 0.86.

Tabla 5 Comparación de las coloraciones para ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*( N = 100 )

Coloración Hematoxilina Férrica modificada	Coloración Zielh-Neelsen		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	3	1	4
Negativo	0	96	96
Total	3	97	100

	Resultado	Intervalo de Confianza del 95%
Sensibilidad:	100%	(31 – 100)
Especificidad:	98.96%	(93.6 – 99.9)
Valor predictivo positivo:	75%	(21.9 – 98.7)
Valor predictivo negativo:	100%	( 95.2 – 100)
Eficacia HF vrs ZN <sup>1</sup> :	99%	
Coeficiente Kappa:	0.86	
Prevalencia:	3%	

<sup>1</sup> Hematoxilina férrica versus Zielhn - Neelsen

Entre los factores asociados con parásitos intestinales emergentes en PVVS, (Tablas 6) se evaluaron: fuentes de agua para beber, el tratamiento que se daba a las mismas para sanearlas, la presencia de animales en la casa y algunos hábitos y costumbres de consumir determinados alimentos crudos.

Se pudo observar que 92 por ciento de las PVVS incluidas en el estudio consumían agua de chorro o pozo público, contra un 8 por ciento que consumía agua embotellada. En cuanto a la forma de almacenar el agua para beber 35 por ciento lo hacían en botellas o en cubetas de plástico y 65 por ciento en tonel metálico. Referente al tratamiento que se daba a el agua para beber, 72 por ciento de las PVVS incluidas en el estudio, hervía o cloraba el agua que bebía, mientras que 28 por ciento no le daba ningún tipo de saneamiento, se encontró diferencia significativa entre estas variables [(IC<sub>95%</sub> = 0.00–0.48) P = 0.001, OR = 0.05].

Se pudo observar que 82 por ciento de las PVVS incluidas en el estudio tenían en su casa al menos algún animal, llegando en algunos casos a tener más de cuatro, mientras que 18 por ciento no poseían ningún animal en casa. En hábitos y costumbres alimenticios se pudo observar que, 69 por ciento tomaban refrescos preparados en la calle, de este grupo 43 por ciento consumían refrescos en la calle al menos una vez por semana, mientras que 26 por ciento refirieron hacerlo esporádicamente y 31 por ciento no acostumbran consumirlos. Con respecto a consumir frutas en ventas callejeras 61 por ciento de las PVVS incluidas en el estudio refirieron hacerlo, de este grupo 39 por ciento lo hacían al menos una vez por semana y 23 por ciento refirieron hacerlo a veces y 39 por ciento no comían frutas en ventas callejeras. El consumo de verduras crudas y ensaladas era mayor, ya que 84 por ciento de las PVVS incluidas en el estudio refirieron comer verduras crudas y ensaladas de las cuales 49 por ciento, lo hacían al menos una vez por semana y 35 por ciento las comía a veces y solamente 16 por ciento refirieron no comer verduras crudas y ensaladas (Tabla 6). La tabla 7 muestra la descripción de factores asociados a la infección por *Cryptosporidium parvum* en PVVS incluidos en el estudio. Se observa que darle al agua algún tratamiento, como hervirla o

clorarla representa un factor protector para contraer la infección por *Cryptosporidium parvum* [OR= 0.05, (IC<sub>95%</sub> = 0.00–0.48) valor p = 0.001]. Además se observa que tomar refrescos callejeros representa un riesgo de contraer la infección [OR = 6.44, (IC<sub>95%</sub> = 1.01–51.62), valor p =0.016]. En cuanto a los demás aspectos estudiados, ninguno tiene relevancia estadística.

**Tabla 6 Factores asociados con parasitosis intestinales en PVVS incluídas en el estudio Hospital General San Juan de Dios (N =100)**

<b>Características</b>	<b>n</b>	<b>( % )</b>
Fuente de agua para beber		
Chorro o Pozo	92	92
Embotellado	8	8
Almacenamiento de agua		
Cubeta de plástico	35	35
Tonel	65	65
Tratamiento al agua		
Hierve o clora	72	72
Ninguno	28	28
Animales en casa		
Si	82	82
No	18	18
Toma refrescos en la calle		
Si	69	69
No	31	31
Con que frecuencia lo hace		
Una vez por semana	43	43
A veces	26	26
Come frutas en la calle		
Si	61	61
No	39	39
Con que frecuencia lo hace		
Una vez por semana	39	39
A veces	23	23
Consume ensaladas crudas		
Si	84	84
No	16	16
Con que frecuencia lo hace		
Una vez por semana	49	49
A veces	51	51

**Tabla 7 Descripción de factores asociadas con parasitosis intestinal en PVVS incluídas para el estudio de *Cryptosporidium parvum* Septiembre 2002 - Febrero 2003 (N = 100 )**

Características	Totales		Positivos		Negativos		OR <sup>1</sup>	IC <sub>95%</sub>	Valor p
	n	(%)	n	(%)	n	(%)			
Tipo de agua									
Chorro o Pozo	92	(92)	6	(6.5)	86	(93.5)	2.05	0.05-23.64	0.45
Embotellado	8	(8)	1	(1.1)	7	(7.6)			
Almacenamiento de agua									
Cubeta de plástico	35	(35)	5	(5.4)	30	(32.6)	5.25	0.83-41.80	0.24
Tonel	65	(65)	2	(2.2)	63	(68.5)			
Tratamiento al agua									
Hierve o clora	72	(72)	1	(1.1)	71	(77.2)	0.05	0.00-0.48	0.001
Ninguno	28	(28)	6	(6.5)	22	(23.9)			
Animales en casa									
Si	82	(82)	6	(6.5)	76	(82.6)	1.34	0.14-31.53	0.63
No	18	(18)	1	(1.1)	17	(18.5)			
Refrescos en la calle									
Si	69	(69)	2	(2.2)	67	(72.8)	6.44	1.01-51.62	0.016
No	31	(31)	5	(5.4)	26	(28.3)			
Cuantas veces lo hace									
Una vez por semana	43	(43)	1	(1.1)	42	(45.7)	0.60	0.02-22.99	0.61
A veces	26	(26)	1	(1.1)	25	(27.2)			
Frutas en la calle									
Si	61	(61)	3	(3.3)	58	(63.0)	2.21	0.39-13.4	0.26
No	39	(39)	4	(4.3)	39	(42.4)			
Cuantas veces lo hace									
Una vez por semana	39	(39)	1	(1.1)	38	(41.3)	0.26	0.03-3.39	0.29
A veces	23	(23)	2	(2.2)	21	(22.8)			
Ensaladas crudas									
Si	84	(84)	6	(6.5)	78	(84.8)	1.34	0.14-31.53	0.63
No	16	(16)	1	(1.1)	15	(16.3)			
Cuantas veces lo hace									
Una vez por semana	49	(49)	4	4.3	45	(48.9)	1.47	0.20-17.05	0.50
A veces	35	(35)	2	2.2	33	(35.9)			

OR = (razón de momios); odds ratio – Chi cuadrado – Mantel Haenzel, IC<sub>95%</sub> ;  $\alpha = 0.05$

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La sensibilidad de la coloración Hematoxilina Férrica modificada con respecto de la coloración de Zielh Neelsen considerado estándar de oro para el diagnóstico de *Cryptosporidium parvum* y *Cyclospora cayetanensis* fue alta, pero el intervalo de confianza fue muy amplio; esta variación se explica probablemente en el número de muestra tan pequeño, en cuanto a los valores predictivos se puede afirmar que del cien por ciento de muestras negativas por lo menos noventa y cinco son verdaderamente negativas (50). Ambas coloraciones concuerdan en un 87%, lo cual se considera como una concordancia óptima (51) (Anexo 9). La prevalencia encontrada de *Cryptosporidium parvum* fue de 7%, lo cual coincide con lo encontrado por otros autores, que han reportado prevalencias similares en estudios en condiciones parecidas (17, 32). La prevalencia de *Cyclospora cayetanensis* encontrada fue de 3%, en este caso los resultados también coinciden con otros estudios realizados en condiciones similares, según estas investigaciones la prevalencia de coccidios intestinales en Guatemala se mantiene en los parámetros mencionados desde hace varios años (16, 17, 32 ).

Durante los meses que duró el estudio no se detectó ninguna muestra positiva para *Isospora belli*. Algunos estudios reportan mayor prevalencia de este coccidio durante la época lluviosa, por lo que se considera que esta es la razón principal por la cual no se detectó ninguno, ya que presenta relación con condiciones climáticas (31, 32, 33).

Con microsporidios no se realizó la comparación de métodos porque no se encontró ninguna muestra positiva, esto es consistente con los resultados obtenidos con otros investigadores en Guatemala ya que se han realizado varios estudios acerca del tema y solamente en uno se encontró una muestra positiva, de manera que este estudio confirma la baja prevalencia de este microorganismo en nuestro país. De cualquier manera, se utilizó muestras positivas conocidas como

control de las coloraciones de Blanco de Calcoflúor y Tricrómico modificado con el fin de asegurar los resultados ( 13, 42).

Entre las características demográficas estudiadas se observó que la mayoría de PVVS pertenecía al genero masculino (62%), con una escolaridad máxima del ciclo primario (49%), y que se encontraban en el rango de edad de 15 a 45 años (82%), lo que coincide con la etapa de vida sexual y económicamente activa, la mayoría provenían de la ciudad capital y de los departamentos aledaños a la misma como Escuintla (77%), esto está relacionado a la facilidad que tienen las personas de desplazarse hacia el centro de la ciudad para acudir al Hospital General San Juan de Dios ( 5, 17 ).

Se encontró que darle algún tipo de tratamiento al agua que se bebe, como clorarla o hervirla representa un efecto protector de contraer la infección por *Cryptosporidium parvum* [ OR = 0.05, valor p = 0.001, (IC<sub>95%</sub> = 0.00–0.48)]. Se ha reportado en la literatura que hervir el agua que se bebe y lavar los alimentos que se consumen disminuye el riesgo de infección; sin embargo también se sabe que los ooquistes de *C. parvum* son resistentes a la acción del cloro (18, 19, 22). Se observó también que tomar refrescos preparados en la calle, como licuados y jugos de frutas representa un riesgo seis veces mayor de contraer la infección por *C. parvum*, [ OR = 6.44, valor p = 0.016, (IC<sub>95%</sub> = 1.01–51.62) ] esta práctica está contraindicada en las recomendaciones de Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) para las PVVS ya que aumenta el riesgo de contraer infección, igual que comer frutas sin lavar y /o no lavarse las manos luego de ir al baño (22). Es interesante que aunque se evaluó el consumo de frutas en ventas callejeras y de ensaladas crudas, estas no presentaron ninguna significancia estadística.

Otro factor interesante fue la presencia de animales en la casa, ya que (82%) refirieron tener al menos un animal en casa, de las cuales (45%), tenían más de dos animales de diferente especie sin embargo, esto no presentó riesgo asociado de contraer infección por coccidios, probablemente

porque la mayoría de PVVS provenían de áreas urbanas, ya que se ha encontrado que los bovinos son transmisores de ooquistes de *C. parvum* y los felinos de *Cryptosporidium* sp (18-21).

Con respecto a las cuatro coloraciones evaluadas requieren de un seguimiento cuidadoso de la técnica, ya que cualquier desviación en los tiempos de coloración y lavado de los frotos conduce a cambios en las características tintoreales de las estructuras parasitarias presentes en los frotos.

En relación a las características que presentan las coloraciones en este trabajo para coccidios, la coloración de Zielh Neelsen se realizó más rápidamente aproximadamente en 20 minutos, mientras que Hematoxilina férrica modificada en una hora y llevo más pasos de tinción, por lo que requirió más cuidado, sin embargo presentó la ventaja de conservar muy bien las características físicas de los quistes y trofozoitos de protozoos , mientras que con Zielh Neelsen sólo fue posible observar coccidios y bacilos alcohol ácido resistentes ( 19,21 ).

Para la coloraciones Blanco de Calcoflúor y Tricrómico modificado, se empleó aproximadamente 25 minutos y una hora respectivamente; la mayor desventaja del Blanco de Calcoflúor es que se necesitó un microscopio de fluorescencia para poder observar los frotos teñidos, y este es un recurso con el que no cuenta la mayoría de laboratorios de Microbiología en Guatemala, mientras que la tinción Tricrómica modificada para microsporidios se pudo observar en un microscopio de luz el cuál es más accesible en nuestro medio (22).

Los siete casos positivos de *Cryptosporidium parvum* y tres de *Cyclospora cayetanensis* fueron reportados oportunamente a la Clínica Familiar “Luis Ángel García”, para su posterior tratamiento.

En conclusión las coloraciones para la detección de coccidios intestinales utilizadas en este estudio mostraron un grado de concordancia óptimo por lo que pueden ser usadas alternativamente, la principal recomendación es que se utilice coloración de Zielh- Neelsen, ya que fue más fácil y rápida de montar y representó un menor costo, dando los mismos resultados, esto no significa que la

coloración Hematoxilina férrica modificada, no sea una buena opción, ya que fue la más versátil, porque como se mencionó anteriormente fue de mucha utilidad para preservar las estructuras de quistes y trofozoitos de protozoos, siendo una buena opción cuando las muestras no pueden ser evaluadas de inmediato, en tal caso el requisito es realizar el frote con una pequeña gota de albúmina de Mayer y una gota de muestra para permitir una mejor fijación de la muestra.

Este estudio servirá de base para la realización de estudios posteriores con un mayor número de muestra y un intervalo de tiempo más amplio, para poder tomar en cuenta el factor estacional de parásitos como *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*.

## X. CONCLUSIONES

1. De acuerdo con los resultados obtenidos para sensibilidad, especificidad, y valores predictivos así como grado de concordancia y eficacia de las coloraciones Zielh–Neelsen y Hematoxilina férrica modificada para el diagnóstico de coccidios intestinales, se concluye que ambas tinciones pueden ser utilizadas con iguales resultados tanto para *Cryptosporidium parvum*, como para *Cyclospora cayetanensis* por lo que la hipótesis número uno es aceptada.
2. La prevalencia de coccidios intestinales en general, encontrados en este estudio fue de 10%.
3. La prevalencia de *Cryptosporidium parvum* encontrada en este estudio fue de 7% y la de *Cyclospora cayetanensis* de 3%.
4. Hervir o clorar el agua para beber representa un factor de protección para contraer infecciones por coccidios intestinales en PVVS.
5. Beber refrescos preparados en la calle, como licuados y jugos no envasados representa un riesgo seis veces mayor de contraer infecciones por coccidios intestinales.

## **XI. RECOMENDACIONES**

1. Implementar como prueba de rutina en los laboratorios de microbiología la coloración de Zielh-Neelsen para la detección de coccidios intestinales en PVVS.
2. Llevar a cabo estudios para la detección de coccidios intestinales en PVVS, utilizando un número de muestra más grande así como por períodos más prolongados de tiempo para poder establecer la estacionalidad de dichas infecciones.
3. Capacitar al personal de los laboratorios de microbiología en el montaje e interpretación de la coloración de Zielh – Neelsen para la detección de coccidios intestinales.
4. Elaborar material didáctico para ser distribuido entre las PVVS, para que conozcan los riesgos de contraer infecciones por coccidios intestinales y cómo pueden evitarlas.
5. Llevar a cabo estudios para la detección de microsporidios en PVVS, utilizando un número de muestra más grande así como por períodos más prolongados de tiempo.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Stites, D. et al.** Inmunología Básica y Clínica. 9 a. edición México. Editorial Manual Moderno. 1997. XVIII +1099 p.
2. **Quan Gonzalez RA.** Desarrollo de un Programa de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria en el Hospital General San Juan de Dios de la Ciudad de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1998. 70p.
3. **Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.** Programa Nacional de Control y Prevención del SIDA. Reporte Cuatrimestral, Junio del 2001.
4. **Nash, T., Weller, P.** Infecciones intestinales por protozoos: Giardiasis, Criptosporidiasis, Tricomoniasis y otras. Principios de Medicina Interna. HARRISON. 13ª edición España, Editorial Interamericana MC Graw – Hill. 1994 2 volúmenes XXXII + 3029p.
5. **Chúa C.** VIH/ SIDA en la zona 6 de la Ciudad de Guatemala (fase II) Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación. Guatemala, Marzo de 1999. 30p.
6. **De Jawetz, Melnick Y Adelberg.** Microbiología Médica. 15a. edición. México Editorial Manual Moderno. 1996. X + 806 p.
7. **Sacker, T. et al.** 1996. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. Ann. Intern. Med. **125**: 257-259.
8. **Lessnau KD, et al.** 1993. Disseminated *Strongyloides stercoralis* in human immunodeficiency virus infected patients. Treatment failure and a review of the literature. Chest. **104**: 119-122.  
<http://www.medscape.com>

9. **Gomez Morales MA, et al.** 1995. Opportunistic and non opportunistic parasites in HIV-positive and negative patients with diarrhea in Tanzania. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **46**:109-114 <http://www.medscape.com>.
10. **Maartens G.** 2000. Management of opportunistic infections in developing countries. XIII International AIDS conference. 6 –15 de julio del 2000. <http://www.medscape.com>.
11. **Lindo J. et al.** 1998. Intestinal parasitic infections in human immunodeficiency virus (HIV) positive and HIV negative individual in San Pedro Sula, Honduras. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**:431-435.
12. **Chris N, et al.** 1998. Examination of the prevalence and seasonal variation of intestinal microsporidiosis in the stool of person with diarrhea and human immunodeficiency virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**: 559-561.
13. **Medina Monzon, M.** Prevalencia de microsporidos en pacientes VIH y / o SIDA que acuden a la Clínica No. 8 del Hospital Roosevelt. Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 2001. 55p.
14. **Bern C, et al.** 2000. Epidemiologic studies of *Cyclospora cayetanensis* in Guatemala. *Emerg. Infect. Dis.* **5**: 1-15. [http:// www.cdc.eia.gov](http://www.cdc.eia.gov).
15. **Bern C, et al.** 2000. The contrasting epidemiology of *Cyclospora* and *Cryptosporidium* among outpatients in Guatemala. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **63**: 231-235.
16. **Pratdesaba et al** 2001. *Cyclospora cayetanensis* in three populations at risk in Guatemala. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2951-2953.
17. **Vela C.** Prevalencia y manifestaciones clínicas de coccidios intestinales en pacientes con VIH/SIDA. Universidad Francisco Marroquín, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Médicas). 2000. 115p.
18. **García L., Bruckner D.** *Diagnostic Medical Parasitology*, 2da. Ed. USA. American Society for Microbiology. 1993. XII+764 p.

19. **Koneman E. et al.** Diagnostico Microbiológico, Texto y Atlas a color. 5ta. Edición. Argentina, Editorial Médica Panamericana. 1999. XV + 14332p.
20. **Romero C.** Microbiología y Parasitología Humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas. 2da. Edición. México. Editorial Panamericana. 1991. XXIX + 873 p.
21. **Markel, Voge.** Parasitología Médica. 6ta. Edición. Argentina Editorial Interamericana Mc Graw – Hill 1990. IX + 390.
22. **Centers for Disease Control and Prevention** 2001 *Cryptosporidium parvum* <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.
23. **Pienazek NJ, et al.** 2000. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV infected persons. Emerg. Infect. Dis. **5**: 1-10. <http://www.cdc.eia.gov>.
24. **Fisshesha B, et al.** 1998. *Cryptosporidium* and other parasites in Ethiopian AIDS patient with chronic diarrhoea. East. Afr. Med. **75**: 100-101.
25. **Peng M, et al.** 2001. Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: Evidence of two distinct human transmission cycles. Emerg. Infect. Dis. **6**: 7-10 <http://www.cdc.eia.gov>.
26. **Nimri LF, Bat Choun R.** 1994. Prevalence of *Cryptosporidium* species in elementary school children. J. Clin. Microbiol. **32**: 1040-1042
27. **Jose A. et al.** 2001. Biliary Cryptosporidiosis: Current Concepts. Infec. Med. **6**: 305-311.
28. **Garcia L.** 2000. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in Human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. J. Clin. Microbiol. **9**: 3337-3340.

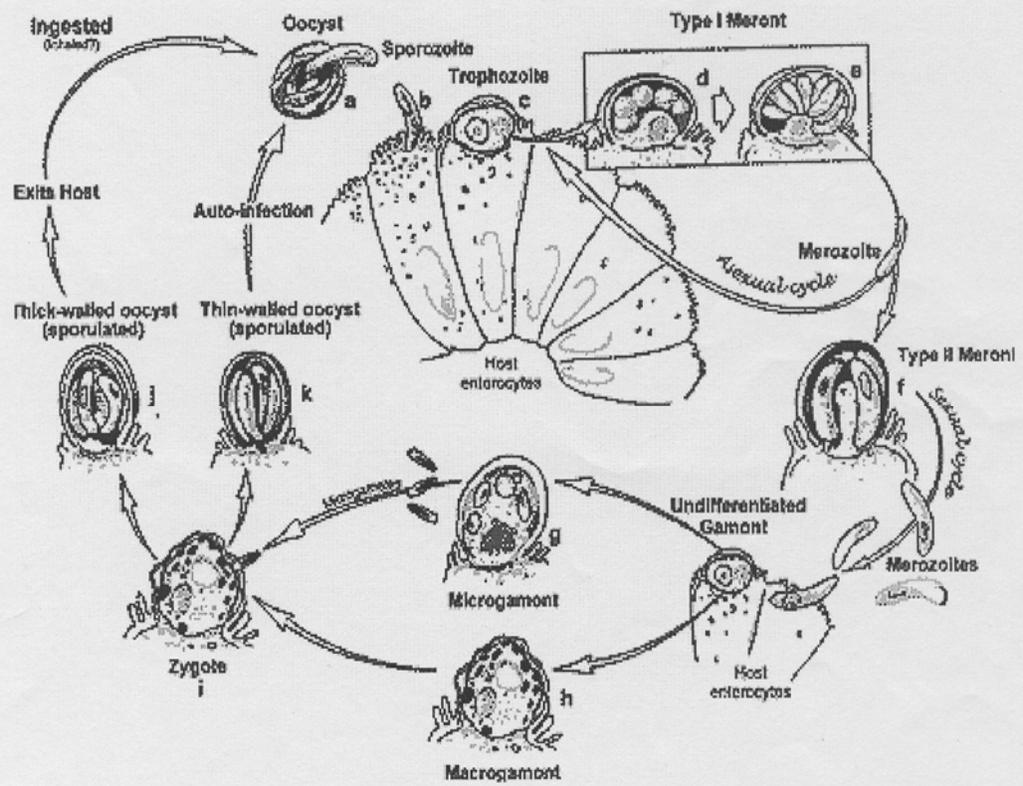
29. **Jong Yil C. et al** 2001. High prevalence and seasonality of cryptosporidiosis in a small rural village occupied predominantly by gnomes in the Republic of Korea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**:518-522.
30. **Cruz JR.** 1998. Infection and diarrhoea caused by *Cryptosporidium sp.* Among Guatemalan infants. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 88-91.
31. **Pratdesaba RA.** Investigación de *Isospora belli* y comparación de métodos diagnósticos en grupos a riesgo en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1991. 54p.
32. **Cuellar NS.** Prevalencia de Infecciones Intestinales causadas por Coccidios: *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*, en pacientes con SIDA Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1997. 70p.
33. **Alvarado J, et al.** 2001. Tratamiento de las enfermedades intestinales causadas por protozoos y coccidios. *Revista Española de Quimioterapia.* **45**: 93-96. [http:// www. proust. com.](http://www.proust.com)
34. **Chacin Bonilla L,** 2001. *Cyclospora cayetanensis* infections among diarrheal patients from Venezuela *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**:351-354
35. **Alvarado K.** *Cyclospora cayetanensis* como agente causal de diarrea en pacientes de la consulta externa del Hospital General San Juan de Dios. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 2000. 40p.
36. **Velasquez Porta, 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. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1992. 63p.

37. **Weiser J. et al.** 1995. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infection. *J. Clin. Microbiol.* **8**:113-130.
38. **García LS, Bruckner D.** Intestinal protozoa (Coccidia and Microsporidia). En: *Diagnostic medical parasitology*. 3ª edición. Washington ASM Press, 1997, pp 69-72.
39. **Amarena JJ, et. al.** 1992. Coccidios intestinales. *Cryptosporidium e Isospora*. en Perú *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* **2**:1027-1033.
40. **Lindsay DS, et al.** 1997. Biology of *Isospora spp.* from humans, nonhuman primates, and domestic animals. *Clin Microbiol Rev* **10**:19-34.
41. **Marshall MM, Naumovitz D, et al.** 1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clin Microbiol Rev*; **10**:67-85.
42. **Espina Sandoval, C.** Detección de microsporidios en muestras de heces preservadas en congelación por técnicas de tinción y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 2002. 38p.
43. **Wittner M.** The Microsporidia and Microsporidiosis. Firsth edition. USA ASM 1999; XVII+553.
44. **Didier et al.** 1995. Comparison of three staining methods of detection of microsporidia in fluids. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3138-3145.
45. **Del Aguila C; et al.** 1997. Identification of *E.bieneusi* spores in respiratory simples from AIDS patient with 2 year history of intestinal microsporidiosis. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1862-1866.

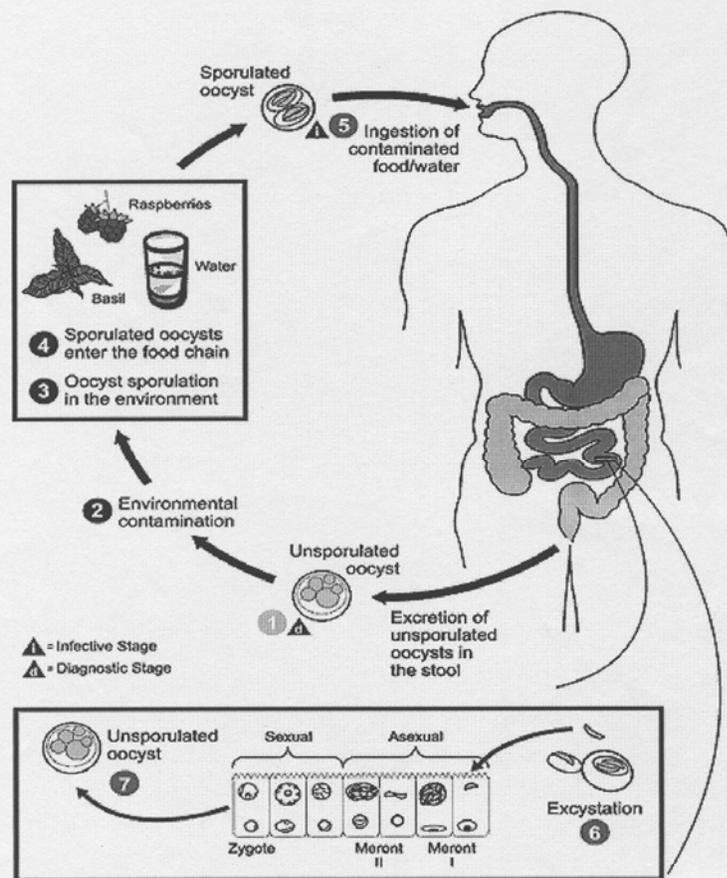
46. **Cotte L; et al.** 1997. Outbreak of intestinal microsporidiosis in HIV- infected patients in relation with town water distribution sistem ASM Press.
47. **Franzen C; et al.** 1995. Detection of Microsporidia (*Enterocytozoon bienersi*) in intestinal biopsy specimens from human immunodeficiency virus-infected by PCR. J. Clin. Microbiol. **33**:2294-2296.
48. **Molina J; et al.** 2002. Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. N. Engl. J. Med. **346**: 1963-1964.
49. **Maclure; et. al.** Misinterpretation and misuse of the *kappa* statistic. American Journal of Epidemiology, 1987; **126**:161-169.
50. **Chen X; et. al.** 2 002 Cryptosporidiosis Current concepts. N. Engl. J. Med. 346: 1723 - 1731

### **XIII. ANEXOS**

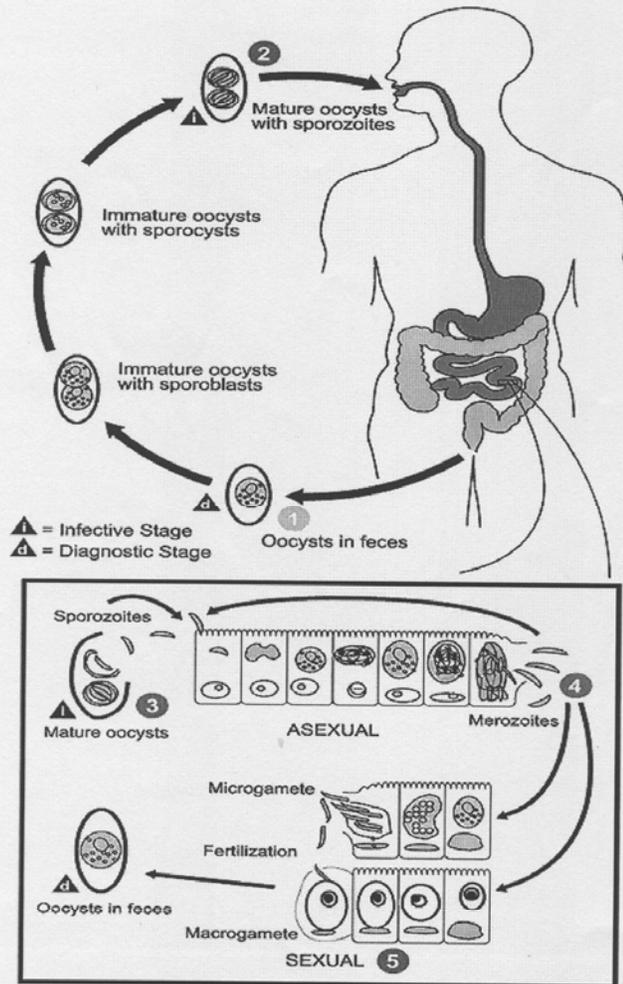
## Anexo 1

Ciclo de vida de *Cryptosporidium parvum*Fuente: [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)

## Anexo 2

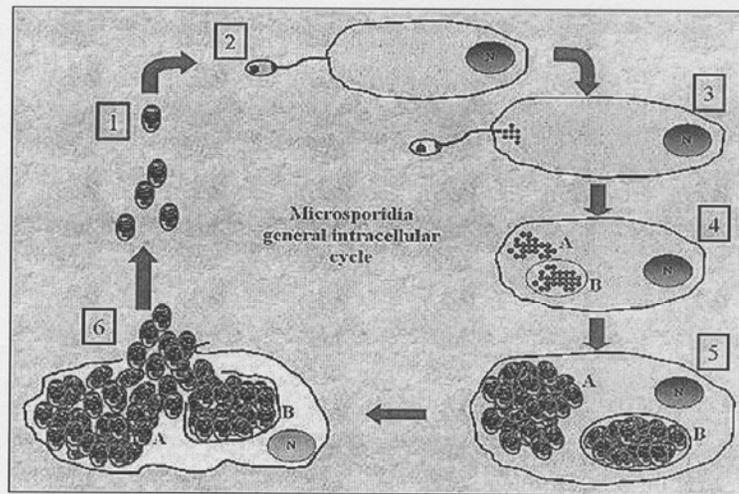
Ciclo de vida de *Cyclospora cayetanensis*Fuente: [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)

## Anexo 3

Ciclo de vida de *Isospora belli*Fuente: [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)

## Anexo 4

## Ciclo de vida de Microsporidios



Fuente: [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)

## ANEXO 5

**Diagnóstico de parásitos intestinales emergentes en personas que viven con VIH/SIDA que asisten a la Clínica Familiar "Luis Angel García" del Hospital General San Juan de Dios**

**BOLETA DE DATOS HISTORIA CLINICA**

No. de ID

1	Fecha de entrevista	_____
2	No. de Historia clínica	_____
3	Residencia	_____
4	Edad	_____

5	Genero	1 Masculino <input type="checkbox"/>	2 Femenino <input type="checkbox"/>
6	Preferencia sexual	1 Hombres <input type="checkbox"/>	2 Mujeres <input type="checkbox"/> 3 Ambos <input type="checkbox"/>
7	Nivel de escolaridad	1 Analfabeta <input type="checkbox"/>	5. Diversificado <input type="checkbox"/>
		2 Alfabeta <input type="checkbox"/>	6. Superior <input type="checkbox"/>
		3 Primaria <input type="checkbox"/>	99 No sabe/ No Responde <input type="checkbox"/>
		4 Secundaria <input type="checkbox"/>	
8	Ocupación	1 Agricultor <input type="checkbox"/>	5. Trabajador ( a ) del Sexo <input type="checkbox"/>
		2 Profesional <input type="checkbox"/>	6. Economía informal <input type="checkbox"/>
		3 Técnico <input type="checkbox"/>	

9	Fecha de diagnóstico VIH	_____
10	Fecha de diagnóstico SIDA	_____

**Último Recuento de**

11	Leucocitos	<input type="text"/>	fecha	_____
12	Linfocitos	<input type="text"/>	fecha	_____
13	CD4	<input type="text"/>	fecha	_____
14	Hg	<input type="text"/>	fecha	_____

15	Recibe actualmente tratamiento retroviral	1 SI <input type="checkbox"/>	2 NO <input type="checkbox"/>	3 NO sabe <input type="checkbox"/>
16	Padece alguna enfermedad oportunista	1 SI <input type="checkbox"/>	2 NO <input type="checkbox"/>	3 NO sabe <input type="checkbox"/>
17	Cual ( es ) enfermedad ( es ) oportunista ( s )	_____		

**Síntomas Gastrointestinales**

18	Tiene diarrea	1 SI <input type="checkbox"/>	2 NO <input type="checkbox"/>	3 NO sabe <input type="checkbox"/>
19	Cuanto tiempo tiene de tener diarrea	_____		
20	Cuál es la consistencia de las heces	_____		
21	No. de deposiciones diarias	_____		
22	Ha recibido algún tratamiento para la diarrea	1 SI <input type="checkbox"/>	2 NO <input type="checkbox"/>	3 NO sabe <input type="checkbox"/>

**Que tratamiento ha recibido**

23	Antibióticos	1 SI <input type="checkbox"/>	2 NO <input type="checkbox"/>	3 NO sabe <input type="checkbox"/>
24	Antidiarréicos	1 SI <input type="checkbox"/>	2 NO <input type="checkbox"/>	3 NO sabe <input type="checkbox"/>
25	Antiespasmódicos	1 SI <input type="checkbox"/>	2 NO <input type="checkbox"/>	3 NO sabe <input type="checkbox"/>

## ANEXO 6

**Diagnóstico de parásitos intestinales emergentes en personas que viven con VIH/SIDA que asisten a la Clínica Familiar "Luis Angel García" del Hospital General San Juan de Dios**

## Boleta para solicitud de muestra

No. De identificación _____
No. De Historia clínica _____
fecha de Consulta _____

## Fuentes de Agua

- 1** La fuente de donde bebe agua es
- 1 Chorro  2 Pozo  3 Otro
- 2** como guarda el agua para beber
- 1 En cubeta  2 En tonel  3 Otro
- 3** Que tipo de tratamiento le da al agua que bebe
- 1 Hierve  2 Clora  3 Ninguno

## Saneamiento

<b>4</b> Tiene servicio sanitario en su vivienda	1. SI <input type="checkbox"/>	2. NO <input type="checkbox"/>
<b>5</b> Que tipo de sanitario tiene		
1 Letrina <input type="checkbox"/>		
2 Inodoro lavable <input type="checkbox"/>		
3 Otro <input type="checkbox"/>		

## Animales

<b>6</b> En su vivienda tiene animales	1. SI <input type="checkbox"/>	2. NO <input type="checkbox"/>
<b>7</b> Que tipo de Animales tiene		
1 Perro <input type="checkbox"/>		
2 Gato <input type="checkbox"/>		
3 Aves <input type="checkbox"/>		
4 Otro <input type="checkbox"/>		

## Hábitos y consumo de alimentos

<b>8</b> Toma frescos (no procesados) en la calle	1. SI <input type="checkbox"/>	2. NO <input type="checkbox"/>
<b>9</b> Con que frecuencia consume refrescos en la calle	_____	
<b>10</b> Come frutas en bolsa en ventas callejeras	1. SI <input type="checkbox"/>	2. NO <input type="checkbox"/>
<b>11</b> Con que frecuencia consume frutas en la calle	_____	
<b>12</b> Consume verduras crudas (ensaladas)	1. SI <input type="checkbox"/>	2. NO <input type="checkbox"/>
<b>13</b> Con que frecuencia consume verduras crudas (ensaladas)	_____	

## En las últimas semanas

<b>14</b> Ha bebido agua no tratada	1. SI <input type="checkbox"/>	2. NO <input type="checkbox"/>	3. No sabe <input type="checkbox"/>
<b>15</b> Ha nadado en un río o lago	1. SI <input type="checkbox"/>	2. NO <input type="checkbox"/>	
<b>16</b> Ha tenido contacto con tierra	1. SI <input type="checkbox"/>	2. NO <input type="checkbox"/>	
<b>17</b> Ha tenido contacto con alguna persona con diarrea	1. SI <input type="checkbox"/>	2. NO <input type="checkbox"/>	
<b>18</b> Vive con alguna persona que vive con VIH o SIDA	1. SI <input type="checkbox"/>	2. NO <input type="checkbox"/>	

## ANEXO 7

Preparación de reactivos

### 1.Solución Salina al 0.85%

Cloruro de sodio	8.5 grs.
Agua destilada	1000 mL.

### 2.Lugol Fuerte

Yodo en cristales	5 gr.
Yoduro de potasio	10grs.
Agua destilada	100 mL.

- Diluir 1:5 para utilizarla. Esta solución diluida dura 3 semanas.

### 3.Acetato de sodio-ácido acético-formalina (SAF)

Acetato de sodio (Sigma)	1.5 g.
Ácido acético glacial (Merck)	2.0 mL.
Formalina 37-40% (Merck)	4.0 mL.
Agua destilada	92.0 mL.

- Mezcle el ácido con 50% del agua en una botella de vidrio
- Añada el acetato de sodio y la formalina
- Añada el resto del agua
- Mezcle hasta que el acetato de disuelva
- Guarde en botella oscura por dos años

#### 4. Solución stock de hematoxilina

Hematoxilina en polvo (Fisher)	10 g
Etanol 95% (Merck)	1 L

- Disuelva el polvo en el alcohol en una botella de vidrio.
- Mantenga en un área iluminada por 14 días antes de usar.
- Guarde a temperatura ambiente por un año.

#### 5. Mordiente

Sulfato ferroso amónico (Merck)	10 g
Sulfato férrico amónico (Fisher)	10 g
Ácido clorhídrico (Merck)	10 mL
Añada agua destilada hasta	1 L

- Mezcle los polvos con 500 mL de agua en una botella de vidrio.
- Añada el ácido clorhídrico
- Añada el resto del agua hasta completar 1 L
- Guarde a temperatura ambiente por un año

#### 6. Solución de trabajo de hematoxilina

- Mezcle cantidades iguales de solución stock de hematoxilina y de mordiente.

### 7. Ácido pícrico (Fisher)

- Mezcle volúmenes iguales de agua y una solución saturada de ácido pícrico. Para la solución saturada se agrega ácido pícrico al agua hasta que el ácido no se disuelva (aproximadamente 1 g de ácido por 78 mL de agua destilada)

### 8. 70% Alcohol + Amonio

Etanol al 70% (Merck)	50 mL
Amonio (Merck)	0.5-1 mL

- Añada el amonio al alcohol hasta que llegue a un pH de 8
- Guarde a temperatura ambiente por un año

### 9. Carbol-Fucsina

#### Solución A

Fucsina básica (Fisher)	0.3 g
Etanol (Merck)	10 mL

#### Solución B

Fenol (Fisher)	5 g
Agua destilada	100 mL

- Mezcle las soluciones A y B
- Guarde a temperatura ambiente por un año

**10. Alcohol-Ácido**

Ácido clorhídrico (Merck)	30 mL
Etanol 98% (Merck)	1 L

- Agregue cuidadosamente el ácido al etanol. NO INHALE LOS VAPORES
- Guarde a temperatura ambiente por 5 años

**11. Calcoflúor para microsporidios**

Flourescent brightener 28 (Sigma)	6.0 g
Agua destilada	10 mL

- Mezcle el agua con el reactivo y ajuste a pH 9.8-10
- Guarde en oscuridad a temperatura ambiente por un año

**12. Tricrómico modificado para microsporidios**

Chromotrope 2R (Allied Chemical)	6.0 g
Azul de anilina (Fisher)	0.5 g
Acido fosfotúngstico (Fisher)	0.7 g
Acido acético (Merck)	3.0 mL
Agua destilada	100 mL

- Disuelva los reactivos en el ácido acético
- Mantenga a temperatura ambiente por 30 minutos

- Añada el agua
- La solución debe tener pH 2.5 (utilice HCl 1M sí es necesario)
- Guarde a temperatura ambiente por 2 años

### 13.Zielh – Neelsen modificado

Fucsina básica	3 g
Agua destilada	290 mL
Ácido clorhídrico concentrado	3 mL
Cloruro de Azul de metileno	0.3 g
Alcohol etílico al 95%	107 mL
Fenol	5 g

- a. **Carbolfucsina:** Disolver 3 g de fucsina básica en 10 mL de etanol 90 –95%. Agregar 90 mL de una solución acuosa de fenol al 5%. ( 5 g de fenol disueltos en 100 mL de agua destilada).
- b. **Alcohol – Ácido:** Agregar 3 mL de HCl concentrado *lentamente* a 97 mL de etanol 90 –95 % en este orden. *¡ La solución puede calentarse!*
- c. **Colorante de contraste azul de metileno:** Disolver 0.3 g de cloruro de azul de metileno en 100 mL de agua destilada

## ANEXO 8

## Zielh - Neelsen

	+	-				
<b>Hematoxilina ferrica</b>	<table style="border-collapse: collapse; width: 100%; height: 100%;"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">a</td> <td style="padding: 5px; text-align: center;">b</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">c</td> <td style="padding: 5px; text-align: center;">d</td> </tr> </table>		a	b	c	d
a	b					
c	d					
+						
-						

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c}$$

$$\text{VPPP} = \frac{a}{a + b} = P (T^+ / T^+)$$

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{d + b}$$

$$\text{VPNP} = \frac{c}{c + d} = P (T / T)$$

$$\text{VPP (según prevalencia)} = \frac{\text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia de la población}}{\text{Sensibilidad} \times \text{Prevalencia} + (1 - \text{especificidad}) (1 - \text{prevalencia})}$$

$$\text{Eficacia} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

$$\text{Coeficiente Kappa (k)} = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Donde: Po = Proporción de concordancia observada  
Pe = Proporción de concordancia esperada

$$Po = \frac{a + b}{a + b + c + d}$$

$$Pe = \frac{[(a + b)(a + c)] + [(c + d)(b + d)]}{(a + b + c + d)}$$

**ANEXO 9****ESCALA DE CONCORDANCIA KAPPA**

---

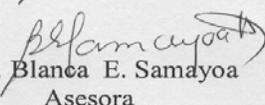
Kappa	Concordancia
<0.00	Malo
0.00 – 0.20	Pobre
0.21 – 0.40	Sufrible
0.41 – 0.60	Regular
0.61 – 0.80	Buena
0.81 – 0.99	Optima
1.00	Perfecta

---

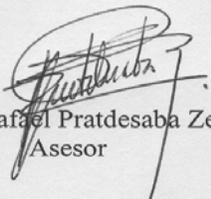
Tomado de: Maclure M., *et. al.* Misinterpretation and misuse of the *kappa* statistic. American Journal of Epidemiology, 1987; 126:161-169.



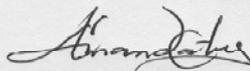
Karla Odetti Escobar Castro  
Autora



M.Sc. Blanca E. Samayoa  
Asesora



M.Sc. Rafael Pratdesaba Zea  
Asesor



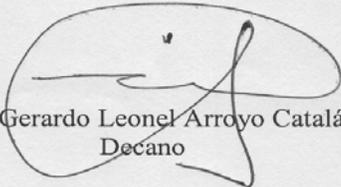
Licda. Amanda Gálvez de Matheu  
Revisora



Lic. Martín Nestor Gil Carrera  
Revisor



Licda. Alba Marina Valdés de García  
Directora



M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán  
Decano