

Infección por *Cyclospora cayetanensis*. Diagnóstico de Laboratorio

OSCAR VÁZQUEZ TSUJI,¹ ROSALBA JIMÉNEZ DOMÍNGUEZ,² TERESITA CAMPOS RIVERA,¹ SILVIA VALENCIA ROJAS,³ RAÚL ROMERO CABELLO,^{4*} VALENTE GAMEZ ARANDA³ E IGNACIO MARTÍNEZ-BARBABOSA⁵

Servicio de Parasitología y Micología. División de Medicina. Instituto Nacional de Pediatría² y UMF 28 del Instituto Mexicano del Seguro Social. Lab. de Parasitología. Instituto Nacional de Pediatría,³ Secretaría de Salud. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México y Hospital General de México, Secretaría de Salud.⁴ Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.⁵

*Autor para la correspondencia: Av. San Francisco Culhuacán 301. Presidentes Coyoacán México, D. F. 04470. Tel. (5) 56-56-38-04. Fax (5) 556-56-07-32. E-mail flaprrc@df1.telmex.net.mx

ABSTRACT. *Cyclospora cayetanensis* is an Apicomplexa protozoa which was found to cause gastroenteritis in humans in 1979. This paper reviews the laboratory diagnosis of the disease. The usefulness of direct examination of fresh fecal matter with special acid-fast stains is emphasized as well as the morphometric differentiation between this organism and other similar coccidia. The paper reviews the sporulation technique of *Cyclospora cayetanensis* for the recognition and differentiation of artifacts and green-blue algae. Another aspect discussed is the morphology of the parasite in histological sections and with electromicroscopic examination whereby tissue morphology changes caused by the microorganism can be identified. The experience of the Service and Laboratory of Parasitology of the Instituto Nacional de Pediatría of Mexico in the laboratory diagnosis of this protozoonosis is described. The paper is oriented towards the inclusion of *Cyclospora cayetanensis* in the diagnostic protocols for the study of diarrheas in our health institutions.

Key words: *Cyclospora cayetanensis*, laboratory diagnosis.

RESUMEN. *Cyclospora cayetanensis* es un protozoo Apicomplexa, coccidio de localización intestinal, que fue identificado como parásito del hombre, causante de gastroenteritis en 1979. En el presente trabajo se revisan los aspectos de diagnóstico de laboratorio, en base a la identificación morfológica mediante el uso del examen directo en fresco de materia fecal, preparaciones teñidas, y observación microscópica con microscopio de luz clara con diferenciación morfométrica entre éste organismo y otros similares. También se revisa la técnica de esporulación de *Cyclospora cayetanensis* para reconocerla y diferenciarla de artefactos y algas verde-azules, para evitar diagnósticos erróneos. El otro aspecto que se destaca es la morfología del parásito en cortes histológicos y a la microscopía electrónica, donde además se pueden identificar los cambios morfológicos tisulares producidos por el microorganismo. En el presente documento se vierte la experiencia del Instituto Nacional de Pediatría en el diagnóstico de laboratorio de esta protozoonosis. La orientación del trabajo pretende que se considere la inclusión de *Cyclospora cayetanensis* en el protocolo de estudio de las diarreas en las Instituciones de Salud.

Palabras clave: *Cyclospora cayetanensis*, diagnóstico de laboratorio.

INTRODUCCIÓN

Cyclospora cayetanensis es un protozoo Apicomplexa que fue descrito por primera vez en heces de humanos en 1979. En un inicio el parásito fue considerado como un alga verde-azul, un coccidio no esporulado o una especie grande de *Cryptosporidium*. La observación de que estos organismos eran capaces de esporular, de que en su interior se desarrollaban esporoblastos y esporozoítos, confirmó que se trataba de un protozoo.^{16,17}

Posteriormente se definió su especie por Ortega y cols. en 1993.²² A partir de ese momento se empezaron a describir casos de cyclosporiasis en diversas partes del mundo, principalmente en pacientes originarios o con antecedentes de haber viajado a países en vías de desarrollo como México, Perú, Camboya, Pakistán, Marruecos, India, Guatemala, Nueva Guinea, Nepal, Haití, Indonesia e inclusive en países desarrollados como Estados Unidos de Norteamérica, Australia e Inglaterra.^{7,12,18,24,27}

Los estudios de frecuencia de aislamiento de este pará-



sito reportan cifras que van del 0.2% al 10.9%, porcentajes que varían de acuerdo con la población estudiada, época del año en que se realizó el estudio y método diagnóstico de laboratorio empleado.^{15,23,30,31}

En México sólo existe un estudio dirigido para la búsqueda de este parásito en población pediátrica, en donde se reportó una frecuencia de 0.38% en una muestra de 522 pacientes con diarrea aguda, el resto de la información publicada corresponde a casos aislados.²⁹

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

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de las infecciones causadas por *C. cayetanensis* requiere de la detección del microorganismo o de su DNA en muestras de materia fecal.¹⁰

Es esencial que la muestra fecal sea colectada y manejada adecuadamente para realizar la búsqueda e identificación de parásitos incluyendo a *Cyclospora*, ya que el manejo inadecuado de la muestra puede causar alteraciones en la capacidad del parásito para teñirse, como sucede con otros organismos Apicomplexa.¹

Los procedimientos para la observación directa del parásito en muestras fecales son sencillos y se encuentran bien estandarizados, por lo que en un futuro cercano probablemente serán considerados como "estándar de oro" en el diagnóstico de esta protozoosis.¹⁰

Debido a que los ooquistes de *Cyclospora* pueden ser eliminados en bajas cantidades o bien puede haber eliminación intermitente o esporádica de los mismos, se recurre a diversas técnicas de concentración usadas comúnmente como parte de los procedimientos diagnósticos de rutina. Para este fin son útiles las técnicas de concentración por flotación que usan como gradiente soluciones de sulfato de zinc, sin embargo con estos métodos se puede producir deformación de la cubierta quística de *Cyclospora* con la subsecuente dificultad para la realización de la identificación morfológica. Las técnicas de flotación con gradiente de sacarosa también son efectivas, sin embargo el método más recomendable para concentración de los ooquistes es el de concentración por sedimentación - centrifugación en formol-acetato de etilo.²

EXAMEN MEDIANTE LAMINILLAS EN FRESCO

El método de diagnóstico más usado es el examen di-

recto en fresco de materia fecal para realizar la búsqueda de ooquistes de *Cyclospora*. Las estructuras se observan de forma esférica de un tamaño superior a las de *Cryptosporidium* (8-10 versus 4-6 micrómetros de diámetro), en ellos se distingue una cubierta quística bien definida no refráctil, que ocasionalmente puede verse ligeramente dentada en uno de sus polos, sin embargo la mayoría de los ooquistes se observan como una forma esférica perfecta.³

Cuando los ooquistes han sido eliminados recientemente, aún no se encuentran esporulados y en su interior es posible observar una masa celular redondeada de aspecto morular, granuloso, refringente, de color verdoso que deja un espacio transparente entre ella y la pared del ooquiste. Ocasionalmente se pueden encontrar ooquistes parcialmente esporulados.³ Las estructuras son reconocidas fácilmente por observadores experimentados, sin necesidad de realizar tinciones específicas (Fig. 1).^{2,10}

En relación con el tamaño, los ooquistes de *C. cayetanensis* son más grandes que los ooquistes de *C. parvum* y más pequeños que los ooquistes de *Isospora belli*, que son los otros dos coccidios más frecuentes causantes de enfermedad en el hombre (Fig. 2).^{5,20}

El examen mediante técnicas de epifluorescencia para la detección de los ooquistes de *Cyclospora* puede apoyar dichas observaciones, ya que los ooquistes presentan una marcada autofluorescencia bajo la luz ultravioleta que rápidamente muestra las estructuras en el campo microscópico, presentando fluorescencia intensa de color azul-verdoso a nivel de la pared externa, sin presentarse esta en las estructuras internas.²⁸

Se ha reportado que el uso de una gota de yodo de Anthony en las preparaciones que van a ser sometidas a epifluorescencia, ayuda en la diferenciación de estructuras fluorescentes inespecíficas.⁶

La morfología interna de los ooquistes sólo se observa en materia fecal recién emitida, conservándose ésta, cuando las heces se mantienen en agua.

El empleo de conservadores como formol, paraformaldehído, glutaraldehído o dicromato de potasio causan coalescencia de los gránulos que constituyen la mórula, dando lugar a un número variable de cuerpos irregulares mal definidos (Fig. 3).⁷

En nuestra experiencia el diagnóstico de *Cyclospora* en laminillas en fresco de materia fecal mediante microscopía de luz clara, ofrece una alta sensibilidad cuando se le compara con el examen de laminillas teñidas, sobre todo cuando el técnico encargado del diagnóstico se encuentra capacitado para el reconocimiento de las formas mediante este método. La sensibilidad en nuestra experiencia es muy similar con ambos métodos, y la tinción para organismos ácido-alcohol resistentes la utilizamos como prueba confirmatoria, aunada a la micrometría ocular para diferenciar los ooquistes de *Cyclospora* de los de *Cryptosporidium*. Por otra parte algunos autores refieren que la sensibilidad es similar cuando se comparan laminillas fijas teñidas y

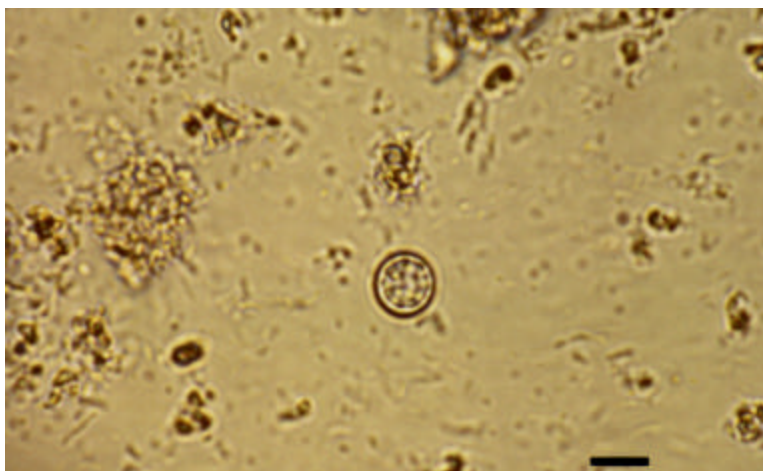


Fig. 1. Ooquiste de *Cyclospora cayetanensis* en materia fecal recién emitida, obsérvese la masa morular granular en su interior, que deja un espacio libre entre esta y la cubierta externa. Barra = 10 micrómetros.

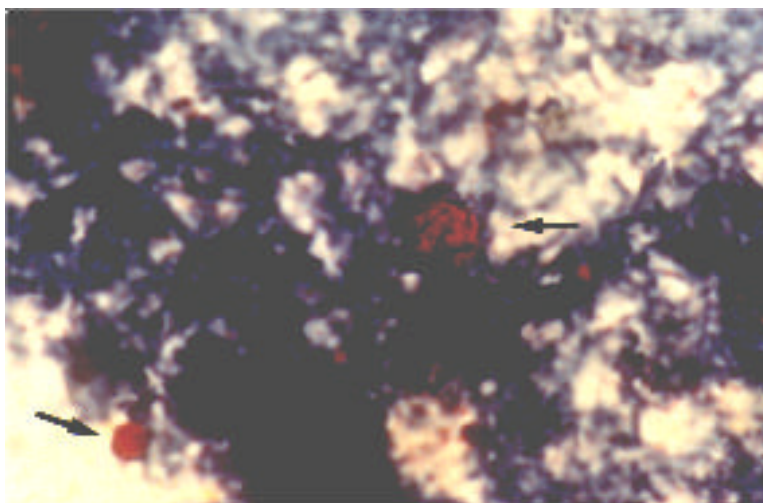


Fig. 2. Ooquiste de *Cyclospora cayetanensis* en frotis de materia fecal teñido con la técnica de Ziehl-Neelsen (centro). Se puede observar la presencia de un ooquiste de *Cryptosporidium* sp. en la parte inferior izquierda. Nótese la diferencia en el tamaño de ambas estructuras.



Fig. 3. Ooquiste de *Cyclospora cayetanensis* con alteraciones morfológicas secundarias a la conservación en formol. En el interior es posible observar la presencia de gránulos coalescentes aglomerados en el centro de la estructura parasitaria.

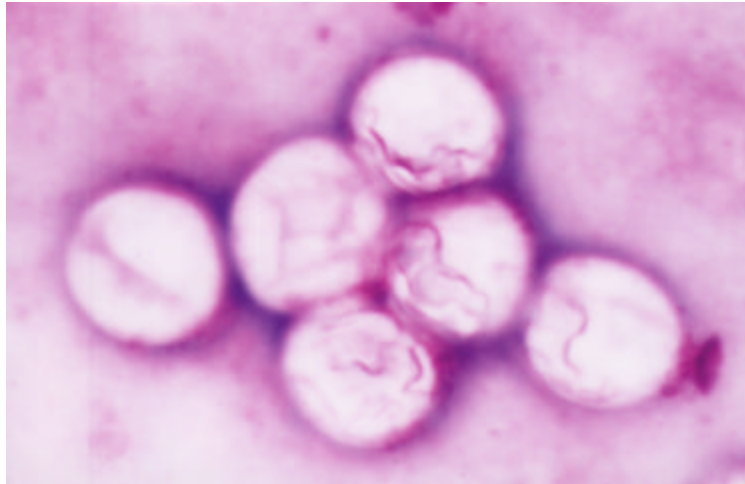


Fig. 4. Ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* con aspecto de “vidrio molido”, en donde se aprecia la falta de afinidad tintoreal.

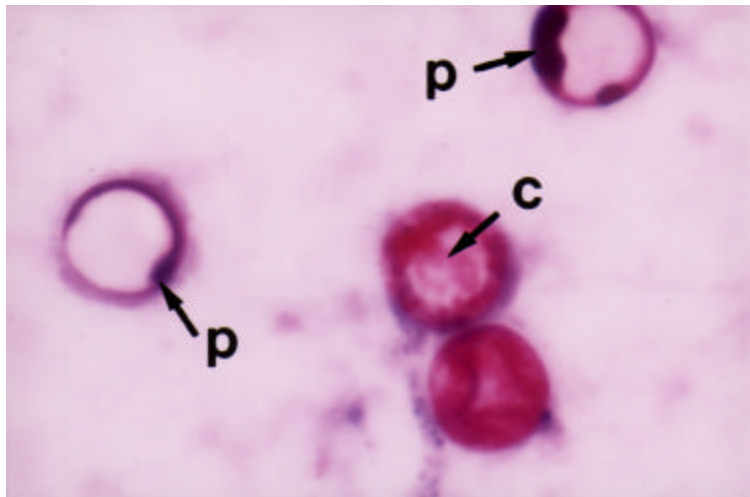


Fig. 5. Alteración en la afinidad tintoreal de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* provenientes de la muestra de un paciente bajo tratamiento con trimetoprim-sulfametoxazol en donde se observa la presencia de precipitados del colorante polarizados hacia la cubierta interior (p), también se observa un ooquiste con captación irregular del colorante hacia la región central (c)

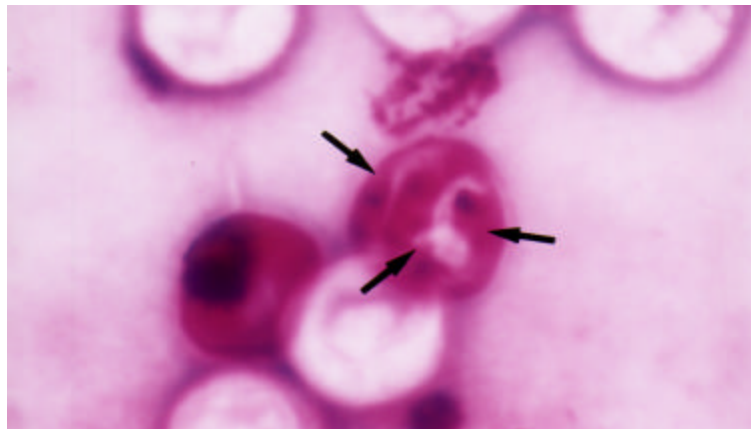


Fig. 6. Frotis de materia fecal de un paciente con leucemia aguda linfoblástica, teñido mediante Técnica de Kinyoun contrastada con Giemsa en donde se puede observar un ooquiste esporulado con la presencia de varios esporozoítos alargados en su interior. Alrededor se observan varios ooquistes sin afinidad tintoreal.

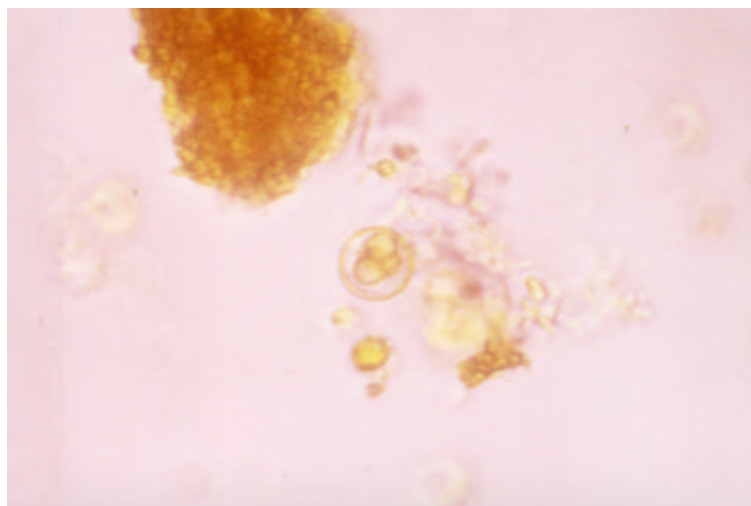


Fig. 7. Examen directo en fresco de materia fecal, en donde se observa un ooquiste de *Cyclospora cayetanensis* en proceso de esporulación. Obsérvese la presencia de dos esporoblastos en formación hacia el centro de la estructura parasitaria.

microscopía en fresco mediante técnicas de epifluorescencia, pero con la desventaja de que en la mayoría de los laboratorios en donde se realiza diagnóstico parasitológico en materia fecal, no se cuenta con los instrumentos para llevar a cabo dicha técnica.¹⁰

LAMINILLAS FIJAS TEÑIDAS

El examen de laminillas fijas teñidas con colorantes para organismos ácido-alcohol resistentes para establecer el diagnóstico etiológico en parasitología se ha venido realizando en fechas recientes, fundamentalmente con organismos Apicomplexa tales como *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e *Isospora*.^{13,19}

En relación con la afinidad tintorial *Cryptosporidium* es constante, con diversos grados de uniformidad, mientras que en *Isospora* se tiñen básicamente los esporoblastos, presentándose escasa coloración del espacio entre estos y la cubierta del ooquiste. En cambio se ha encontrado que *C. cayetanensis* presenta una gran variabilidad tintorial, pudiendo observarse la presencia de abundantes ooquistes que no se tiñen o bien se tiñen débil o irregularmente, sobre todo en infecciones intensas. En estos casos los ooquistes presentan un aspecto cristalino con apariencia de vidrio fracturado o molido, sin que pueda apreciarse estructura alguna dentro del ooquiste (Figura 4).⁷ Long y col., consideran que las variaciones son debidas a la extrema sensibilidad que presentan los ooquistes a la desecación, de tal manera que se presentan fenómenos de deshidratación intrínseca con la mayoría de los métodos utilizados en el proceso diagnóstico, que provocan de manera secundaria la salida de las estructuras internas potencialmente susceptibles de ser teñidas, sin que la posterior rehidratación per-

mita su recuperación.¹⁷

La capacidad de ácido-alcohol resistencia otorgada por la presencia de estructuras susceptibles de ser teñidas en el interior del ooquiste la hemos podido confirmar mediante la observación de esporoblastos liberados del ooquiste de manera espontánea, sin necesidad de inducción enzimática, observándose que los esporoblastos se tiñen intensamente con los colorantes para organismos ácido-alcohol resistentes, aun estando fuera de la estructura quística.

La falta de capacidad tintorial de los ooquistes la hemos observado sobre todo en pacientes inmunocomprometidos con enfermedades como leucemias y SIDA. Asimismo hemos observado que durante el tratamiento de esta protozoosis con trimetoprim-sulfametoxazol y nitazoxanida, a partir de las 24 horas se presentan cambios morfológicos en la estructura externa del ooquiste con presencia de adelgazamiento, distorsión de la pared externa y vacuolización de su contenido (Fig. 5).

El tamaño de los ooquistes de *C. cayetanensis* en preparaciones montadas en fresco es muy similar al observado en laminillas teñidas para organismos ácido-alcohol resistentes, con la salvedad de que en las laminillas en fresco los ooquistes son de forma esférica regular, mientras que en las laminillas fijas pueden aparecer ligeramente deformados o colapsados. La pared de los ooquistes de *Cyclospora* es menos evidente en las laminillas fijas que en las laminillas en fresco, dependiendo también de la intensidad con que se hayan teñido, ya que en los ooquistes que toman poco colorante la pared quística es más evidente. La coloración que toman los ooquistes es muy variable, pudiendo observarse diversas tonalidades que van desde la ausencia de coloración, rosa pálido o bien rojo rubí intenso, con variaciones de intensidad dentro del mismo ooquiste.^{10,29}

Debido a la variabilidad tintorial de los ooquistes de



Cyclospora, varios autores han realizado modificaciones y reportado otras técnicas tintoriales para teñir de manera uniforme estas estructuras parasitarias, tales como la técnica de safranina modificada y la tinción modificada con peróxido de hidrógeno.¹¹

En nuestra experiencia hemos tenido buenos resultados modificando la técnica de Kinyoun al utilizar como tinción de contraste colorante de Giemsa en vez del azul de metileno; con lo cual hemos logrado observar los esporozoítos de *Cyclospora* en el interior de ooquistes esporulados (Fig. 6).

TECNICA DE ESPORULACION

Debido a que *Cyclospora* puede ser confundida con diversos artefactos o algas verde-azules por personal poco capacitado, se ha recomendado la esporulación de los ooquistes contenidos en heces mediante el uso de dicromato de potasio al 2.5% a temperatura ambiente, obteniéndose formas esporuladas en un periodo variable que va de 5 a 14 días. Los porcentajes de esporulación son muy variables, pudiendo ser menores del 50%.¹

Mediante este procedimiento es posible observar la presencia de dos esporoblastos en el interior del ooquiste, los cuales contienen dentro de cada esporoblasto dos esporozoítos. Estos últimos son difíciles de observar ya que se encuentran firmemente adosados en el interior del esporoblasto. Los esporozoítos se pueden observar cuando se efectúa el desenquistamiento mediante inducción enzimática en un medio tamponado con tripsina y taurocolato (Fig. 7).^{21,22}

En nuestra experiencia este método no es práctico, ya que el diagnóstico se retarda varios días y por lo tanto también el tratamiento específico.

DIAGNOSTICO MOLECULAR

Hasta el momento se han realizado ensayos para probar la reacción de polimerasa en cadena en el diagnóstico de *Cyclospora* con resultados alentadores. Algunos autores reportan una especificidad del 100%, sin embargo la sensibilidad es del 62%. Los muestreos realizados para probar dicha técnica aun no son suficientes.^{10,25,26}

MORFOLOGIA EN CORTES HISTOLOGICOS Y AL MICROSCOPIO ELECTRONICO.

La mayor parte de los estudios histopatológicos se han realizado principalmente en biopsias de intestino delgado de pacientes infectados, con observaciones similares en todos los casos, que indican diferentes grados de afectación sobre la mucosa intestinal, con yeyunitis y duodenitis leve a moderada. Los hallazgos más importantes consisten en el

aplanamiento de las microvellosidades con alargamiento de las criptas, observándose que el cociente villi / criptas se encuentra disminuido (0.6 - 1.5 / 1 versus 3- 4/1).

En la lámina propia se encuentra la presencia de abundante infiltrado de tipo leucocitario formado por polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas que forman un mosaico inflamatorio difuso crónico.^{7,8}

Por su localización *Cyclospora* se considera un parásito intracitoplasmático. Sus estadios "intracelulares" incluyen a la fase de esquizonte en diferentes fases de maduración. Los esquizontes son formas uninucleadas y multinucleadas rodeadas por una fina membrana continua, miden de 2 a 3 micrómetros de diámetro mayor, mientras que las formas maduras que contienen en su interior a los merozoítos miden de 5 a 6 micrómetros. La fase morfológica de los microgametocitos y macrogametocitos aun no han sido bien identificadas. Dichas fases se presentan en el tercio apical de las células intestinales dentro de una vacuola parasitófora. Ocasionalmente en la misma posición supranuclear es posible ver en contacto con un esquizonte la presencia de cuerpos uninucleados alargados, que en su interior contienen abundantes micronemas que probablemente correspondan a merozoítos libres. También es posible observar la presencia de parásitos poco diferenciados con núcleos voluminosos con abundantes ribosomas en el citoplasma.

Mediante microscopía electrónica se observa la presencia de abundantes vesículas lisosomales rodeando a la vacuola parasitófora. Los microorganismos presentan un núcleo con un nucleolo prominente. Dentro de la vesícula parasitófora se pueden observar los parásitos dispuestos en bandas de 6 a 8, pudiéndose observar algunos solitarios y otros en pares. Este último hallazgo sugiere que se encuentran en proceso de división celular. Cada cuerpo intracelular contiene además abundantes micronemas y precursores de roptrias, una de las características del phylum *Apicomplexa*.^{4,9,10}

Aunque varios autores han descrito la morfología del parásito en cortes histológicos usando procedimientos diagnósticos de rutina, aun no se ha difundido su uso como método de diagnóstico rutinario, por ser un procedimiento invasivo y porque el parásito puede aparecer en heces de enfermos con biopsia duodenal negativa.¹⁴

DISCUSIÓN

El diagnóstico de laboratorio para la identificación de *C. cayetanensis*, parásito recientemente descrito como patógeno productor de diarrea en el humano, hasta hace poco se encontraba restringido a laboratorios de tercer nivel, sin embargo en fechas recientes el diagnóstico de este parásito se ha extendido a laboratorios de primero y segundo nivel tanto estatales, como privados en diferentes partes del mundo, así lo demuestran los múltiples reportes de casos que se han venido comunicando en fechas recientes.

La experiencia diagnóstica en dichos laboratorios es

muy variable, ya que en algunos el personal técnico está capacitado para reconocer directamente a *Cyclospora* en laminillas en fresco de materia fecal, la cual posteriormente confirman mediante frotis con tinciones para organismos ácido-alcohol resistentes o epifluorescencia, mientras que otros laboratorios realizan la búsqueda únicamente mediante laminillas teñidas. La situación anterior refleja la necesidad de integrar al protocolo de estudio de diarreas que utiliza el Sector Salud el diagrama de flujo para el diagnóstico de parásitos emergentes como *C. cayetanensis*, *C. parvum* y *E. bienewisi*.

Las técnicas basadas en el diagnóstico molecular aún no se encuentran al alcance de la mayoría de los laboratorios, por lo que no se utilizan de manera rutinaria.

El diagnóstico de laboratorio de la cyclosporiasis puede ser mejorado mediante la capacitación del personal técnico en la identificación morfológica del parásito. Consideramos que el presente trabajo de revisión, así como la experiencia del Servicio y Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Pediatría aquí vertida puede ser de utilidad para este último propósito.

REFERENCIAS

- Arrowood, M. J. y C. R. Sterling. 1989. Comparison of conventional staining methods and monoclonal-based method for *Cryptosporidium* oocyst detection. J. Clin. Microbiol. 27:1490-1495.
- Ash, L. R. y T. C. Origel. 1991. Parasites: A guide to laboratory procedures and identification. Chicago Ill: American Society of Clinical Pathologists.
- Ashford, R. W. 1979. Occurrence of an undescribed coccidian in man in Papua New Guinea. Am. Trop. Med. Parasitol. 73:497-500.
- Bendall, R. P., S. Lucas, A. Moody, G. Tovey, y P. L. Chiodini. 1993. Diarrhoeae associated with cyanobacterium-like bodies: A new coccidian enteritis of man. Lancet 341:590-592.
- Berlin, W. O. G., M. S. Novak, K. R. Porschen, G. E. Long, N. G. Stelma y W. F. Schaeffer III. 1994. Recovery of *Cyclospora* organisms from patients with prolonged diarrhea. Clin. Infect. Dis. 18:606-609.
- Berlin, W. O. G., C. N. Contreas y T. M. Sowerby. 1996. Detection of *Isospora* in the stools of AIDS patients using a new rapid autofluorescence technique. AIDS 10:442-443.
- Colomina, R. J. y S. J. Villar. 1997. Características morfológicas, clínicas y terapéuticas de *Cyclospora cayetanensis*. Bol. Chil. Parasitol. 52:26-32.
- Connor, B. A., D. Shlim, J. V. Scholes, J. L. Rayburn, J. Reidy y R. Rajah. 1993. Pathology changes in the small bowel in nine patients with diarrhea associated with a coccidia-like body. Ann. Intern. Med. 119:373-382.
- Deluol, A. M., M. F. Teilhac, J. L. Poirot, F. Heyer, L. Beaugerie, y F. P. Chatelet. 1996. *Cyclospora* sp: life-cycle studies in patient by electron-microscopy. J. Eur. Microbiol. 43:128.
- Eberhard, L. M., J. N. Pieniazek, J. M. Arrowood. 1997. Laboratory Diagnosis of *Cyclospora* Infections. Arch. Patol. Lab. Med. 121:792-797.
- Entrala, E., M. Rueda-Rubio, D. Janssen, C. Mascaró. 1995. Influence of hydrogen peroxide on acid-fast staining of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Int. J. Parasitol. 26:1473-1477.
- Fryauff, D. J., R. Krippner, C. E. Purnomo y P. Echeverria. 1996. Short report: case report of *Cyclospora* infection acquired in Indonesia and treated with cotrimoxazole. Am. J. Trop. Med. Hyg. 55:584-585.
- García, L. S., D. A. Bruckner. 1997. Diagnostic Medical Parasitology, 3rded. Washington DC: Am. Soc. Microbiol. Press.
- Goodgame, W. R. 1996. Understanding intestinal spore – forming protozoa: *Cryptosporidia*, *microsporidia*, *Isospora* and *Cyclospora*. Ann intern Med. 124:429-441.
- Huang, P., J. T. Weber y D. M. Sosin. 1995. The first reported outbreak of diarrhea illness associated with *Cyclospora* in the United States. Ann. Intern. Med. 123:409-14.
- Long, E. G., E. H. White, W. W. Carmichael, P. M. Quinlisk, R. Raja, B. L. Swisher, H. Daugharty y M. T. Cohen. 1991. Morphologic and staining characteristics of a cyanobacterium-like organism associated with diarrhea. J. Infect. Dis. 1991 164:199-202.
- Long, E. G., A. Ebrahimzadeh, E. H. Withe, B. Swisher, C. S. Callaway. 1990. Alga associated with diarrhea in patients with acquired immunodeficiency syndrome and in travelers. J. Clin. Microbiol. 1990 28:1101-1104.
- Mc Dougall, R. J. y M. W. Tandy. 1993. Coccidian/Cyanobacterium-like bodies as a cause of diarrhoea in Australia. Pathology 25:375-378.
- Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover y R. H. Tenover. 1995. Manual of Clinical Microbiology. 6thed. Washington DC: Am. Soc. Microbiol. Press.
- Oii, W. W., K. S. Zimmerman y A. C. Needham. 1995. *Cyclospora* species as a gastrointestinal pathogen in immunocompetent host. J. Clin. Microbiol. 33:1267-1269.
- Ortega, Y. R., R. H. Gilman y C. R. Sterling. 1994. A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeridae) from humans. J. Parasitol. 80:625-629.
- Ortega, Y. R., C. R. Sterling, R. H. Gilman, V. A. Cama y F. Díaz. 1993. *Cyclospora* species: A new protozoan pathogen of humans. New Eng. J. Med. 328:1308-1312.
- Outbreak of diarrheal illness associated with a cyanobacterium-like body. (CLB). 1991. Epi-Aid-Report. 90:762.



24. Pape, J. W., I. R. Verdier, M. Boncy, J. Boney, W. D. Johnson Jr. 1994. *Cyclospora* infection in adults infected with HIV. *Ann. Intern. Med.* 121:654-657.
25. Pieniazek, N. J., S. B. Slemenda, A. J. da Silva, E. M. Alfano y M. J. Arrowood. 1996. PCR confirmation of infection with *Cyclospora cayetanensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2:342-343.
26. Relman, D. A., T. M. Shmidt y A. Gajadhar. 1996. Molecular phylogenetic analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggests that it is closely related to *Eimeria* species. *J. Infect. Dis.* 173:440-445.
27. Shlim, D. R., M. T. Cohen, M. Eaton, R. Rajah, E. G. Long y B. L. Ungar. 1991. An alga-like organism associated with outbreaks of prolonged diarrhea among foreigners in Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45:383-389.
28. Soave, R. 1996. *Cyclospora*: an overview. *Clin. Infect. Dis.* 23:429-437.
29. Vázquez, T. O., D. R. Jiménez, I. Martínez-Barbabosa, H. A. Ruíz, Y. Y. García. 1997. Frecuencia de *Cryptosporidium*, *Cyclospora* y *Enterocytozoon*. *Rev. Méx. Patol. Clín.* 44:79-84.
30. Wurtz, M. R., E. F. Kocka, S. C. Peter, M. C. Weldon-Line, A. Kuritza y P. Youngbluth. 1993. Clinical characteristics of seven cases of diarrhea associated with a novel acid-fast organism in the stools. *Clin. Infect. Dis.* 16:136-138.
31. Wurtz, R. 1994. *Cyclospora* a newly identified pathogen of humans. *Clin. Infect. Dis.* 18:620-623.