

Frecuencia de protozoarios intestinales identificados por microscopía y PCR en muestras diarréicas del Hospital Toribio Bencosme

Reyes J*, Gil M*, Di Massimo M+, Silverio Y+, Castro Z+.

*Docente en la PUCMM

+ Medico Interno de la PUCMM

RESUMEN

ANTECEDENTES: Las enfermedades diarréicas son un gran problema de salud pública de dispersión mundial, pero especialmente en países en vías de desarrollo por la mayor presencia de factores de riesgo que predisponen a ellas y a sus complicaciones. Siendo los protozoarios una causa importante de diarrea, se procedió a estudiar pacientes con estos patógenos en la población seleccionada.

OBJETIVOS: Determinar la frecuencia de los protozoarios intestinales: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp, *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*, mediante microscopía y PCR, en muestras de diarrea de pacientes del Hospital Dr. Toribio Bencosme desde Abril a Agosto 2012.

METODOS Y TECNICAS El estudio realizado es de tipo descriptivo de corte transversal con fuentes primarias y secundarias. La población se estableció como todos los pacientes con enfermedades diarréicas de la provincia Espaillat; se llevó a cabo un muestreo no probabilístico a conveniencia. Los participantes se entrevistaron sobre varios hábitos y factores posiblemente asociados a su diarrea, y se obtuvo una muestra de la misma. Luego a estas muestras se les realizaron las diferentes pruebas diagnósticas.

RESULTADOS: Se pudieron detectar 18 infecciones por protozoos intestinales patógenos; 6 (37.5%) de *C. parvum*, 6 (37.5%) *C. cayetanensis*, 5 (31.3%) de *G. lamblia*, 1 (6.3%) de *I. belli* y 0 (0%) de *E. histolytica*.

CONCLUSIONES: No se encontró relación estadísticamente significativa entre la infección por protozoarios y el sexo, procedencia, ocupación, presencia de síntomas, el tiempo con diarrea, la frecuencia de las deposiciones, fuente de agua potable, disposición de las excretas, lavado de las frutas y verduras antes de consumir, lavado de las manos antes de comer y luego de ir al baño, tener contacto con personas con diarrea y/o animales, ni existe relación entre la parasitosis intestinal y las características macroscópicas de las heces. Si se encontró relación entre el tratamiento del agua y la parasitosis por protozoos.

SUMMARY

BACKGROUND: Diarrheal diseases are a major public health problem due to the large number of possible complications. They have a world-wide presentation, but are especially common in developing countries. Since protozoa are a major cause of diarrhea, this investigation proceeded to study the presence of these pathogens in diarrheal patients from the selected population.

OBJECTIVES: To determine the frequency of the intestinal protozoa: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis* and *Isospora belli*, by microscopy and PCR in samples of diarrhea from patients in Dr. Toribio Bencosme Hospital from April to August 2012.

METHODS AND TECHNIQUES: The study is descriptive and cross-sectional, from primary and secondary sources. The population consisted of all patients with diarrhea in the Espaillat province, while sampling was non-probabilistic of convenience. Participants were interviewed on several habits and factors possibly associated their diarrhea, and a sample obtained. These samples underwent various diagnostic tests.

RESULTS: 18 pathogenic intestinal protozoa infections were detected, 6 (37.5%) by *C. parvum*, 6 (37.5%) by *C. cayetanensis*, 5 (31.3%) by *G. lamblia*, 1 (6.3%) by *I. belli* and 0 (0%) by *E. histolytica*.

CONCLUSION²S: No statistically significant relationship was found between infection with protozoa and gender, rural/urban residence, occupation, additional symptoms, time with diarrhea, stool frequency, source of drinking water, disposal of excreta, washing fruits and vegetables before eating, washing hands before eating and after using the bathroom, having contact with people with diarrhea and/or animals, nor was a relationship found between intestinal parasitosis and macroscopic characteristics of the stool. A significant relationship was found between home water treatment and parasitosis by intestinal protozoans.

INTRODUCCION

La enfermedad diarréica generalmente se considera como un cambio en los patrones evacuatorios,

asociándose con un aumento en su frecuencia y/o su contenido hídrico. Más formalmente, la OMS (1) define esta patología como ≥ 3 evacuaciones líquidas

*Docente en la PUCMM

+ Medico Interno de la PUCMM

o acuosas en 24h o un aumento en el número de evacuaciones/día por encima de lo normal para el individuo. Esta condición supone un gran problema de salud pública, ya que sus complicaciones incluyen la deshidratación y el desbalance hidroelectrolítico., tanto así, que la OMS [2] considera las enfermedades diarreicas como causa de 2.2 millones de muertes por año.

Las causas de diarrea son variadas, pero entre las más comunes se incluyen bacteriana, viral, parasitaria y medicamentosa. De estas causas, una categoría de interés es el parasitismo por protozoarios, ya que esta se ha encontrado muy relevante en algunos países, pero casi nulo en otros. En Corea del Sur, Cheun et al. [3] encontraron una prevalencia de 1.29% en enfermos con diarrea. En los Países Bajos, Ten Hove et al. [4] detectaron una prevalencia de 13%. En Kolkata India, Mukherjee et al. [5] descubrieron una prevalencia de 22.3% también en enfermos con diarrea. En Vhembe Sur África, Samie et al. [6] encontraron una prevalencia de 68% en pacientes hospitalizados y niños de edad escolar. Actualmente, a pesar de variar tanto de población a población, es escasa la información actualizada sobre la presencia de protozoarios en la población Dominicana.

Los factores de riesgo para la enfermedad diarreica por protozoarios también varían de población a población. Una investigación realizada en Malasia en el año 2011 por Ngui et al. [7] encontró que, en ese país en vías de desarrollo, los factores predisponentes eran mayormente socio-económicos, tales como: bajo ingreso familiar, el uso de agua sin tratamiento, la falta de eliminación apropiada de las heces, y la falta de eliminación apropiada de la basura. En comparación, otro estudio similar realizado en Alemania por Espelage et al. [8] encontró que, en ese país desarrollado, los factores de riesgo más importantes incluían viajar al extranjero, tener contacto con infantes, y comer ensalada verde diariamente, entre otros.

Muchos investigadores, incluyendo Lindsey et al. [9], Haque et al. [10-11], concuerdan que los parásitos protozoarios más importantes son la *Giardia lamblia*, la *Entamoeba histolytica*, y los miembros intestinales de la sub-clase coccidia del filo

apicomplexa (*Cryptosporidium parvum/hominis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli*). A pesar de la gran variabilidad en la prevalencia total de los protozoos, los mismos tienden a presentar una relación de aparición similar, por ejemplo Cheun et al. [3], Ten Hove et al. [4], y Mukherjee et al. [5] todos

reportan mayor detección de *G. lamblia*, seguido por *C. parvum*, y tercero *E. histolytica*. Pero existen ciertas poblaciones donde los niveles detectados no encajan en este patrón, como refieren Samie et al. [6] y Haque et al. [10]

De acuerdo con lo planteado por Bracho et al. [12], en una investigación de corte transversal realizada en Venezuela en el 2009, en la mayoría de las poblaciones el protozoo intestinal más común es la *Giardia lamblia*, también conocido como *Giardia intestinalis* y *Giardia duodenalis*. Según Carmena et al. [13] en el 2007, Yoder et al. [14] en el 2010 y Dupont et al. [15] en el 1995, varias características de la *Giardia* facilitan su contagiosidad; estos incluyen cierto nivel de resistencia a desinfectantes comunes como el cloro, la gran cantidad de quistes eliminados por personas infectadas, un largo tiempo de viabilidad, y una baja dosis necesaria para producir infección.

Otro protozoo de dispersión mundial es la *Entamoeba histolytica*. Para este agente infeccioso, la OMS [16] estima una incidencia mundial de 48 millones anualmente, con una mortalidad resultante de hasta 70 mil por año. Dificultando el diagnóstico y por ende la estimación de este parásito está la existencia de la *Entamoeba* dispar, un pariente no-patológico pero microscópicamente idéntico a la *E. histolytica*.

Dentro de las técnicas para la detección de los protozoos intestinales, de acuerdo con lo planteado por Mukherjee et al. [5], la microscopía se considera todavía como el "gold standard" para estudios epidemiológicos, por ser el método más general. Bracho et al. [17] consideran que la microscopía general es suficiente para hacer el diagnóstico e identificar las especies implicadas en la mayoría de los parasitosis, con la notable excepción de los coccidios. Resaltan que en este caso hay una alta dependencia en la experiencia y habilidad del microscopista, lo cual puede llevar a un subregistro de casos.

Los métodos moleculares como ELISA y PCR, debido a su mayor sensibilidad, se han visto usados en muchas investigaciones importantes recientemente, por ejemplo Ten Hove et al. [4] y Haque et al. [11]. En el caso específico de los coccidios, Mattsson et al. [18] consideran los métodos moleculares como herramientas clave en la comprensión de su epidemiología. Lalonde y Gajadhar [19], en un estudio comprobando la sensibilidad de PCR, obtuvieron resultados positivos en 100% de muestras de diarrea que contenían 100 ooquistes de *C.*

cayetanensis, 96% en muestras con 10 ooquistes, y 91% en muestras con un solo ooquiste.

METODOS Y TECNICAS

POBLACIÓN Y MUESTRA

El presente estudio es de tipo descriptivo, de corte transversal y de fuentes primarias y secundarias. La población de estudio consistió en todos los pacientes con diarrea que llegaron al HDTB durante los meses Abril-Agosto 2012. El proceso de selección de las muestras fue por muestreo no probabilístico por conveniencia, y consistió en la selección de 200 pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión. Después de obtener la autorización del Comité de Bioética y del Comité de Investigación del Departamento de Medicina de la Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, se captaron 400 pacientes para el estudio, de los cuales 195 rechazaron participar; de los restantes, 43 pacientes no formaron parte del estudio debido a los criterios de exclusión. La muestra final estuvo constituida por 162 pacientes. Los criterios de inclusión fueron: pacientes que procederían de la provincia Espaillat, que el paciente aceptara y firmara el consentimiento informado y que fuera paciente del hospital; mientras que el estudio excluyó a pacientes que no completaron correctamente el cuestionario, los que no entregaron muestras de heces diarreicas y los que llevaron muestras en envases inadecuados.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Previo consentimiento informado por los pacientes y representantes de los mismos, se entrevistó al paciente para llenar el cuestionario del estudio y se recolectó la muestra diarreica. Esta fue almacenada en envases plásticos para coprológico, con 10ml de solución acuosa de bicromato de potasio al 2.5% por masa, y transportadas a un laboratorio.

En el laboratorio de la Dra. Reyes, a las muestras se le realizaron los análisis de microscopia directa y método de concentración de Sheathers. Después las muestras fueron almacenadas en tubos de ensayo con tapones, bajo refrigeración. Al finalizar la recolección de muestras, todos los tubos de ensayo fueron empacados en bolsas de bioseguridad y enviados vía una compañía de envío internacional al laboratorio de la Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos en Saskatoon Canadá, bajo de la responsabilidad del Dr. Alvin Gajadhar, para el análisis por PCR.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos fue enfocado en tres aspectos. Primero, la comparación de las tasas de

prevalencia de los varios parásitos en base a los datos demográficos de los pacientes. Segundo, la relación de la infección por parásitos con las características de la diarrea, la presencia de síntomas y la presencia de factores de riesgo. Tercero, la comparación de los niveles de detección de los métodos diagnósticos usados en el estudio. Para estos fines se creó una base de datos en Excel, luego importado al programa estadístico SPSS para análisis estadísticos y creación de gráficos y tablas.

RESULTADOS

Del total de muestras recolectadas y analizadas en este estudio se obtuvo un total de 16 muestras (16/162, 9.9%) positivas para algún tipo de protozooario. Resultando en 6 muestras positivas para *C. parvum* (6/16, 37.5%), 6 muestras positivas para *C. cayetanensis* (6/16, 37.5%), 5 positivas para *G. lamblia* (5/16, 31.3%), 1 para *I. belli* (1/16, 6.3%) y 0 muestras con presencia de *E. histolytica*. Cabe destacar que el número de protozoarios excede el número de muestras positivas para protozoarios, esto se debe al hecho de que alguna muestra fue positiva para más de un parásito.

La tabla 1 presenta la relación entre la parasitosis intestinal y las características de la población estudiada. En la división por sexo del paciente, los pacientes infectados estaban igualmente distribuidos entre femenino (8/16, 50%) y masculino (8/16, 50%), mientras los pacientes sin infección por los 5 protozoos tenían una ligera tendencia a ser femeninos (81/146, 55.5%).

En el análisis de edad de los pacientes, cabe destacar que el grupo de edad infectados por protozoos predominante se encontraba en las edades <5 años (10/16, 62.5%), seguida del rango de edad de 19-50 años (4/16, 25%).

Al analizar los datos por la prueba estadística de Chi-Cuadrado de independencia, se encontró que para los cruces: tipo de paciente ($p=0.929$), sexo ($p=0.676$), edad ($p=0.250$), procedencia ($p=0.543$), y ocupación ($p=0.838$) con la población infectada o no del estudio; los valores de P eran mayor a 0.05. Esto indica que no existe una relación estadísticamente significativa entre estas variables. Aparte de estos resultados es importante también presentar la relación que existe entre los protozoarios intestinales y algunos factores de riesgo con que contaba la población. Entre los factores de riesgo estudiados se tomó en cuenta los factores de riesgo de hábitos de higiene y factores de riesgo de contacto. En la tabla 2 se muestra la

afección por estos protozoos en relación a ciertos factores de riesgo relacionados a la higiene. Se observa que el porcentaje de pacientes que tomaban agua del acueducto y la lluvia era mayor entre los pacientes infectados (31.3% y 6.3% respectivamente), que entre los pacientes no infectados (19.2% y 4.1% respectivamente). Adicionalmente, el porcentaje de pacientes que tomaban agua de botellón era menor entre los pacientes infectados (62.5%), que entre los pacientes no infectados (74.7%).

En la cuestión del tratamiento al agua de tomar, el porcentaje de pacientes que hervían el agua era mayor entre los pacientes con protozoos que sin (50.0% vs 17.1%). En contraste, el porcentaje de los que no le otorgaban ningún tratamiento al agua era mayor entre los pacientes sin infección por protozoos que con (76.0% vs. 43.8%). Al aplicar la prueba estadística de Chi-Cuadrado de independencia a los datos del estudio, se obtiene un valor de $P = 0.009$. Este valor indica la existencia de

una relación estadísticamente significativa entre estas dos variables, ya que $P < 0.05$.

Al aplicarle Chi cuadrado a los otros cruces de variables: fuente de agua de tomar ($p=0.614$), disposición de excretas ($p=0.475$), lavado de frutas y verduras antes de consumir ($p=0.799$), lavado de manos antes de comer ($p=0.594$), lavado de las manos después de ir al baño ($p=0.783$), con la población infectada o no. Se encontraron valores de $p > 0.05$, indicando que no hay relación estadísticamente significativa entre estas variables.

La detección de los protozoarios intestinales por los métodos diagnósticos utilizados en este estudio es presentada en el gráfico a continuación, mostrando una tasa de detección menor (16.7%) para los protozoarios por parte del examen directo. Seguido por un 66.7% para el método de concentración. En un 92.3% de los casos para los protozoos a los que estaba dirigido el PCR este fue efectivo para la demostración de su presencia en las muestras.

Tabla 1

Características de la Población versus Detección de Parásitos Protozoos en muestras diarreicas de pacientes en el Hospital Dr. Toribio Bencosme en el periodo Abril a Agosto del 2012.

Características de la Población		Con protozoos (n=16)		Sin protozoos (n=146)		P
		No.	%	No.	%	
Tipo de Paciente						
	Intrahospitalario	4	25.0	38	26.0	0.929
	Ambulatorio	12	75.0	108	74.0	
Sexo						
	Femenino	8	50.0	81	55.5	0.676
	Masculino	8	50.0	65	44.5	
Edad						
	<5 años	10	62.5	56	38.4	0.250
	5-12 años	2	12.5	24	16.4	
	13-18 años	0	0.0	11	7.5	
	19-50 años	4	25.0	37	25.3	
	>50 años	0	0.0	18	12.3	
Procedencia						
	Rural	11	68.8	89	61.0	0.543
	Urbana	5	31.3	57	39.0	
Ocupación						
	Agrícola	0	0.0	0	0.0	0.838
	No agrícola	2	12.5	21	14.4	
	Desempleado	14	87.5	125	85.6	

Fuente: Instrumento de recolección de datos del trabajo de investigación final. “Frecuencia de Protozoarios Intestinales Identificados por Microscopía y PCR, en Muestras Diarréicas del Hospital Dr. Toribio Bencosme desde Abril hasta Agosto 2012”

Tabla 2

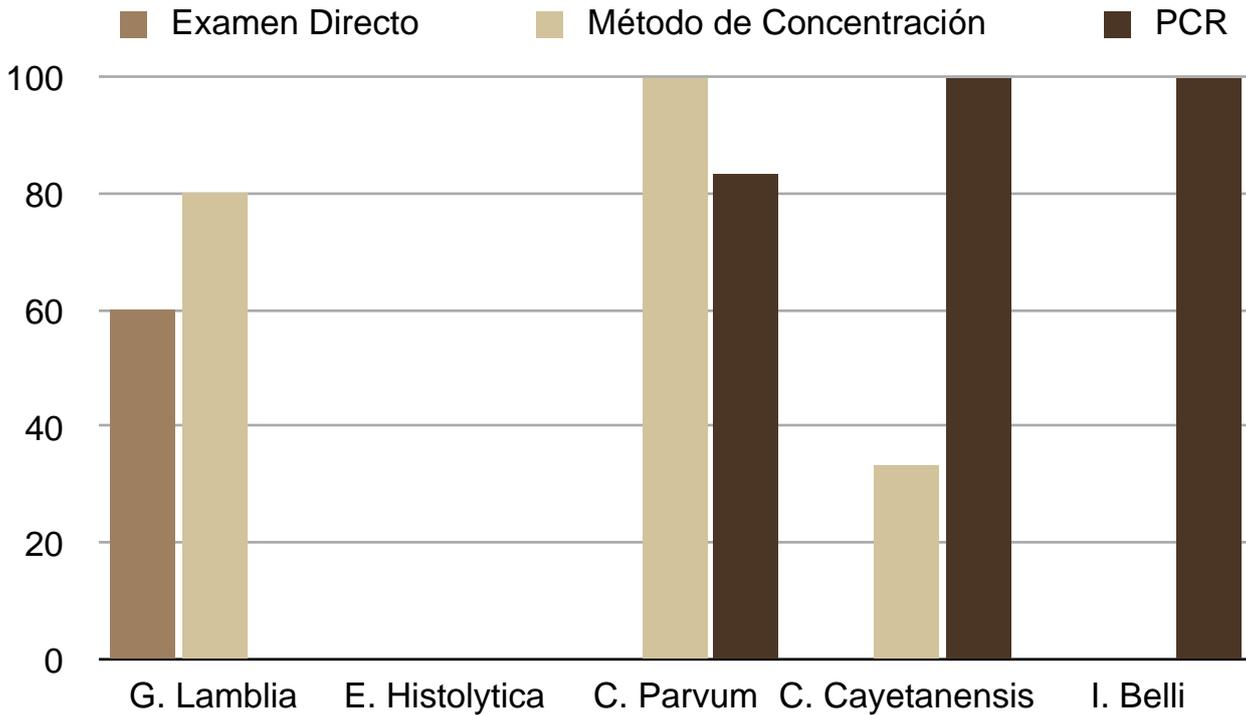
Factores de Riesgo de Hábitos de Higiene versus Detección de Parásitos Protozoos en muestras diarréicas de pacientes en el Hospital Dr. Toribio Bencosme en el periodo Abril a Agosto del 2012.

Factores de Riesgo de Hábitos de Higiene		Con protozoos (n=16)		Sin protozoos (n=146)		P
		No.	%	No.	%	
Fuente de agua de tomar						
	Botellón	10	62.5	109	74.7	0.614
	Acueducto	5	31.3	28	19.2	
	Lluvia	1	6.3	6	4.1	
	Río/Cañada	0	0.0	3	2.1	
Tratamiento casero del agua de tomar						
	Ninguno	7	43.8	111	76.0	0.009
	Hervida	8	50.0	25	17.1	
	Filtrada	0	0.0	7	4.8	
	Clorada	1	6.3	3	2.1	
Disposición de las excretas						
	Inodoro	13	81.3	97	66.4	0.475
	Letrina	3	18.8	48	32.9	
	Monte/Cañada	0	0.0	1	0.7	
Lavado de las frutas y verduras antes de consumir						
	Sí	15	93.8	139	95.2	0.799
	No	1	6.3	7	4.8	
Lavado de las manos antes de comer						
	Sí	14	87.5	120	82.2	0.594
	No	2	12.5	26	17.8	
Lavado de las manos después de ir al baño						
	Sí	15	93.8	134	91.8	0.783
	No	1	6.3	12	8.2	

Fuente: Instrumento de recolección de datos del trabajo de investigación final. “Frecuencia de Protozoarios Intestinales Identificados por Microscopía y PCR, en Muestras Diarréicas del Hospital Dr. Toribio Bencosme desde Abril hasta Agosto 2012”

Gráfico 1

Positividad de métodos diagnósticos versus Infección por protozoos intestinales, en pacientes con diarrea en el Hospital Dr. Toribio Bencosme en el periodo Abril a Agosto del 2012.



*La prueba PCR no se realizó para los protozoos G. lamblia y E. histolytica.

Fuente: Instrumento de recolección de datos del trabajo de investigación final. “Frecuencia de Protozoarios Intestinales Identificados por Microscopía y PCR, en Muestras Diarréicas del Hospital Dr. Toribio Bencosme desde Abril hasta Agosto 2012”

DISCUSION

Las enfermedades diarreicas son comunes en la población dominicana. Según el Ministerio de Salud Pública (20) componen el tercer principal motivo de consulta. En esta investigación, el 9.9% de los pacientes estudiados resultaron infectados por los protozoos previamente mencionados. Este resultado se asemeja al estudio de Ten Hove et al. (4) en Países Bajos donde la prevalencia de estos protozoarios fue de un 13%. En contraste con Samie et al. (6) en Sur Africa, Mukherjee et al. (5) en la India y Cheun et al. (3) en Corea del Sur, donde la prevalencia de protozoarios fue de 68%, 22.3% y 1.29% respectivamente. Esta variabilidad en la prevalencia de infección por países se debe al impacto que tienen los factores de riesgo y el estilo de vida de países desarrollados en contraste con países en vías de desarrollo. Por razones que faltan estudiar más a fondo, la prevalencia de infección por parásitos protozoos intestinales en la población estudiada se asemeja más a la de países desarrollados que al de países en vías de desarrollo.

De la población infectada, C. parvum (6/16, 37.5%) y C. cayetanensis (6/16, 37.5%) se encontraron en

igual proporción, G. lamblia en (5/16, 31.3%), I. belli en (1/16, 6.3%) y sorprendentemente E. histolytica no se presentó en ninguna de las muestras, a pesar del hallazgo de varias otras amebas; esto puede deberse a la temporada del año en que se recolectaron las muestras, ya que se ha vinculado la afección por este protozoo a los meses de lluvia y meses después del invierno. Por otro lado, en relación a la distribución de infección por edad del paciente, se pudo observar que la mayor cantidad de muestras infectadas pertenecieron al rango de edad < de 5 años, resultados congruentes a los estudios realizados por Cheun et al. (3), Bracho et al. (17) y Nagamani et al. (21) que evidencian que este grupo etario es el más afectado por diarrea de etiología parasitaria. Esto se debe a que los niños menores de 5 años por lo general son más susceptibles a enfermedades infecciosas, incluyendo las del tracto gastrointestinal. A pesar de que la mayoría de las enfermedades diarreicas en esta edad se deben a infecciones virales, los protozoos también juegan un papel fundamental en pacientes de este grupo. La procedencia de los paciente en el estudio revela un mayor porcentaje de pacientes que refirieron habitar en la comunidad rural entre los pacientes con detección de parásitos protozoarios intestinales

(11/16, 68.8%) que en aquellos pacientes sin detección de los mismos (89/146, 61.0%). Estos resultados se pueden deber a que diversos factores de riesgo para infección por protozoarios como son la falta de saneamiento, disposición inapropiada de las heces y basura, poca disponibilidad de agua potable, hábitos de higiene, contacto con animales entre otros, son más comunes en las comunidades rurales que en las comunidades urbanas [7]. A pesar de esto, el análisis estadístico final encontró que esta relación no fue significativa ($p=0.543$).

De acuerdo a los resultados del presente estudio existe una relación significativa entre tratamiento del agua y la parasitosis por protozoos ($p=0.009$), yendo este resultado en concordancia con lo expuesto por Ngui et al. [7] en su estudio, presentando el agua potable como un factor de riesgo para desarrollo de enfermedades diarreicas por protozoarios. La cloración del agua era 3 veces más común (6.3% vs. 3.1%), y hervir el agua también fue más común (50% vs. 17.1%), en pacientes con parásitos protozoos versus pacientes con diarrea por otras etiologías. Esto posiblemente sea debido a la aplicación inadecuada de estas técnicas, y la resistencia exhibida por los protozoos en su forma de quiste a ambientes inhóspitos. También se encontró que entre los pacientes que filtraban su agua de tomar no hubo hallazgos de parásitos. En cuanto a la disposición de las excretas, el 81.3% de pacientes infectados poseían inodoro, a diferencia de

66.4% no infectados que lo poseían; en cambio el 18.8% de los pacientes infectados por protozoos tenían letrina, en comparación a un 32.9% entre los pacientes no infectados. Un $p=0.475$ demostró que la disposición de las excretas no predispone a infección por protozoarios. Por último, para la detección de estos protozoarios mediante las diferentes técnicas utilizadas en el estudio, se observa que la microscopía directa detectó sólo 16.7% de los casos, el método de concentración 66.7% y el PCR 92.3% de los casos, resultados que van acorde a lo planteado por Mukherjee et al. [5], Haque et al. [11] y ten Hove et al. [4] que afirman que el PCR posee mayor sensibilidad para la demostración de casos y que la microscopía aunque efectiva posee desventajas como el subregistro de casos y la dependencia de la experiencia del laboratorista que ejecuta el método. Cabe destacar que para *G. lamblia* y *E. histolytica* solo se llevaron a cabo los estudios de microscopía directa y método de concentración; llegando a la conclusión de que el método de concentración detecta estos protozoos en un 80% en contraste con un 60% para la microscopía directa. En adición, *C. cayetanensis*, *C. parvum* e *I. belli* fueron detectadas mediante microscopía directa, método de concentración y PCR. Los coccidios tuvieron un mayor nivel de detección por PCR ya que se ha demostrado que mediante microscopía es muy difícil evidenciar su presencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. WHO Fact sheet on diarrhoeal disease. [En línea]; 2012 [citado 2011 09 13]. Disponible en: who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en
2. World Health Organization. Global Burden of Disease 2004 Update. Mathers C, Boerma T, Ma Fat D, editors. Geneva: World Health Organization Press; 2008. Disponible en: www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf
3. Cheun H, Cho S, Lee J, Lim Y, Jeon J, Yu J, et al. Infection status of hospitalized diarrheal patients with gastrointestinal protozoa, bacteria, and viruses in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol* 2010 Jun; 48(2): 113-20. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2892565
4. Ten Hove R, Schuurman T, Kooistra M, Möller L, van Lieshout L, Verweij J. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2007 Oct; 13(10): 1001-7. Disponible en: onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-0691.2007.01788.x/pdf
5. Mukherjee A, Chowdhury P, Bhattacharya M, Ghosh M, Rajendran K, Ganguly S. Hospital-based surveillance of enteric parasites in Kolkata. *BMC Res Notes* 2009; 2: 110. Disponible en: www.biomedcentral.com/1756-0500/2/110
6. Samie A, Guerrant R, Barrett L, Bessong P, Igumbor E, Obi C. Prevalence of intestinal parasitic and bacterial pathogens in diarrhoeal and non-diarrhoeal human stools from Vhembe district, South Africa. *J Health Popul Nutr* 2009 Dec; 27(6): 739-45. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2928113
7. Ngui R, Ishak S, Chuen C, Mahmud R, Lim Y. Prevalence and risk factors of intestinal parasitism in rural and remote West Malaysia. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(3): e974. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3046966
8. Espelage W, Heiden M, Stark K, Alpers K. Characteristics and risk factors for symptomatic *Giardia lamblia* infections in Germany. *BMC Public Health* [serie en línea] 2010 [citado 2011 Mayo 25]; 10: 41. Disponible en: www.biomedcentral.com/1471-2458/10/41
9. Lindsay B, Ramamurthy T, Sen Gupta S, Takeda Y, Rajendran K, Nair G, et al. Diarrheagenic pathogens in polymicrobial infections. *Emerging Infect Dis* 2011

- Apr; 17(4): 606-11. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3377398
10. Haque R, Roy S, Siddique A, Mondal U, Rahman M, Mondal D, et al. Multiplex real-time PCR assay for Detection of Entamoeba histolytica, Giardia intestinalis, and Cryptosporidium Spp. Am J Trop Med Hyg 2007 Apr; 76(4): 713-717. Disponible en: www.ajtmh.org/content/76/4/713.full.pdf+html
 11. Haque R, Mondal D, Karim A, Hossain M, Rahim A, Faruque A, et al. Prospective case-control Study of the Association between common Enteric Protozoae Parasites and Diarrhea in Bangladesh. Clinical Infections Disease 2009; 48: 1191-7. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883291
 12. Bracho M, Chirinos M, Luna M, Cheng-Ng R, Dias O, Botero L. Frecuencia de Giardia en Pacientes con Diarrea y el Papel del Agua para Consumo Humano en su Transmisión. Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences 2009; 17(1): 5-13. Disponible en: revistas.luz.edu.ve/index.php/cien/article/viewFile/1282/1249
 13. Carmena D, Aguinagalde X, Zigorraga C, Fernández-Crespo J, Ocio J. Presence of Giardia cysts and Cryptosporidium oocysts in drinking water supplies in northern Spain. J Appl Microbiol 2007 Mar; 102(3): 619-29. Disponible en: onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2006.03193.x/pdf
 14. Yoder J, Harral C, Beach M, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Giardiasis surveillance - United States, 2006-2008. MMWR Surveill Summ 2010 Jun; 59(6): 15-25. Disponible en: www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5906a2.htm
 15. DuPont H, Chappell C, Sterling C, Okhuysen P, Rose J, Jakubowski W. The infectivity of Cryptosporidium parvum in healthy volunteers. N Engl J Med 1995 Mar; 332(13): 855-9. Disponible en: www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199503303321304
 16. World Health Organization. The world health report 1998: life in the 21st century: a vision for all. Geneva: World Health Organization Press; 1998. Disponible en: www.who.int/whr/1998/en
 17. Bracho A, Rivero-Rodriguez Z, Salazar S, Jaimes P, Semprun M, Monsalve-Castillo F, et al. Cryptosporidium sp. y otros parásitos intestinales en niños menores de 5 años con diarrea y su relación con las pruebas coprocualitativas. Kasmera 2010; 38(2): 128-137. Disponible en: www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0075-52222010000200005&script=sci_arttext
 18. Mattsson J, Insulander M, Lebbad M, Bjorkman C, Swenungsson B. Molecular Typing of Cryptosporidium parvum associated with a Diarrhea Outbreak Identifies Two Sources of Exposure. Epidemiol Infect 2008; 136: 1147-1152. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2870910
 19. Lalonde L, Gajadhar A. Highly sensitive and Specific PCR Assay for Reliable Detection of Cyclospora Cayetanensis Oocysts. Applied and Environmental Microbiology 2008; 74(14): 4354-4358. Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2493149
 20. DIGEPI. Dirección General de Epidemiología. Indicadores básicos de salud República Dominicana 2011. [En línea]; 2011 [citado 2012 05 10]. Disponible en: new.paho.org/dor/images/stories/archivos/Indicadores_de_Salud_2011.pdf
 21. Nagamani K, Ranga R, Mathur G, Phani K, Pattepu R, Saxena N. Prevalence of Cryptosporidium, Cyclospora cayetanensis and Isospora belli Infection among Diarrheal Patients in South India. Tropical Medicine and Health 2008; 36(3): 131-136. Disponible en: www.jstage.jst.go.jp/article/tmh/36/3/36_2007-45/pdf