



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**EFICACIA DE UNA NUEVA TÉCNICA DE COLORACIÓN PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE COCCIDIOS EN MUESTRA DE HECES**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN
TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO Y ANATOMÍA
PATOLÓGICA**

AUTOR:

Tarazona Loyola, Lizbeth Milagros

ASESOR:

Guerrero Barrantes, Cesar Enrique

JURADOS

Medina Espinoza, Regina

Lagos Castillo, Morayma Angélica

Paredes Campos, Felipe Jesús

Lima - Perú

2018

Eficacia de una Nueva Técnica de Coloración para la Identificación de Coccidios en Muestra
de Heces

Lizbeth Milagros Tarazona Loyola

INDICE

RESUMEN	5
SUMMARY	6
INTRODUCCION	7
CAPÍTULO I PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	8
1.1 Identificación y Descripción del Problema	8
1.2 Formulación de las preguntas general y específicas	10
1.2.1 <i>Problema general</i>	10
1.2.2 <i>Problemas específicos</i>	10
1.3 Objetivos Generales y Específicos	10
1.3.1 Objetivo General	10
1.3.2 Objetivos Específicos	11
1.4 Justificación	11
CAPITULO II MARCO TEORICO.....	13
2.1 Antecedentes	13
2.2 BASES TEORICAS	14
2.3 Hipótesis	22
2.3.1 Hipótesis General	22
2.3.2 Hipótesis Alternativa	22
2.4 Términos básicos	23

CAPITULO III MÉTODO	24
3.1 TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	24
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA:.....	24
3.2.1 Población:.....	24
3.2.2 Muestras:.....	24
3.3 VARIABLES Y OPERACIONALIZACION.....	26
3.4 RECOLECCIÓN DE DATOS E INSTRUMENTOS:.....	26
3.5 PROCEDIMIENTOS: MATERIALES Y EQUIPOS.....	26
3.6 ANÁLISIS DE DATOS.....	27
3.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	29
CAPITULO IV RESULTADOS.....	30
4.1 RESULTADOS:.....	30
CAPITULO V DISCUSION, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
5.1 Discusiones.....	35
5.2 Conclusiones.....	36
CAPITULO VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS.....	41
ANEXO: 1.....	42
MATRIZ DE CONSISTENCIA LOGICA	42
Anexo: 2.....	43

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la eficacia de una nueva técnica de coloración a base de colorantes naturales para la identificación de coccidios en muestra de heces. La metodología fue de tipo prospectivo comparativo experimental. Se seleccionaron 100 láminas, con extendidos de muestras positivas para coccidios, se utilizaron 4 láminas por cada coloración, separando dos grupos el primero para la coloración estándar (Ziehl-Neelsen) y el segundo grupo para la coloración con *Beta vulgaris*. Luego de colorear las láminas se procedió a codificarlas. La nueva técnica mostro una sensibilidad del 99%, igual a la técnica de Ziehl-Neelsen. La sensibilidad de detección de ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli* y *Cyclospora cayetanensis* fue del 100%. En conclusión, la nueva técnica podría utilizarse como de rutina y confirmatoria para la identificación de coccidios.

Palabras claves: Coloración Ziehl-Neelsen, coccidios, betarraga (*Beta vulgaris*).

SUMMARY

The objective of this study was to determine the efficacy of a new coloring technique based on natural dyes for the identification of coccidia in stool samples. The methodology was an experimental comparative prospective type. 100 sheets were selected, with spreads of positive samples for coccidia. Four sheets were used for each color, separating two groups, the first one for standard coloring (Ziehl-Neelsen) and the second group for coloring with *Beta vulgaris*. After coloring the sheets, they were coded. The new technique showed a sensitivity of 99%, equal to the Ziehl-Neelsen technique. The detection sensitivity of oocysts of *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli* and *Cyclospora cayetanensis* was 100%. In conclusion, the new technique could be used as routine and confirmatory for the identification of coccidia.

Key words: Ziehl-Neelsen coloration, coccidia, beetraga (*Beta vulgaris*).

INTRODUCCION

Las técnicas de coloración, utilizadas en parasitología clínica son de gran importancia cuando la detección e identificación de algunos protozoarios intestinales se hace dificultosa. Este es el caso de coccidios, (especies de *Cryptosporidium*, *Isospora* y *Cyclospora*), que para su identificación requieren de coloraciones especiales, este grupo de parásitos presentan un comportamiento ácido alcohol resistente de la cubierta quística. Las paredes celulares contienen ácidos grasos (ácidos micólicos) de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) que les confiere la propiedad de resistir la decoloración con alcohol ácido, después de la tinción con colorantes básicos. Por lo que se denomina coloración ácido alcohol resistente (Magaró, H. et al 2008).

En la actualidad los coccidios, son considerados como una de las patologías de mayor importancia en los pacientes infectados por el Virus de la inmunodeficiencia Humana (VIH); son los parásitos más frecuentemente asociados con diarrea persistente y con pérdida de peso (Sánchez 2011).

El diagnóstico apropiado es de suma importancia, el diagnóstico de laboratorio se realiza a través de la técnica de microscopía de luz y tinción de Ziehl-Neelsen modificada (el Gold estándar en identificación), que ha jugado un rol fundamental, siendo considerada la piedra angular del diagnóstico diferencial de coccidios en humanos. Sin embargo, diversos son los problemas que implica su uso. como es principalmente el costo del colorante por lo que no es considerada como una técnica rutina y en muchas ocasiones no se realiza si no es solicitado por el médico.

CAPÍTULO I PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Identificación y Descripción del Problema

Las coccidias comprenden un grupo de parásitos protozoarios oportunistas, en los que se encuentran *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*. Son microorganismos que frecuentemente ocasionan diarreas crónicas (Capó de Paz, 2003).

Hoy en día se le considera un indicador clínico de inmunodeficiencia junto con la pérdida de peso y la candidiasis oral. También, se le considera un marcador independiente de mal pronóstico ya que tiene un efecto profundo en la morbimortalidad de estos pacientes. En la mayoría de los casos se trata de diarreas crónicas, refractarias al tratamiento que conllevan a deshidratación, trastornos electrolíticos, mal absorción (Capó de Paz, 2003).

El diagnóstico apropiado es de suma importancia, la coloración de ziehl-Neelsen modificada es considerada la técnica fundamental del diagnóstico diferencial de coccidios en humanos. Sin embargo, diversos son los problemas que implica su uso, como es principalmente el costo del colorante, pues en laboratorios de bajos recursos resulta difícil su aplicabilidad y en muchas ocasiones no se realiza si no es solicitado por el médico (Galvan-Díaz, 2008).

Por tal motivo, se hace necesario contar con técnicas alternativas para este diagnóstico, técnicas que sean de fácil aplicación y de bajo costo, para poder ser implementadas como pruebas de rutinas en el protocolo de trabajo de los laboratorios de parasitología de los centros de salud.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia de una nueva técnica de coloración a base de la betarraga (*Beta vulgaris*) para la detección de coccidios en muestra de heces como una alternativa en el diagnóstico de este grupo de parásitos.

1.2 Formulación de las preguntas general y específicas

1.2.1 Problema general

- ¿Cuál es la eficacia de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparado con la coloración de ziehl-Neelsen modificada?

1.2.2 Problemas específicos

1. ¿Cuál es la especificidad, de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparado con la coloración de Ziehl-Neelsen modificada?
2. ¿Cuál es la Sensibilidad, de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparado con la coloración de Ziehl-Neelsen modificada?

1.3 Objetivos Generales y Específicos

1.3.1 Objetivo General

- Determinar la eficacia de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparado con la coloración de Ziehl-Neelsen modificada.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la especificidad, de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparado con la coloración de Ziehl-Neelsen modificada.
2. Determinar la Sensibilidad, de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparado con la coloración de Ziehl-Neelsen modificada.

1.4 Justificación

En la actualidad se emplean diversos colorantes naturales en el área de laboratorio clínico, con la finalidad de diagnosticar diversas patologías.

En el área de parasitología se hace necesaria la aplicación de técnicas de coloración, cuando la detección e identificación de algunos protozoarios intestinales se hace dificultosa. Siendo uno de estos el grupo de las coccidias.

Se debe tener presente que este grupo de protozoarios requiere exámenes específicos para su diagnóstico; las coccidias intestinales se logran distinguir con la coloración de Ziehl-Neelsen modificado, uno de los exámenes no rutinarios.

La coloración de Ziehl-Neelsen modificada, es considerada la técnica fundamental del diagnóstico diferencial de coccidios en humanos. Sin embargo, diversos son los problemas que implica su uso, como es, principalmente el costo del kit empleado para esta tinción, o la adquisición en forma individual. Por lo cual no es considerada como prueba de rutina en

muestras de heces semilíquidas y líquidas, las cuales son las que suelen presentar este grupo de protozoarios; realizándose solo a solicitud específica del médico.

La coloración que se presenta como alternativa es un colorante natural extraído de la betarraga (*Beta vulgaris*); que reemplaza a la fucsina básica disminuyendo el costo del kit original, de fácil preparación y aplicación, pudiendo ser utilizada como prueba de rutina, en el protocolo de trabajo de los laboratorios de parasitología de los centros de salud, y en lugares lejanos donde se hace necesario la detección de coccidios, y no se tiene al alcance las coloraciones básicas.

Por lo expuesto, este estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia de una nueva técnica de coloración a base de la betarraga (*Beta vulgaris*) para la detección de coccidios en muestra de heces.

CAPITULO II MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes

En Argentina, Ponce, y col. (1999), realizaron un estudio sobre nuevas técnicas de tinción en *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* y especies de Microsporidia e *Isospora belli*, cuyo objetivo principal fue desarrollar una tinción para la detección simultánea de estos parásitos. La implementación de esta técnica de coloración permitió la observación de ooquistes con facilidad, concluyéndose que la técnica no solo minimiza costos, si no también reduce considerablemente el tiempo requerido para el diagnóstico.

En Colombia, Galván, y col. (2008), realizaron un estudio sobre coloraciones para el diagnóstico de *Cyclospora cayetanensis*, comparando las coloraciones Ziehl-Neelsen modificada (ZNm) y Safranina modificada (Sm) en la detección de ooquistes del parásito en muestras de materia fecal, obteniendo una sensibilidad y especificidad del 95 % y 98 % para ZNm y del 90 % y 100 % para Sm, respectivamente, concluyendo que ambas coloraciones pueden ser utilizadas para el diagnóstico de rutina.

En México, Rodríguez et al., (2011), evaluaron diferentes tinciones como HE, PAS, azul de toluidina y azul de tricromo, para el diagnóstico de microsporidios, pudiéndose utilizarse para la confirmación de criptosporidiasis.

2.2 BASES TEORICAS

2.2.1 Coloración. La coloración es un proceso en el que se produce un intercambio de iones entre los colorantes y los sitios activos de la superficie de la célula (Gamboa, 2012).

Tipos de coloración:

a) Simples: utilización de un solo tinte con el cual podemos evaluar solamente la morfología.

Las tinciones simples es cuando toda la muestra se tiñe del mismo color y se utiliza un solo colorante (Guzmán, 2016).

b) Compuestas o especiales: constituidas por 2 ó más tintes o reactivos y sirven para clasificar las bacterias u observar sus características especiales.

c) Positivas: se observa teñida la célula sobre un fondo claro.

d) Negativas: El fondo se tiñe de oscuro para observar la célula o estructuras refringentes.

2.2.2 Colorante. Un colorante biológico es una molécula que es capaz de unirse a una estructura de la célula y darle color. Los colorantes son sustancias de origen químico o biológico, generalmente tintes pigmentos, reactivos u otros compuestos, empleados en la coloración de tejidos, microorganismos para exámenes microscópicos, debiendo tener al menos, un grupo cromóforo que le proporcione la propiedad de teñir.

Molécula incolora + Cromóforo + Auxocromo = Colorante

Cromóforos principales:

Los cromóforos se presentan casi siempre en una de dos formas: Sistemas conjugados π o complejos metálicos. En la primera forma, los niveles de energía que alcanzan los electrones son orbitales π generados a partir de series de enlaces simples y dobles alternados, como sucede en los sistemas aromáticos. Entre los ejemplos más comunes podemos encontrar a los colorantes retinianos, (usados en el ojo para detectar la luz), varios colorantes de alimentos, colorantes azoicos para tela, licopeno, β -caroteno, y antocianinas (López, 2014).

Los cromóforos de complejos metálicos surgen de la división de orbitales "d" al vincular metales de transición con ligantes. Algunos ejemplos de estos cromóforos se encuentran en la clorofila, usada por los vegetales para la fotosíntesis, la hemoglobina, la hemocianina, y en metales coloreados como malaquita y amatista.

Una característica común en bioquímica, los cromóforos están formados por cuatro anillos de pirrol, que pueden ser de dos tipos:

- Pirroles en cadena abierta, no metálica: fitocromo, ficobilina, y bilirrubina.
- Pirroles en anillo (porfirina), con un AUXOCROMO. En química, son grupos o radicales positivos de átomos, que intensifican la acción de un grupo de átomos no saturados que, estando presentes en una molécula de una sustancia química, hacen que esta sea coloreada. Es decir, son grupos cargados positivamente que intensifican una sustancia o cromóforo en la síntesis de colorantes (López, 2014).

Auxocromo es un grupo funcional que no absorbe por si solo en la región del ultravioleta pero que tiene los efectos de desplazar picos de los Cromóforos hacia longitudes de onda larga además de aumentar sus intensidades. Muchos de estos grupos o radicales, son ácidos y bases que originan colorantes ácidos y básicos, y que fijan eficazmente el colorante. Un ejemplo lo

podemos encontrar en el ión diazonio que es un cromóforo fuerte generado por una base y cuya fórmula es donde R representa cualquier grupo funcional y N⁺ es el auxocromo del ión diazonio. Algunos ejemplos de auxocromos son:

Ácidos: -COOH, -OH, -SO₃H.

Básicos: -NHR, -NR₂, -NH

1. Clasificación según su composición química

a. Colorantes Básicos

Se denominan colorantes básicos si el cromóforo (porción coloreada) de la molécula está cargada positivamente, por ejemplo, cristal violeta y azul de metileno son colorantes básicos. Otros colorantes de esta categoría utilizados con frecuencia en bacteriología son safranina, fucsina básica y verde malaquita. Bajo condiciones normales de crecimiento, la mayor parte de los procariotas tienen un pH interno próximo a la neutralidad (pH 7.0) y una superficie celular cargada negativamente, así los colorantes básicos son los más eficaces. Colorantes ácidos con rojo Congo, rosa de bengala, eosina y fucsina ácida tienen un cromóforo cargado negativamente y son utilizados para teñir positivamente ciertos componentes como las proteínas (López, 2014).

b. Colorantes Ácidos

Estos están conformados por la asociación de un cromógeno de baja intensidad débilmente básico con grupos auxocromos ácidos que confieren dicho carácter al colorante, ejemplo eosina, fucsina ácida, pironina (López, 2014).

c. Colorantes Neutros

Son colorantes en los que la porción ácida y la básica colorean. Tiñen las partes básicas de una célula de un color y las partes ácidas de otro. Tiñen el núcleo de un color y el citoplasma de otro. Ej. el eosinato de azul de metileno (López, 2014).

2. Clasificación de los colorantes según su origen

a. Colorantes naturales:

Son de origen animal y vegetal. Ejemplo: El Carmín es obtenido de la cochinilla, la hematoxilina y el tornasol que son obtenidas de las plantas.

b. Colorantes Sintético:

Obtenidos como derivados del carbón de piedra o hulla. Son conocidos como anilinas y se distinguen colorantes ácidos y básico que se presentan formando sales, así como colorantes neutros. Ejemplo Cristal violeta, Violeta de genciana.

Beta vulgaris

Es una especie de planta herbácea del género *Beta* en la familia Amaranthaceae. Existen numerosas variedades de la especie que son cultivadas. La más conocida es la remolacha de jardín. Sin embargo las otras incluyen la hoja llamada acelga y la remolacha azucarera que es muy importante en la producción de azúcar (Orellano, 2015).

Taxonomía *Beta vulgaris* (Franz Eugen
Köhler,1898)

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Caryophyllales
Familia:	Amaranthaceae
Subfamilia:	Chenopodioideae
Género:	Beta
Especie:	<i>Beta</i> <i>vulgaris</i>

Es un vegetal cultivado en casi todo el mundo para el consumo en fresco como ensalada, por su contenido de azúcares, minerales y carotina, sustancias de suma importancia para la vitalidad del organismo humano en general. Las hojas tienen gran valor nutritivo, mayor que el de las grandes y suculentas raíces; las que se emplean en la alimentación humana, como forrajes y para la extracción de azúcar según las características de las distintas variedades y especies (Martínez et al., 2005).

Betalaínas

Químicamente Las betalaínas son pigmentos naturales nitrogenados hidrosolubles derivados del ácido betalámico. De acuerdo a su estructura química y a sus patrones de glicosilación o acilación, pueden proporcionar tonalidades rojas a violetas (betacianinas) y amarillas a anaranjadas (betaxantinas), (Arévalo, 2013).

La betacianina más conocida es la betanina, compuesto responsable del color típico de la remolacha y de frutos como las tunas moradas u *Opuntia ficus-indica*. A diferencia de lo que ocurre con la remolacha y, como consecuencia de su extensa variabilidad genética, los frutos de cactáceas ofrecen una gran variedad de colores por lo cual son una fuente muy promisoría de pigmentos naturales para la industria alimentaria. Recientemente se ha informado que las betalaínas tienen interesantes propiedades atrapadoras de radicales libres. En los últimos años se ha registrado gran interés por los antioxidantes y el papel que cumplen en los sistemas biológicos (Arévalo, 2013).

Ácido Betalámico

Es el cromóforo común a todos los pigmentos betalámicos; las betacianinas tienen un residuo ciclo-DOPA, mientras que las betaxantinas tienen aminoácidos o aminas adicionadas en dicha posición (Arévalo, 2013).

Estabilidad de las betalaínas

pH. Uno de los problemas mayores que tienen los colorantes naturales que se encontraron hasta el momento es su baja estabilidad. Por ejemplo, en el caso de pigmentos hidrosolubles, las antocianinas han demostrado ser muy lábiles en medio ácido, hidrolizándose rápidamente.

En el caso de las betalaínas, al ser ionizables en medio ácido, sufren cambios de color tanto a un pH por debajo de 3.5 pero no se hidrolizan (Arévalo, 2013).

Coccidios.

Los coccidios son protozoos causantes de diarreas en los países tropicales.

La infección en humanos ha sido descrita como silente o pasajera en individuos inmunocompetentes pero, en pacientes con inmunodepresión celular de origen diverso, adquiere una relevancia mayor, específicamente en la infección por VIH/SIDA.

La etiología de los síndromes diarreicos crónicos es muy variada, pero con gran frecuencia se identifican estos protozoos en las muestras de estos pacientes (Sorto, 2006).

En la actualidad los coccidios se encuentran reconocidos dentro de los cuatro amplios grupos de protozoos intestinales junto a amebas, los flagelados y los ciliados, además, son considerados parásitos tisulares estrictos con estadios sexuales y asexuales en sus ciclos vitales.

Dentro de estos grupos, solamente algunos de ellos son de importancia médica.

Seguidamente se muestra la clasificación a través de la propuesta de Levine y col. (Levine *et al.* 1980)

Amebas	<i>Entamoebahistolytica</i> <i>Entamoebacoli</i> <i>Iodamoebabiütschlii</i> <i>Endolimax nana</i>
Flagelados	<i>Giardialambliia</i>

	<i>Chilomaxixnesnili</i> <i>Dientamoebafragilis</i> <i>Especies de trichomonas</i>
Ciliados	<i>Balantidiumcoli</i>
Coccidios	<i>Especies de Crystosporidium</i> <i>Isospora belli</i> <i>Especies de Sarcocystis</i> <i>Especies de Cyclospora.</i> <i>Especies de Microsporidium.</i>

Dentro de la clasificación propuesta las de importancia clínica son las siguientes: *Isospora belli*, *Sarcocystis hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensi* (Koneman, 2008).

Los estadios diagnósticos de los coccidios, a veces son difíciles de localizar en heces y se ignoran por su apariencia casi transparente. Para su correcta detección, son esenciales la luz correcta y el enfoque cuidadoso. En infecciones por *Isospora belli*, los oocistos inmaduros se excretan generalmente en heces. En infecciones por *Cryptosporidium*, se excretan tanto oocistos inmaduros como oocistos maduros, conteniendo cuatro esporozoítos desnudos (no presenta esporoquistes). Las laminillas teñidas permanentemente usualmente son de poco o nulo valor para demostrar la presencia de coccidias. Los oocistos de *Cryptosporidium*, sin embargo, se pueden identificar en tinciones ácido resistente dentro del examen rutinario en el diagnóstico de criptosporidiosis (Brooke y Melvin, 2000).

Las tinciones por Giemsa se utilizan también, pero la mayoría de los trabajadores prefieren la tinción ácido-resistente. Los frotis directos se utilizan generalmente para detectar e identificar los oocistos de *Isospora* y *Sarcocystis* y pueden ser útiles para *Cryptosporidium*. Las tinciones de lugol y MIF, pueden ser valiosas en algunos casos; el lugol es particularmente útil para distinguirlos oocistos de *Cryptosporidium*, que no se tiñen, de las levaduras que se tiñen de café o amarillo. Los oocistos inmaduros de las especies de *Isospora* no se distinguen fácilmente de los oocistos de las especies de *Eimeria*, que parasitan a los animales menores. A veces, *Eimeria* puede ser ingerida accidentalmente con tejido animal y se excretada en heces humanas. Por lo tanto, si se sospecha que es del género de coccidia, es preferible identificar al organismo como "coccidia" e intentar obtener oocistos maduros para hacer una identificación positiva. Esto se puede lograr mezclando las heces con los oocistos en una solución de dicromato de potasio al 2% y dejarlo incubar a temperatura ambiente por 48 horas o más. Los oocistos maduros de *Eimeria* contienen cuatro esporoquistes con dos esporozoítos cada uno; los de *Isospora* contienen dos esporoquistes con cuatro esporozoítos cada uno (Brooke y Melvin, 2000).

2.3 Hipótesis

2.3.1 Hipótesis General

La nueva técnica de coloración a base de betarraga (*Beta vulgaris*), es tan eficaz como la coloración de Ziehl-Neelsen, en la identificación de coccidios intestinales.

2.3.2 Hipótesis Alternativa

La nueva técnica de coloración a base de betarraga (*Beta vulgaris*), es más eficaz con respecto a la coloración de Ziehl-Neelsen, en la identificación de coccidios intestinales.

2.4 Términos básicos

- **Auxocromo:** En química, son grupos positivos de átomos, que intensifican la acción de un grupo de átomos no saturados que, estando presentes en una molécula de una sustancia química, hacen que esta sea coloreada. Es decir son grupos cargados positivamente que intensifican una sustancia o cromóforo en la síntesis de colorantes.
- **Betalaínas:** Son metabolitos secundarios nitrogenados de las plantas que actúan como pigmentos rojos y amarillos.
- **Betacianinas:** Conjugados de ácido betalámico y ciclodopa, ambos derivados de la Tirosina. Parecen similares a los Indoles pero son biosintetizados en una vía diferente y contienen N⁺. Sus miembros son COLORANTES de Color rojo o violeta que se encuentran en el orden de Plantas Caryophyllales y en algunos Basidiomicetos.
- **Cromóforo:** Es la parte o conjunto de átomos de una molécula responsable de su color. También se puede definir como una sustancia que tiene muchos electrones capaces de absorber energía o luz visible, y excitarse para así emitir diversos colores.
- **Fitocromo** es una proteína con actividad cinasa presente en organismos vegetales, cuya función es actuar como fotorreceptor fundamentalmente de luz roja (600-700nm) y roja lejana (700-800nm), gracias a que posee un cromóforo.
- **Pirrol:** Es un compuesto químico orgánico aromático y heterocíclico, un anillo de cinco miembros con la fórmula C₄H₅N.
- **Mordiente:** Son sustancias químicas naturales o sintéticas. Antiguamente se utilizaban productos naturales (agallas de roble, cerezas) actualmente se utilizan, por su acción más energética, fundamentalmente sales metálicas de aluminio, cobre, estaño.

CAPITULO III MÉTODO

3.1 TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación reunió las condiciones para ser un estudio de tipo comparativo prospectivo experimental, de corte transversal.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA:

Ámbito temporal y espacial:

Laboratorios y Servicios generales J & F Leiva's EIRL, con sede en Surco; periodo de enero a marzo 2018.

3.2.1 Población:

Estuvo conformada por todas las muestras de heces de pacientes que llegaron al laboratorio de la empresa Laboratorios y Servicios generales J & F Leiva's EIRL, para su descarte parasitológico.

3.2.2 Muestras:

Se trabajaron 100 muestras positivas para coccidios por la técnica convencional, se empleó el muestreo probabilístico por conveniencia.

➤ Marco muestral:

Se trabajó con la data de la empresa Laboratorios y Servicios generales J & F Leiva's EIRL

➤ **Diseño muestral:**

El diseño muestral estuvo facilitado por el tipo de Muestreo por conveniencia.

➤ **Criterio de inclusión:**

Todas las muestras de heces con resultados positivos a coccidios por la técnica convencional.

➤ **Criterio de exclusión:**

Todas las muestras de heces con resultados negativos a coccidios.

3.3 VARIABLES Y OPERACIONALIZACION

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Escala de Medición	Forma de Registro
Técnica convencional para Identificación de coccidios	Técnica de coloración ácido alcohol resistente	Coloración de Zeihl-Neelsen	Binaria	<ul style="list-style-type: none">• Si• No
Nueva técnica de coloración	Técnica de coloración ácido alcohol resistente	Técnica a base de betarraga (<i>Beta vulgaris</i>)	Binaria	<ul style="list-style-type: none">• Si• No

3.4 RECOLECCIÓN DE DATOS E INSTRUMENTOS:

Ficha de Datos (anexo 2)

3.5 PROCEDIMIENTOS: MATERIALES Y EQUIPOS.

Para la realización del presente estudio se seleccionaron 100 láminas, con extendidos de muestras positivas para coccidios.

Se utilizarán 4 láminas por cada coloración, separando dos grupos el primero para la coloración estándar (zeihl-neelsen) y el segundo grupo para la coloración con *Beta vulgaris*. Luego de colorear las láminas se procedió a codificar las láminas para la evaluación.

INTERPRETACIÓN

La nueva técnica de coloración puede ser cualitativa y cuantitativa, ya que se pueden identificar las especies parasitarias y determinar el grado de infestación, la lectura cuantitativa se realiza de la siguiente manera:

- De 1 a 5 ooquistes por campo +
- De 6 a 10 ooquistes por campo ++
- De 11 a 15 ooquistes por campo +++
- De 16 a más ooquistes por campo ++++

Para determinar el grado de infestación, se debe de tomar el campo en donde haya mayor número de ooquistes.

Materiales

Betarraga.....	250gr.
Agua destilada.....	5 ml.
Mordiente (sulfato doble aluminicopotasico).....	3gr.
Alcohol al 70%.....	1L

3.6 ANÁLISIS DE DATOS

A. Sensibilidad (S) o proporción de verdaderos positivos como la probabilidad de que la prueba dé positivo condicionada a que el individuo esté enfermo.

Por lo tanto, podemos definir la sensibilidad de una prueba como la proporción de los individuos clasificados como positivos por el estándar de oro que se identifican

correctamente por la prueba en estudio. Lo anterior podemos representarlo de la siguiente formula:

$$\text{Sensibilidad} = a/(a + c); \text{ o } VP/VP + FN \times 100\%$$

a= verdaderos positivos

a+c= total de casos positivos (enfermos)

VP/FN= verdaderos positivos/falsos negativos

B. Especificidad (E) o proporción de verdaderos negativos como la probabilidad de que la prueba dé negativo condicionada a que el individuo no esté enfermo.

La especificidad de una prueba en estudio se refiere a la proporción de los individuos clasificados como negativos por el estándar de oro que se identifican correctamente por la prueba en estudio. Este parámetro responde a las siguientes preguntas:

¿Cuántos resultados negativos en personas sin la enfermedad?

¿Cuántos individuos sanos se confirmarán por el resultado de la prueba?

$$b/(b + d); \text{ o } VN/FP + VN \times 100\%$$

Donde:

b = Verdaderos Negativos

b + d = Total de casos negativos (sanos)

VN/FP = Verdaderos Negativos/ Falsos positivos

Al igual que la sensibilidad, el valor de la especificidad varía del 0 al 1 (100%), lo que significa que cuanto mayor sea el valor mayor capacidad de detección de sujetos sanos por la prueba. Además de la sensibilidad y la especificidad de una prueba, se han desarrollado

otros parámetros para poder determinar qué tanta validez tiene ésta al ser utilizada como prueba diagnóstica. Entre estos parámetros se encuentra el valor predictivo. El valor predictivo positivo de la prueba responde a las siguientes preguntas:

¿Qué proporción de todos los resultados negativos corresponde a personas realmente sanas (sin la enfermedad)?

¿Cuál es la probabilidad de que las personas con resultados negativos no tengan la enfermedad?

El cálculo se realizará de la siguiente forma:

$$VPN = VN / (VN + FN) \times 100$$

análisis de datos:

Los datos obtenidos serán analizados utilizando el programa computarizado SPSS v – 21 y el MICROSOFT EXCEL 2010 el cual nos permitirá hacer uso eficiente de las herramientas cuantitativas principales existentes para evaluar la eficacia de las pruebas diagnósticas y contribuir a su uso racional, considerando un nivel de confianza del 95%.

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

Se tuvo en cuenta los códigos de ética vigente, y se mantuvo la reserva correspondiente de los resultados.

CAPITULO IV RESULTADOS

4.1 RESULTADOS:

La nueva técnica mostró una sensibilidad del 99%, igual a la técnica de Ziehl-Neelsen, el método directo solo alcanzo un 20%, como se puede observar en la tabla N° 1

TABLA N° 1 PORCENTAJE DE SENSIBILIDAD POR TECNICA

	A Método Directo	B Ziehl-Neelsen	C Nueva técnica de coloración
Positivos	20%	99%	99%

Fuente: Laboratorios y Servicios generales J & F Leiva´s EIRL

La sensibilidad de detección de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* con la nueva técnica de coloración es del 100%, al igual que la técnica de Ziehl-Neelsen, comparando la sensibilidad del método directo solo alcanzo un 20%, como se puede observar en la tabla N° 2.

TABLA N° 2 Sensibilidad a *Cryptosporidium parvum*

A Método Directo	B Ziehl-Neelsen	C Nueva técnica de coloración
20%	100%	100%

Fuente: Laboratorios y Servicios generales J & F Leiva´s EIRL

La sensibilidad de detección de ooquistes de *Cyclospora cayetaenensis* con la nueva técnica de coloración es del 100%, al igual que la técnica de Ziehl-Neelsen, comparando la sensibilidad del método directo solo alcanzo un 20%, como se puede observar en la tabla N° 3.

TABLA N° 3 Sensibilidad a *Cyclospora cayetanensis*

A Método Directo	B Ziehl-Neelsen	C Nueva técnica de coloración
20%	100%	100%

Fuente: Laboratorios y Servicios generales J & F Leiva´s EIRL

La sensibilidad de detección de ooquistes de *Isospora belli* con la nueva técnica de coloración es del 100%, al igual que la técnica de Ziehl-Neelsen, comparando la sensibilidad del método directo solo alcanzo un 80%, como se puede observar en la tabla N° 4.

TABLA N° 4 Sensibilidad a *Isospora belli*

A Método Directo	B Ziehl-Neelsen	C Nueva técnica de coloración
80%	100%	100%

Fuente: Laboratorios y Servicios generales J & F Leiva´s EIRL

De acuerdo a la sensibilidad de las técnicas según la carga parasitaria, la técnica nueva presenta una mínima diferencia en la sensibilidad para la detección de muestras positivas, comparada con la técnica de coloración de Ziehl-Neelsen, ya que se pueden identificar las especies y determinar el grado de infestación, como podemos observar en la tabla N° 5.

TABLA N° 5 SENSIBILIDAD SEGÚN LA CARGA PARASITARIA

TECNICA CARGA PARASITARIA	C Téc. Nueva	B Ziehl- Neelsen	A Método directo
Positivo (+) (1 a 5 ooquistes)	16%	18%	31%
Positivo (++) (6 a 10 ooquistes)	42%	41%	19%
Positivo (+++) (11 a 15 ooquistes)	42%	41%	13%
Positivos no detectados	0%	0%	37%

Fuente: Laboratorios y Servicios generales J & F Leiva´s EIRL

CAPITULO V DISCUSION, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Discusiones

La realización de este estudio, nace de la necesidad de poder implementar una técnica de coloración para el diagnóstico de coccidios (especies de *Cryptosporidium*, *Isospora* y *Cyclospora*), que pueda reunir las condiciones necesarias para su aplicación como una técnica de rutina, ya que solo se aplica actualmente cuando el medico lo solicita, debido al costo de la misma.

Por tal motivo se recurrió a emplear colorantes naturales, teniendo como principio el cambiar un colorante básico por otro.

Existe poca información sobre la aplicación de colorantes naturales utilizados para la identificación de formas parasitarias.

Al realizar la parte experimental de esta nueva coloración se comparó los resultados con los obtenidos por la técnica de Ziehl-Neelsen, considerada el Gold estándar para la identificación de este grupo de parásitos.

La sensibilidad obtenida de la comparación de ambas técnicas fue del 99%.

La ventaja de la nueva coloración es que se puede utilizar con o sin contraste, lo que reduce el costo de la técnica.

5.2 Conclusiones

De acuerdo a los objetivos propuestos:

1. Se determinó en un 99% la eficacia de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparado con la coloración de Ziehl-Neelsen modificada.
2. Se comprobó en un 99% satisfactoriamente la especificidad, de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparando con la coloración de Ziehl-Neelsen modificada.
3. Se corroboró en un 99% la sensibilidad de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparando con la coloración de Ziehl-Neelsen modificada

5.3 Recomendaciones

- Se debe considerar el realizar este tipo de coloración para la identificación de coccidios en heces semilíquidas y líquidas.
- Es necesario incluir técnicas de coloración en el protocolo del trabajo de rutina en el área de parasitología.
- Se debe ampliar el estudio de las distintas pruebas coproparasitológicas en nuestro país con el fin de avanzar técnicamente en el diagnóstico parasitario.
- El utilizar los recursos naturales puede ser muy beneficioso en cuanto a costos y obtener técnicas sencillas y de fácil aplicación.

CAPITULO VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brooke, M. y Malvín, D. (2000). Morfología de los estadios diagnósticos en los parásitos intestinales en humanos. Atlanta, EEUU. Ed. CDC. Recuperado en 10 de diciembre del 2015, de http://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/DPDx/HTML/PDF_Manuals/intestinals.pdf.
- Capó de Paz, V., Barrero Brínguez, M., Velázquez Viamonte, B., Luzardo Suárez, C., Martínez Rodríguez, A., & Alujas Martínez, Z. (2003). Diagnóstico de coccidias y microsporas en muestras de heces diarreicas de pacientes cubanos seropositivos al VIH: primer reporte de microsporas en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 55(1), 14-18.
- Galvan, A., Herrera, V., Santos, Z., & Delgado, M. (2008). Coloraciones Ziehl-Neelsen y Safranina modificadas para el Diagnóstico de *Cyclospora cayetanensis*. *Revista de Salud Pública*, 10, 488-493. Recuperado de: <https://www.scielosp.org/article/rsap/2008.v10n3/488-493/>
- Galvan-Díaz, A. L., Herrera-Jaramillo, V., Santos-Rodríguez, Z. M., & Delgado-Naranjo, M. (2008). Coloraciones Ziehl-Neelsen y Safranina modificadas para el Diagnóstico de *Cyclospora cayetanensis*. *Revista de Salud Pública*, 10, 488-493.

- Gamboa, E. (2012). Microbiología y parasitología general y estomatológica. Recuperado de:
<http://www.uap.edu.pe/intranet/fac/material/11/20122BX110111208110103011/20122BX11011120811010301137878.pdf>
- Guzmán, M. (2016). Tinciones en Microbiología. Recuperado de:
<http://www.telmeds.org/wp-content/uploads/2016/11/Tinciones-en-Microbiolog%C3%ADa.pdf>
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas. Ed. Médica Panamericana.
- Ponce, P., Flaherty, P., & Zdero, M. (1999). Una Nueva Coloración Safranina Tricrómica para la Detección de *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, Especies de Microsporidia e *Isoospora belli* en Materia Fecal. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41, 211-214. Recuperado de:
<http://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-1999/mi994b.pdf>
- Rodríguez, L., Rodríguez, H., Valdez, Y., Nevárez, A. & Ramírez, R. (2011). Empleo de una tinción rápida para el diagnóstico de microsporidiosis. *Veterinaria México*, 42(2), 179-185. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/vetmex/v42n2/v42n2a6.pdf>
- Sorto R, Bú FE. Perfil clínico-parasitológico de pacientes con VIH/SIDA y diarrea crónica atendidos en el Hospital Escuela del 2003 al 2005. *RevMedHondur*.2006; 74:69-76. Recuperado el 17 de diciembre del 2015 de <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2006/pdf/Vol74-2-2006-2.pdf>
- Torres, O. (2010). Los dos pilares de la seguridad transfusional: la base de donantes voluntarios y el sistema de calidad. *Rev Mex Med Tran*, 3(1), 55-59.

ANEXOS

ANEXO: 1

MATRIZ DE CONSISTENCIA LOGICA

Eficacia de una Nueva Técnica de Coloración para la Identificación de Coccidios en Muestra de Heces

PROBLEMA	VARIABLE	OBJETIVO
Problema Principal <ul style="list-style-type: none">• ¿Cuánto es la eficacia de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparado con la coloración de ziehl-Neelsen modificada?	Variable Independiente: Muestras de heces	Objetivo principal <ul style="list-style-type: none">• Determinar la eficacia de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparado con la coloración de ziehl-Neelsen modificada.
Problemas Específicos <ul style="list-style-type: none">• ¿Cuánto es la especificidad, de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparado con la coloración de ziehl-Neelsen modificada?• ¿Cuánto es la Sensibilidad, de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparado con la coloración de ziehl-Neelsen modificada?	Variable Dependiente: La nueva Técnica de coloración para coccidios	Objetivos Específicos <ul style="list-style-type: none">• Determinar la especificidad, de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparado con la coloración de ziehl-Neelsen modificada.• Determinar la Sensibilidad, de la nueva técnica de coloración para la identificación de coccidios en muestra de heces comparado con la coloración de ziehl-Neelsen modificada.

Anexo: 2

ANÁLISIS COPROPARASITÓLOGICO

Fecha

Apellidos y Nombres

Edad

Sexo

Procedencia: Consultorio.

Hospitalizado

Aspecto de la muestra: P () SL () L ()

Examen microscópico

Método directo:

Técnica de coloración:

Zeihl-Neelsen modificado:

Técnica de coloración modificada

ANEXO 3

1	Paciente	Sexo	Condicion	Positivo	OBSERV	OBSERV 2	Met. Directo	Ziehl-Neelsen	Nueva coloracio
2	Paciente 1	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
3	Paciente 2	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
4	Paciente 3	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
5	Paciente 4	Femenino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
6	Paciente 5	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
7	Paciente 6	Femenino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
8	Paciente 7	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	Hosp	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
9	Paciente 8	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
10	Paciente 9	Femenino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
11	Paciente 10	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
12	Paciente 11	Masculino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
13	Paciente 12	Femenino	Diarreico	Positivo	Isospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
14	Paciente 13	Femenino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
15	Paciente 14	Masculino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
16	Paciente 15	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
17	Paciente 16	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
18	Paciente 17	Femenino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
19	Paciente 18	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
20	Paciente 19	Femenino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
21	Paciente 20	Femenino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
22	Paciente 21	Femenino	Pastoso	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
23	Paciente 22	Masculino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
24	Paciente 23	Masculino	Pastoso	Positivo	Cyclospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
25	Paciente 24	Femenino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
26	Paciente 25	Femenino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
27	Paciente 26	Masculino	Pastoso	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
28	Paciente 27	Masculino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
29	Paciente 28	Masculino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
30	Paciente 29	Femenino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
31	Paciente 30	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
32	Paciente 31	Femenino	Diarreico	Positivo	Isospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
33	Paciente 32	Femenino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
34	Paciente 33	Femenino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
35	Paciente 34	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
36	Paciente 35	Masculino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
37	Paciente 36	Femenino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
38	Paciente 37	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
39	Paciente 38	Masculino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
40	Paciente 39	Femenino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
41	Paciente 40	Femenino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
42	Paciente 41	Masculino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
43	Paciente 42	Femenino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
44	Paciente 43	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
45	Paciente 44	Masculino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)

46	Paciente 45	Femenino	Diarreico	Positivo	Isospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
47	Paciente 46	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
48	Paciente 47	Masculino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
49	Paciente 48	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
50	Paciente 49	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
51	Paciente 50	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
52	Paciente 51	Femenino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (+)	positivo (++)	positivo (++)
53	Paciente 52	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
54	Paciente 53	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
55	Paciente 54	Femenino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
56	Paciente 55	Femenino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
57	Paciente 56	Femenino	Pastoso	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
58	Paciente 57	Femenino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
59	Paciente 58	Femenino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
60	Paciente 59	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
61	Paciente 60	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
62	Paciente 61	Femenino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
63	Paciente 62	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
64	Paciente 63	Femenino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
65	Paciente 64	Masculino	Diarreico	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
66	Paciente 65	Masculino	Pastoso	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
67	Paciente 66	Femenino	Diarreico	Positivo	Cryptosporidiu m	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
68	Paciente 67	Femenino	Diarreico	Positivo	Cryptosporidiu m	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
69	Paciente 68	Femenino	Diarreico	Positivo	Cryptosporidiu m	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
70	Paciente 69	Masculino	Pastoso	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
71	Paciente 70	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
72	Paciente 71	Masculino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
73	Paciente 72	Femenino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
74	Paciente 73	Femenino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
75	Paciente 74	Femenino	Diarreico	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
76	Paciente 75	Femenino	Diarreico	Positivo	Cryptosporidiu m	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
77	Paciente 76	Femenino	Pastoso	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
78	Paciente 77	Masculino	Diarreico	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
79	Paciente 78	Masculino	Pastoso	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
80	Paciente 79	Masculino	Diarreico	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
81	Paciente 80	Masculino	Pastoso	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
82	Paciente 81	Femenino	Diarreico	Positivo	Cryptosporidiu m	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)

83	Paciente 82	Femenino	Diarreico	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
84	Paciente 83	Masculino	Diarreico	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
85	Paciente 84	Masculino	Diarreico	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
86	Paciente 85	Masculino	Pastoso	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
87	Paciente 86	Femenino	Pastoso	Positivo	Cryptosporidiu m	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
88	Paciente 87	Masculino	Pastoso	Positivo	Isospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
89	Paciente 88	Masculino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
90	Paciente 89	Femenino	Pastoso	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
91	Paciente 90	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
92	Paciente 91	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
93	Paciente 92	Femenino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
94	Paciente 93	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
95	Paciente 94	Masculino	Diarreico	Positivo	Isospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
96	Paciente 95	Masculino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
97	Paciente 96	Femenino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	Hosp	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
98	Paciente 97	Masculino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
99	Paciente 98	Masculino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
100	Paciente 99	Femenino	Pastoso	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)
101	Paciente 100	Femenino	Diarreico	Positivo	Cyclospora	c.ext	positivo (++)	positivo (++)	positivo (++)