

MICROSPORIDIUM spp. EN PACIENTES VIH POSITIVOS CON SÍNDROME DIARREICO.

Betty Pazmiño^{1,a} Edgar Rodas^{1,b} Jennifer Rodas^{1,b} Rosario Zambrano^{2,c} Alfredo Dávila Z^{3,e}
Luigi Martini^f, Carlos A. Pazmiño^{1,b} Linda Día^g

RESUMEN

Las infecciones diarreicas tanto agudas como crónicas constituyen un problema de salud pública, con mayor riesgo en personas con VIH positivo, quienes debido a su baja inmunidad son el blanco perfecto de parásitos oportunistas que pueden llevarlos a la muerte¹.

La microsporidiasis es una infección ocasionada por microorganismos intracelulares obligados formadores de esporas que han sido taxonómicamente reclasificados como hongos, que afectan a pacientes inmunodeprimidos y causantes de síndromes diarreicos. En Ecuador no existen investigaciones con registro de esta patología emergente y oportunista².

El primer caso en humanos se identificó en el año 1959 por Matsubayashi y colaboradores, quienes aislaron un *Microsporidium* en una muestra de líquido cefalorraquídeo en un niño de 9 años con encefalitis³

Se realizó un estudio prospectivo, descriptivo y de corte transversal. El universo estuvo constituido por 287 pacientes VIH atendidos en el Hospital de Infectología "Dr. José Daniel Rodríguez" de Guayaquil, de abril-junio del 2013 y la muestra correspondió a 89 pacientes que cumplieron con el criterio de inclusión y exclusión. Las muestras analizadas fueron heces líquidas y procesadas con diferentes tinciones: Giemsa y Tricrómica de Ryan por Microscopía óptica, Blanco de Calcoflúor por Microscopía de Inmunofluorescencia y Secado por Punto Crítico en Etanol por Microscopía Electrónica de Barrido. Para el análisis estadístico se utilizó las pruebas de t de Student, Chi cuadrado y Proporciones.

Se estudiaron 89 pacientes y el 25% (n=22) resultaron positivo para *Microsporidium* spp., de los cuales 70 (79%) son varones y 19 (21%) son mujeres. Los niveles de CD4 + de los 22 pacientes infectados 12 (54%) presentan valores menores a 200 células/mm³ 7 (32%) evidenció valores mayores a 200 células/mm³ y 3 (14%) no se realizaron la prueba. De los 22 pacientes

positivos 16 (73%) son de la provincia del Guayas, 3 (14%) son de Manabí, 2 (9%) son de Los Ríos, y 1 (4%) es del Chimborazo.

En Ecuador se identificó por primera vez la prevalencia de la infección por *Microsporidium* spp en pacientes VIH POSITIVOS con síndrome diarreico, el cual correspondió al 25% (n=22), es decir que por cada 89 pacientes 22 resultan positivos para este microorganismo.

Palabras claves: *Microsporidium* spp, inmunodeprimidos, Tinción de Giemsa, Tinción Tricrómica de Ryan, Tinción Blanco de calcoflúor. Inmunocompetentes

SUMMARY

Both acute and chronic diarrheal infections are a public health problem, with increased risk in HIV-positive individuals who because of their low immunity are the perfect opportunistic parasites that can lead to death white.

The microsporidiasis is an infection caused by intracellular spore-forming microorganisms bound to have been taxonomically reclassified as fungi, affecting immunocompromised patients and causing diarrheal syndromes. In Ecuador there is no record of this research with emerging and opportunistic disease²

The first human case was identified in 1959 by Matsubayashi and colleagues, who isolated a *Microsporidium* in a cerebrospinal fluid sample on a 9 year old boy with encephalitis³

A prospective, descriptive, cross-sectional study. The universe consisted of 287 HIV patients treated at the Hospital of Infectious Diseases "Dr. José Daniel Rodríguez" de Guayaquil, April -June 2013 and the sample consisted of 89 patients who met the inclusion and exclusion criteria. The samples analyzed were liquid

stools and processed with different stains: Giemsa and Trichrome Ryan by optical microscopy, calcofluor white Immunofluorescence Microscopy and Critical Point Drying Ethanol by Scanning Electron Microscopy . For statistical analysis the Student t test was used, Chi squared and Proportions.

89 patients were studied and 25% (n = 22) were positive for *Microsporidium* spp., Of which 70 (79%) were male and 19 (21 %) are women . CD4 + levels of the 22 infected 12 patients (54 %) have values below 200 cells/mm³, 7 (32 %) showed values greater than 200 cells / mm³ and 3 (14%) were not performed the test. Of the 22 positive patients 16 (73%) are from the province of Guayas, 3 (14 %) are of Manabí, 2 (9 %) are of Los Ríos, and 1 (4%) is of Chimborazo.

In Ecuador was identified for the first time the prevalence of infection in HIV POSITIVE *Microsporidium* spp patients with diarrheal syndrome, which corresponded to 25 % (n = 22), ie that for every 89 patients 22 are positive for this organism.

Keywords: *Microsporidium* spp, immunocompromised, Giemsa stain, Trichrome stain Ryan stain fluorine White decal, Immunocompetent.

1 Directora Centro Bacteriológico y Laboratorio Clínico Pazmiño

2 Facultad de Ciencias Médicas.

3 Laboratorio Microbiológico DZ

a Magister en Microbiología Mención Biomédica

b Asistente de Laboratorio Clínico

c Directora Escuela de Graduados

d Especialista en Legislación Educativa

e Director Laboratorio Microbiológico DZ

f Microbiólogo

g Jefe Laboratorio

Correspondencia

MSc. Betty Pazmiño Gómez
Directora Centro Bacteriológico y Laboratorio Clínico Pazmiño.
Email: b.pazmiño@hotmail.com
Guayaquil - Ecuador

Recibido el 24 de Abril del 2014
Aceptado el 15 de Mayo del 2014.

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento continuo de la calidad de atención en pacientes es un reto cada vez mayor para los servicios de salud, que demanda una gestión eficaz, oportuna y eficiente para los usuarios externos.

La diarrea es un problema gastrointestinal presente en las infecciones oportunistas de mayor frecuencia en pacientes con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH positivos), cuya etiología puede ser bacteriana, micótica, viral o parasitaria. En el ámbito de las parasitosis, motivo de este estudio, investigaciones a nivel mundial asocian a los Coccidios como causa de diarrea en pacientes inmunodeprimidos e inmunocompetentes. Dentro de este grupo se encuentran: *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayentanensis*, *Isosporidia belli* y *Microsporidium* spp., los mismos que por compartir características de protozoos y de hongos generan polémica acerca de su clasificación.¹³

Uno de los microorganismos que afectan a pacientes inmunodeprimidos causantes de síndromes diarréicos es el *Microsporidium* que pertenece al grupo de protozoos de la clase Microsporidia, formadores de esporas. La infección se produce en el hombre generalmente por ocho géneros de *Microsporidium*: *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Nosema*, *Pleistophora*, *Vittaforma*, *Trachipleistophora*, *Microsporidium* y *Brachiola*.²

El primer caso se identificó en el año 1959 por Matsubayashi y colaboradores, quienes aislaron *Microsporidium* de una muestra de líquido cefalorraquídeo en un niño con encefalitis.

Este microorganismo ocasiona graves lesiones dependiendo del órgano afectado, como ceguera, hepatitis, síndrome diarréico, especialmente en pacientes con VIH que pueden concluir en casos fallidos.³

Considerando el número creciente de casos de VIH en el país y la falta de estudios de *Microsporidium* asociados con ésta enfermedad, se establece la necesidad de realizar un proceso de investigación de casos VIH positivos concomitantes con este microorganismo, lo que amerita efectuar la identificación para generar un diagnóstico oportuno mediante los métodos de tinción de alta sensibilidad y especificidad, como las de Giemsa y Tricrómica modificada de Ryan.

Un método diagnóstico confirmatorio es el de Inmunofluorescencia, utilizado como "Gold Standar", además está la microscopía Electrónica de Barrido (SEM) que permitirá observar las estructuras superficiales.

Existen en la actualidad otras pruebas como la técnica de Western Blot y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) considerados por el Centro para el Control y Prevención de enfermedades (CDC) como los métodos de referencia para la identificación de *Microsporidium*.^{4, 5}

Los *Microsporidium* son parásitos obligados que se presentan con mayor frecuencia en pacientes VIH positivos en los que se identifican dos géneros con cuatro especies: *Enterocytozoon bienewisi*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon cuniculi* y el *Encephalitozoon intestinalis*.

Enterocytozoon bienewisi fue la primera especie identificada en Haití en el año 1985 en pacientes VIH - SIDA con diarrea acuosa excesiva. Posteriormente se identifica a *Septata intestinalis* que en la actualidad está clasificado en el género *Encephalitozoon*, siendo la segunda especie causante de diarreas diseminadas.⁶

Se han notificado infecciones humanas por *Microsporidium* en todo el mundo, tanto en inmunodeprimidos como en inmunocompetentes. En Europa y Estados Unidos fluctúan entre el 12% y el 50%; Alemania 36%; España 15%; Níger Bretagne 7%; Zimbabue 10%; México 31%; Brasil 27%; Colombia 3.5%; Cuba 30%; Uruguay 54%; (4, 6 - 8). En Senegal (África) se obtuvo en un estudio el 9.4%; Venezuela 50% y en Ecuador no hay registro sobre *Microsporidium*.⁹⁻¹⁰

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación es un estudio prospectivo, descriptivo y de corte transversal.

Se realizó en los pacientes VIH positivos atendidos en el Hospital de Infectología "Dr. José Daniel Rodríguez" de la ciudad de Guayaquil, durante el período de abril a junio de 2013. Se generó un formato para la recolección de datos, los que fueron tomados directamente de la historia clínica de los pacientes, a los que se recolectó muestras de heces. A todas las muestras se les realizó diferentes tinciones: Giemsa, Tricrómica Modificada de Ryan, Blanco de Calcoflúor y Método por filtración con revestimiento en oro, para identificar *Microsporidium* spp.

MUESTRA

Muestra de heces de 89 pacientes VIH positivo con síndrome diarréico, que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes VIH positivos con presencia de diarrea, ingresados en el área de Emergencia y hospitalización del hospital de Infectología "Dr. José Daniel Rodríguez", por solicitud bajo criterio del médico clínico.
2. Datos de historia clínica y resultados de laboratorio con nivel de CD4+.
3. Calidad de la muestra, para realizar el estudio en el laboratorio de Microbiología.

3.1.1 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Pacientes VIH positivos sin presencia de diarrea, ingresados en el área de Emergencia y hospitalización del hospital de infectología "Dr. José Daniel Rodríguez".
2. No poseer Historia Clínica o resultados de laboratorio con nivel de CD4+.
3. Muestras que incumplan con la calidad requerida para el estudio.

RESULTADOS

De los 89 pacientes VIH positivos con síndrome diarréico, se identificó en 22 casos (25%) positividad para *Microsporidium* spp y 67 (75%) fueron negativos (Tabla 1)(Gráfico 1).

Casos <i>Microsporidium</i> spp	Nº	(%)
POSITIVOS	22	25%
NEGATIVOS	67	75%
Total	89	100%

Gráfico 1 Prevalencia de *Microsporidium* spp. Guayaquil, abril - junio 2013

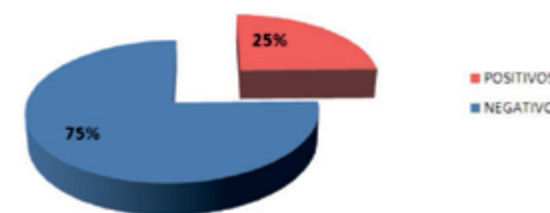


Tabla 1. Prevalencia de *Microsporidium* spp. Guayaquil, abril - junio 2013
Fuente: Base de datos del Investigador

De acuerdo a los datos demográficos presentados en este estudio, 70(79%) son varones y 19(21%) son mujeres. En el gráfico se puede apreciar que la infección por este microorganismo, es mayor en el sexo

masculino 14(16%) que en el femenino 8(9%) (Tabla 2)(Gráfico 2).

GENERO	Negativo	%	Positivo	%	Total	%
Femenino	11	12%	8	9%	19	21.35%
Masculino	56	63%	14	16%	70	78.65%
TOTAL	67	75%	22	25%	89	100%

Gráfico 2 Distribución según género de los pacientes en estudio y con presencia de *Microsporidium* spp.

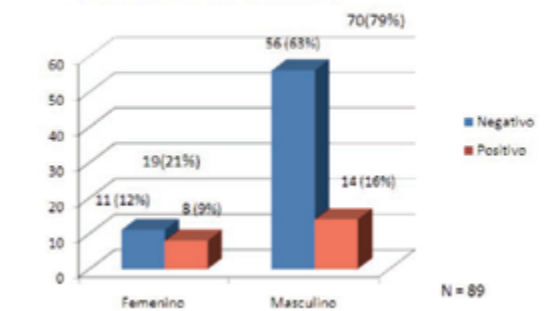


Tabla 2. Distribución según género de los pacientes en estudio y con presencia de *Microsporidium* spp.
Fuente: Historia clínica del paciente

El rango de edad de los pacientes que presentan *Microsporidium* spp es de 20 a 73 años, con un promedio de 38.7 años. En pacientes menores de 44 años se identificó el microorganismo con el 81%, frente a un 19% en aquellos mayores a 44 años. (Tabla 3)(Gráfico 3).

INTERVALO	FRECUENCIA ABSOLUTA	FRECUENCIA RELATIVA	%
[17 - 26)	5	5/22 = 0,22	22%
[26 - 35)	6	6/22 = 0,27	27%
[35 - 44)	7	7/22 = 0,32	32%
[44 - 53)	2	2/22 = 0,09	9%
[53 - 62)	1	1/22 = 0,05	5%
[62 - 71)	-	0/22 = 0,00	0%
[71 - 80]	1	1/22 = 0,05	5%
TOTAL	22		100%

Gráfico 3 Distribución de frecuencia por edades de los pacientes en estudio

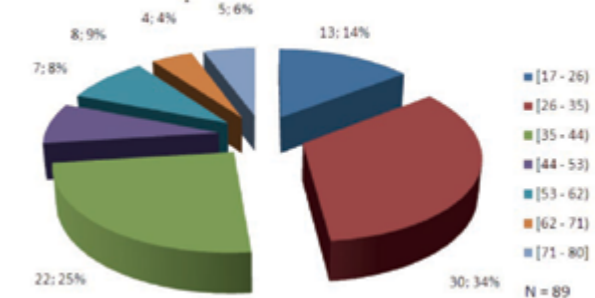


Tabla 3. Distribución de frecuencia por edades de los pacientes con *Microsporidium* spp

Con los datos obtenidos de las historias clínicas se determinó la distribución de acuerdo al lugar de procedencia: Guayas 70(79%), Los Ríos 9 (10%), Manabí 5 (6%), Santa Elena 3 (3%) y Chimborazo 2 (2%). Siendo Guayas la que presenta mayor porcentaje de casos (Tabla 4)(Gráfico 4).

POR PROCEDENCIA		
INTERVALO	FRECUENCIA ABSOLUTA	FRECUENCIA RELATIVA
Chimborazo	1	5%
Guayas	16	73%
Los Ríos	2	9%
Manabí	3	14%
Total	22	100%

Gráfico 4 Distribución de frecuencia por edades de los pacientes con *Microsporidium spp.*

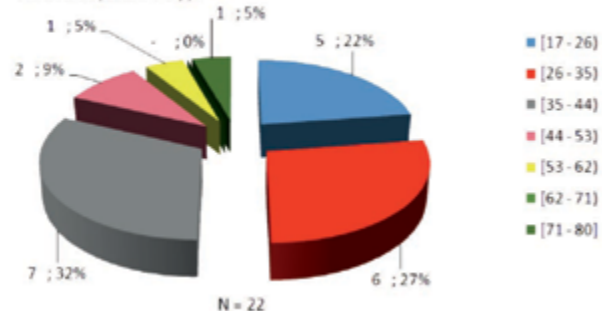


Tabla 4. Distribución de pacientes VIH positivo con *Microsporidium spp.* por Provincias

Fuente: Historia Clínica del paciente

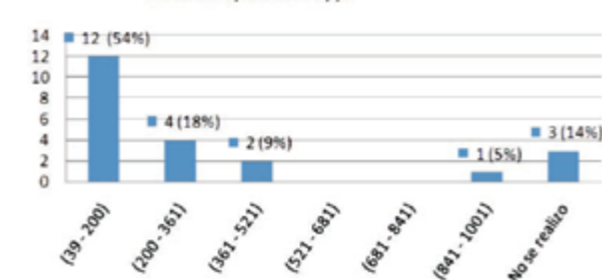
Al evaluar las historias clínicas de los 89 pacientes objeto del estudio, se obtuvo un total de 22 pacientes con *Microsporidium spp.* con sus respectivas determinaciones de linfocitos CD4+. De los cuales 12 (54%) tienen niveles de CD4+ menor a 200 células/mm³ y 7 (32%) presentan niveles superiores a 200 Células/mm³. No tenían registro de CD4+ en la historia clínica 3 (14%). Se pudo observar que los valores de CD4+ oscilan entre 39 y 860 células/mm³. (Tabla 5) (Gráfico 5)

CD4+ Cel/UL		
INTERVALO	FRECUENCIA ABSOLUTA	FRECUENCIA RELATIVA
(39 - 200)	12	54%
(200 - 361)	4	18%
(361 - 521)	2	9%
(521 - 681)	0	0%
(681 - 841)	0	0%
(841 - 1001)	1	5%
no se realizó	3	14%
TOTAL	22	100%

Tabla 5. Niveles de CD4+ en pacientes VIH positivo con *Microsporidium spp.*

Fuente: Historia clínica del paciente

Gráfico 5. Niveles de CD4+ en pacientes VIH positivo con *Microsporidium spp.*



DISCUSIÓN

El presente estudio en cuanto a la prevalencia hallada solo puede relacionarse con datos de otros países. Por ejemplo, al comparar los resultados obtenidos en esta investigación 25%, en relación a Europa y Estados Unidos que fluctúan entre el 12% y el 50%; Alemania 36%; España 15%; Níger Bretagne 7%; Zimbabue 10%; México 31%; Brasil 27%; Colombia 3,5%; Cuba 30%; Uruguay 54%^{4, 6, 7, 8}. Senegal (África) 9,4%; Venezuela 50%^{9,10}, se puede considerar que en Ecuador la infección por *Microsporidium spp.* es moderada.

Se estudiaron 89 pacientes en edades comprendidas entre 17 y 78 años; la mayoría 70(79%) fueron hombres y 30(21%) mujeres; de cuyo total resultaron positivos para *Microsporidium spp.* hombres 14(16%) y mujeres 8(9%).

Las esporas se identificaron microscópicamente con técnicas respaldadas por la OMS/OPS. Al realizar los procesos de cada método se evidenció que por microscopía óptica, con tinción de Giemsa, no se observan con claridad las esporas. De 22 muestras positivas solo 1 se identificó, a diferencia de la Tinción Tricrómica Modificada de Ryan en las que las 22 muestras resultaron positivas.

Además se les realizó la tinción Blanco de Calcoflúor por microscopía de inmunofluorescencia para su confirmación, obteniéndose 22 muestras positivas, que se derivaron a microscopía electrónica usando el método de Filtración con Revestimiento en Oro para su visualización, reportándose en las 22 muestras que la morfología es semejante a las esporas de *Microsporidium spp.*

Para todas las tinciones se realizó un análisis multivariante con el objeto de identificar el efecto aislado de cada variable independiente sobre la frecuencia de *Microsporidium spp.* La T Student para la tinción de Giemsa es igual a -5.97 con un nivel de significación $p < 0.05$ siendo una probabilidad pequeña de identi-

ficación, por lo tanto se rechaza la hipótesis planteada, el Chi cuadrado es igual a 0,27 con un nivel de significancia $p > 0,1$ por lo que no existe evidencia para rechazarlo.

Se procesaron tres modelos de estudio: la Tinción Tricrómica de Ryan, Blanco de Calcoflúor y Tinción de Microscopía Electrónica, obteniéndose resultados idénticos T Student = 1.03 en el que $p > 0.1$ por lo tanto no existe razón para el rechazo de la Hipótesis, el Chi cuadrado = 3.91 $p < 0.05$ lo que nos indica que son variables independientes.

Finalmente culminada la investigación en el INSPI "Leopoldo Izquieta Pérez" Guayaquil-Ecuador, se identificaron 22 muestras positivas para *Microsporidium spp.* Se enviaron al Instituto Nacional de Salud de Lima-Perú 22 alícuotas de muestras positivas conservadas en formalina al 10%, siendo analizadas por 3 métodos: Directo, coloración Ziehl Neelsen modificado y coloración Gram Chromotrope, las mismas que fueron confirmadas por la Bióloga María Beltrán Fabián en el Laboratorio de Enteroparásitos, reportándose una concordancia del 100% con los casos diagnosticados en el INSPI "Leopoldo Izquieta Pérez".

Otros agentes etiológicos no formaron parte de la investigación. Sin embargo queda documentado los siguientes parásitos identificados por el Método de Observación Directo: Entamoeba coli q+, Strongyloides stercoralis, Blastocystis hominis, Isospora belli y levaduras. Con Tinción de Ziehl Neelsen Modificada se detectó *Cryptosporidium spp.* e *Isospora belli*.

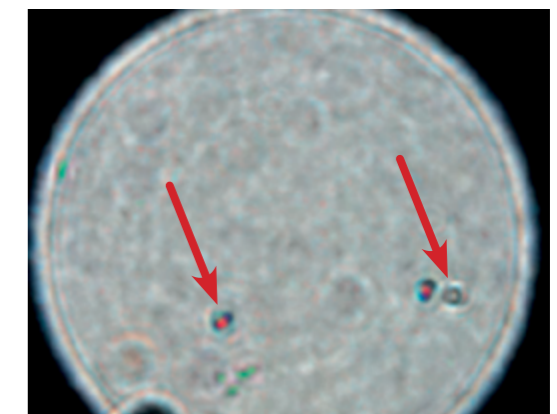
En los niveles de CD4+ de los 22 pacientes infectados, 12 (54%) presentan valores menores a 200 células/mm³, 7 (32%) evidenció valores mayores a 200 células/mm³ y 3 (14%) no se realizaron la prueba, observándose que los valores de CD4+ variaban entre 39 y 860 células/mm³. En un estudio de *Microsporidium* realizado por primera vez por Chabchoub y colaboradores en Túnez (África) en el año 2012, se puede evidenciar que los pacientes infectados con este microorganismo también presentaron un recuento de CD4+ menor a 200 células/mm³.

CONCLUSIONES

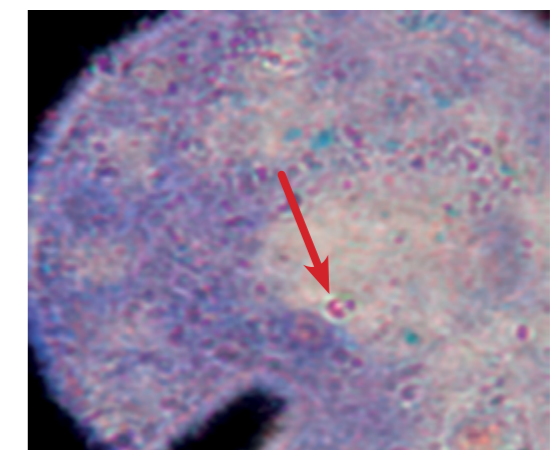
La prevalencia de *Microsporidium spp.* en pacientes VIH positivo con síndrome diarreico atendidos en el Hospital de Infectología "Dr. José Daniel Rodríguez", de la ciudad de Guayaquil es del 25% (n=22) es decir que por cada 89 pacientes 22 resultan positivos para este microorganismo. Considerando el riesgo de morbi-mortalidad de los pacientes inmunodeprimidos e in-

munocomprometidos, es importante implementar en los laboratorios del país técnicas de tinción que permitan la identificación oportuna y efectiva de *Microsporidium spp.*, para instaurar tratamiento de forma eficaz y reducción de los niveles de morbi-mortalidad por infecciones oportunistas en pacientes VIH positivos.

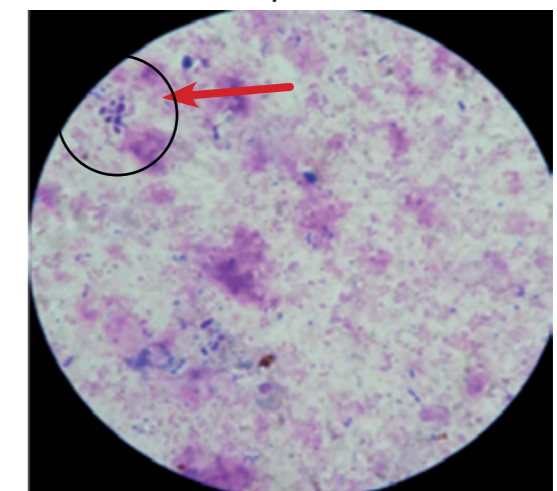
Microsporidium spp. MICROSCOPIA ÓPTICA



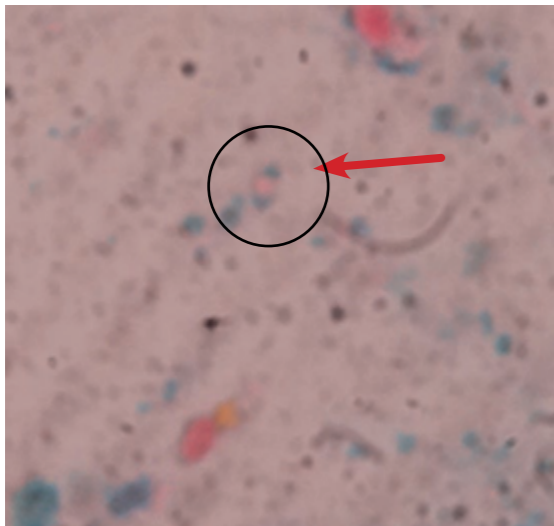
Método Directo



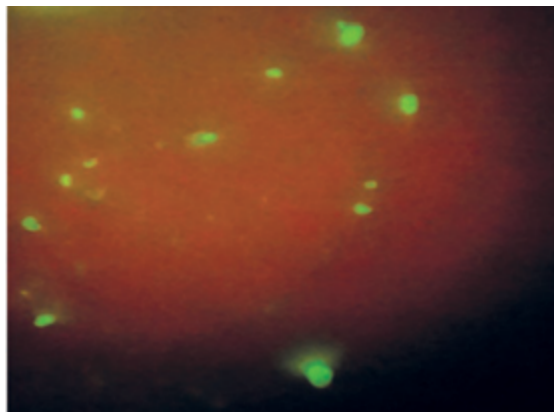
Tinción Gram Chromotrope



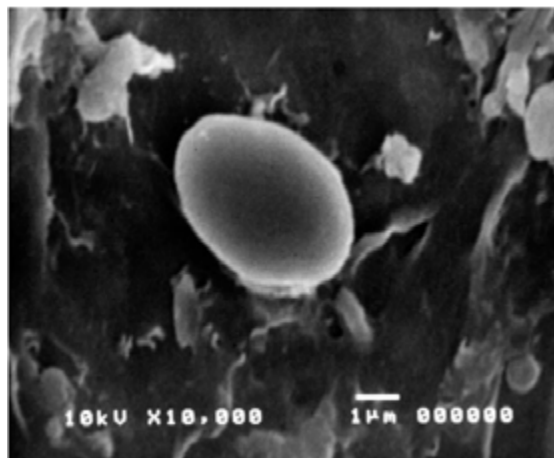
Tinción de Giemsa



Tinción Modificada de Ryan



**Microscopía por Inmunofluorescencia
Microsporidium spp.**



**Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).
Microsporidium spp.**

BIBLIOGRAFÍA

1. Temas de salud VIH-SIDA OMS [Internet] 2013 [citado 6 Mayo 2013]; [aprox. 2 p.]. Disponible en: http://www.who.int/topics/hiv_aids/es/
2. Faucib AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser, SL, Longo DL, et al. Harrison Principios de Medicina Interna. 17 ed: Mc Graw Hill; 2009.
3. Fernández N, Combol A, Zanetta E, Acuña A, Gezele E. Primer diagnóstico de microsporidiosis humana en Uruguay. Revista Médica del Uruguay. [Internet] 2003 [citado 5 Mayo 2012]; [aprox. 8 p.]. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=s0303-32952002000300009&script=sci_arttext
4. Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles comunes al Hombre y los Animales. Rev. Organización Panamericana de la Salud [Internet] 2003 [citado 19 Mayo 2012]; Disponible en: http://books.google.com.ec/books?id=_mH8um0UWwgC&printsec=frontcover&hl=esv=onepage&q&f=false
5. Winn, Allen, Janda, Koneman, Procop, Schreckenberger, Woods. Diagnóstico microbiológico 6 ed. Madrid: Panamericana; 2008.
6. Bedoya K, Montoya M. Botero J. Galvan A. Primer aislamiento de Encephalitozoon intestinalis a partir de muestra de materia fecal de un paciente colombiano con SIDA. Revista del Instituto Nacional de Salud de Colombia 2008 [Internet]. 2008 [citado 10 febrero. 2012]; Disponible en: http://www.udea.edu.co/portal/page/portal/bibliotecaSedesDependencias/unidadesAcademicas/FacultadMedicina/BibliotecaDiseno/Archivos/jornadasInvestigacion2/p-s/primer_aislamiento_de_Encephalitozoon_intestinalis_a_par.pdf
7. Capó V, Barrero M, Velázquez B, Luzardo, Martínez A, Alujas Z. Diagnóstico de coccidias y Microsporas en muestras de heces diarreicas de pacientes cubanos seropositivos al VIH: primer reporte de Microsporas en Cuba. Rev Cubana Med Trop [revista en la Internet]. 2003 Abr [citado 2013 Mar 03]; 55 (1): 14-18. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-7602003000100002&lng=es.
8. Cabrera M.J, et al. Detección de Enteroparásitos en pacientes con infección con VIH en Montevideo. UDELAR y MSP/ASSE. [internet] 2010 [citado 10 Oct. 2012]; 1 (1): [aprox. 2 p.]. Disponible en: <http://www.dcmecina.edu.uy/files/1erCInfecto2009/enteroparasitosenVIH2009.pdf>
9. Gassama A. et al. Ordinary and opportunistic enteropathogens associated with diarrhea in Senegalese adults in relation to human immunodeficiency virus serostatus. US National Library of Medicine National Institutes of Health Institut Pasteur, Dakar, Senegal. 2001; 5(4):192-8. [Internet]. [citado 03 marzo 2013]; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11953215>
10. Chacín L. Microsporidiosis: Una infección emergente y oportunista. Invest. clín [revista en la Internet]. 2006 Jun [citado 2013 Mar 03]; 47(2): 105-107. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332006000200001&lng=es.
11. Botero D, Restrepo M, Parasitosis Humana. 4 ed. Medellín: Corporación para investigaciones biológicas (CIB); 2003
12. Cecchini E, González S. Infectología y enfermedades infecciosas. Buenos Aires: Ediciones Journal; 2008.
13. Romero R. Microbiología y Parasitología Humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias 3 ed. Madrid: Panamericana; 2007.