

## Brote epidémico por *Cyclospora cayetanensis* en Medellín, Colombia

Jorge Botero-Garces<sup>1</sup>, Martha N. Montoya-Palacio<sup>2</sup>, José I. Barguil<sup>3</sup> y Amanda Castaño-González<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Médico. M. Sc Inmunología. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Grupo Interdisciplinario para el Estudio de las Parasitosis Intestinales-GIEPI, Corporación Académica para el Estudio de Patologías tropicales-CAEPT Universidad de Antioquia. E-mail: jbotero@quimbaya.udea.edu.co

<sup>2</sup>Bacterióloga y Laboratorista Clínico. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. E-mail: marthanelly54@yahoo.com

<sup>3</sup>Bacteriólogo y Laboratorista Clínico. Especialista en Microbiología de Alimentos. Consultor independiente en Sistemas de Gestión de Inocuidad de Alimentos. E-mail: continuaconsultores@epm.net.co

<sup>4</sup>Bacteriólogo y Laboratorista Clínico. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Antioquia. E-mail: amcastano@epm.net.co

Recibido 21 Marzo 2006/Enviado para Modificación 1 Julio 2006/Aceptado 27 Septiembre 2006

### RESUMEN

**Objetivo** Describir un brote epidémico de enfermedad gastrointestinal en un grupo de 56 pacientes de Medellín, Colombia.

**Metodología** En abril de 2002 se presentó un número inusitado de casos de diarrea y a partir del hallazgo de *Cyclospora cayetanensis* en uno de los pacientes, se recolectaron 56 muestras de materia fecal de igual número de individuos. Se realizó una encuesta clínico-epidemiológica, coprológico directo, concentración con formol-éter y coloración de Zielh Neelsen modificada. Además, se estudiaron por directo y Zielh Neelsen muestras de algunos alimentos para la búsqueda del parásito.

**Resultados** Del total de pacientes evaluados, 55,4 % (31/56) fueron positivos para *C. cayetanensis*, de éstos, el 77,4 % (24/31) fueron mujeres, y el 83,9 % (26/31) pertenecía a la Universidad de Antioquia, de los cuales el 88,6 % eran empleados no docentes. No se encontraron diferencias significativas entre pacientes positivos y negativos para *Cyclospora* con respecto a las manifestaciones clínicas, excepto en la deshidratación que fue mayor en los pacientes con ciclosporidiasis. Sin embargo, se encontró una diferencia significativa con relación al consumo de ensaladas y jugos, la cual fue mayor entre los pacientes positivos que los negativos.

**Conclusión** Se presentó un brote epidémico de *C. cayetanensis* en pacientes sintomáticos atendidos por el grupo GIEPI en abril de 2002.

**Palabras Clave:** Ciclosporiasis, *Cyclospora cayetanensis*, diarrea, enteritis, Brote epidémico (fuente: DeCS, BIREME).

### ABSTRACT

#### An outbreak of *Cyclospora cayetanensis* in Medellín, Colombia

**Objective** Describing an outbreak of gastrointestinal disease in a group of 56 patients from Medellín, Colombia.

**Methods** An unusual number of cases of diarrhoea appeared in April 2002 and 56 samples of stool from the same number of individuals were collected because a patient proved *Cyclospora cayetanensis* positive. A clinical-epidemiological survey, direct coprology, formol-ether concentration and modified Zielh Neelsen staining were then carried out. Some food samples were also studied for parasites by direct and modified Zielh Neelsen staining.

**Results** 55,4 % (31/56) of the patients being evaluated proved positive for *C. cayetanensis*. 77,4 % (24/31) were women and 83,9 % (26/31) belonged to the University of Antioquia, 88,6 % of whom were not teachers. There was no statistically significant difference between positive and negative patients for *Cyclospora* regarding clinical manifestations, except for dehydration which was greater in patients having cyclosporiasis. However, there was a significant difference regarding consuming salads and juice, this being greater amongst positive patients than negative ones.

**Conclusion** An outbreak of *C. cayetanensis* appeared in symptomatic patients being taken care of by the GIEPI group during April 2002.

**Key Words:** Cyclosporiasis, *Cyclospora cayetanensis*, diarrhoea, enteritis, outbreak (source: MeSH, NLM).

**C**yclospora cayetanensis es un parásito intracelular obligado, diagnosticado inicialmente entre 1977 y 1978 e informado en 1979 por Ashford en Papua, Nueva Guinea como agente etiológico de infección intestinal que se manifiesta después de un período de incubación entre 1 a 11 días (1), con un cuadro clínico de aparición súbita de diarrea acuosa, sin sangre, a menudo prolongada y grave, acompañada de anorexia, astenia, adinamia, dolor abdominal, pérdida de peso y deshidratación (2-5). *C. cayetanensis* ha sido encontrado en hospederos inmunocompetentes en brotes institucionales y comunitarios, portadores asintomáticos y en pacientes con compromiso del sistema inmune (6-10). Recientemente se ha asociado en la producción de síndromes como Guillain-Barré y artritis reactiva (síndrome de Reiter) y colecistitis acalculosa (10).

El género *Cyclospora* pertenece al phylum Apicomplexa, clase Sporozoa, subclase Coccidia. Está relacionado taxonómicamente a otros cuatro géneros de coccidias que han sido descritos como patógenos en humanos: *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Toxoplasma* y *Sarcocystis*(1). La especie *C. cayetanensis* fue sugerida por Ortega de la Universidad Peruana Cayetano de Heredia en Lima, Perú (9).

La infección por *C. cayetanensis* en el humano se inicia con la ingestión de

agua o alimentos contaminados con ooquistes esporulados. Una vez en el yeyuno son liberados los esporozoitos que penetran el enterocito, ocasionando la división asexual, responsable de los daños titulares y la sintomatología, además ocurre la reproducción sexuada dando lugar a ooquistes no esporulados que son excretados en la materia fecal al medio ambiente, necesario para el proceso de maduración y esporulación de éstos (11), por lo tanto, se sugiere que la transmisión persona a persona es poco probable, siendo el agua y los alimentos las fuentes más frecuentes de infección (12).

Aunque otras especies de *Cyclospora* han sido encontradas en monos, roedores, reptiles e insectos, los ooquistes de estas especies son ovoides, de mayor tamaño que las identificadas en humanos y no se ha podido demostrar el potencial zoonótico de esta parasitosis (3,13).

El diagnóstico de ciclosporiasis se basa en la búsqueda directa de ooquistes en muestras de materia fecal por medio de examen directo, concentración con formol éter, coloración de Ziellh Neelsen modificada y autofluorescencia empleando filtros dicromáticos de 365 nm y 450 a 490 nm, para observar la fluorescencia azul o verde, respectivamente (9,12).

Aunque no existe un estudio de prevalencia de ciclosporiasis en el mundo, en Perú ha sido informada en el 18 % de los niños menores de dos años, Nepal 3 al 7 % en población general y en Haití 11 % de los pacientes VIH positivos (12-15). Además, se han documentado casos en Alemania, Brasil, Cuba, Venezuela, Estados Unidos, Canadá e Indonesia, entre otros; (5,16-23). Asociados a fuentes de infección como abastecimientos de agua, frambuesas, frutas, verduras y moluscos (22). Es importante señalar que tanto en estos brotes epidémicos como en la mayoría de series clínicas reportadas la aparición de los casos de ciclosporiasis coincide con la época de mayor pluviosidad, entre los meses de abril y mayo (5,20).

Hasta la fecha en Colombia solo se han informado casos aislados y no se conocen estudios sistemáticos con relación a brotes epidémicos causados por este parásito (6,24). Por consiguiente, ante la presencia de diarrea tipo secretor en un grupo de personas de la Universidad de Antioquia, se quiso examinar la etiología de este proceso diarreico a partir de un caso índice y presentar los resultados de este brote epidémico en un grupo de 56 pacientes con enfermedad gastrointestinal, cuya presentación clínica más importante fue astenia, adinamia y diarrea acuosa prolongada, con deshidratación y dolor abdominal, ocurrido en la ciudad de Medellín-Colombia, entre abril y mayo de 2002.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Estudio del brote epidemiológico

Caso índice: En la semana del 15 al 20 de abril de 2002 se presentó un número inusitado de casos de diarrea en su mayoría empleados de la Universidad de Antioquia, los cuales tenían en común almorzar en el restaurante contratista de la institución, por consiguiente teniendo en cuenta sus manifestaciones clínicas y antecedentes epidemiológicos se procedió a realizar el estudio parasitológico de materia fecal, encontrándose la presencia de ooquistes de *C. cayetanensis* en algunos de los pacientes. Inmediatamente fueron informados estos hallazgos a la IPS Universitaria, al restaurante contratista y a Empresas Públicas de Medellín-EPM, además, se hizo difusión del problema por medio de comunicación radial con lo cual se logró captar nuevos casos.

Debido a la época del año, el incremento de pacientes con diarrea y el hallazgo de casos de *C. cayetanensis* se procedió a la búsqueda activa de sujetos con manifestaciones clínicas relacionadas con el sistema digestivo.

### Tipo y población de estudio

Estudio descriptivo en el cual se capturaron todos los pacientes con síntomas asociados al tracto gastrointestinal, remitidos por la IPS universitaria (Universidad de Antioquia) o por búsqueda activa de casos, en el cual no se tuvo en cuenta ningún criterio de exclusión. Los pacientes fueron estudiados en el laboratorio del Grupo Interdisciplinario para el Estudio de las Parasitosis Intestinales-GIEPI, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Corporación Académica para el Estudio de Patologías Tropicales-CAEPT, Universidad de Antioquia; durante abril 22 y mayo 7 de 2002.

Aunque este estudio no presentaba ningún riesgo para el paciente, a cada uno se les sometió a consideración el consentimiento informado para su firma, en el cual se le daba a conocer en términos entendibles, los fines, la pertinencia y la naturaleza del estudio, acogiéndose a las normas acerca de aspectos éticos de investigación en humanos de la resolución 8430 del Ministerio de Salud.

### Métodos diagnósticos

En total se evaluaron 56 casos de individuos sintomáticos, además 3 de 6 manipuladores de alimentos del restaurante. A todas las personas estudiadas se les realizó una encuesta clínico-epidemiológica que incluía datos acerca de la edad, género, historia de viajes, alimentos y bebidas consumidos, evaluación médica, inicio y duración de los síntomas, además coprológico directo, por

concentración con formol-éter (25) y coloración de Zielh Neelsen modificada (26). En las muestras de materia fecal los ooquistes fueron identificados de acuerdo a sus características morfológicas y de tamaño, según Ortega (9); los criterios usados para la identificación de *C. cayetanensis* fueron la presencia de ooquistes redondeados no esporulados de 8 a 10 mm de diámetro y grados variables de tinción, de rojo intenso a rosado, los cuales eran sometidos a esporulación *in vitro* con dicromato de potasio al 2,5 % en cajas de Petri a temperatura ambiente.

Del restaurante contratista se obtuvo muestras de mora, lechuga y ensalada procesada, las cuales se procesaron por según la técnica de lavado de Speck, (27), con algunas modificaciones. De cada una de ellas se tomaron 200gr que fueron sometidas por separado a lavados en recipientes de plástico que contenían 400 ml de solución salina, NaCl (Merck, código 3624-19) al 0,85 %. Luego fue recolectada esta solución de lavado; la mitad se pasó a través de papel de filtro Kendall<sup>MR</sup> de 6,5 pulgadas (Kendall Laboratory Products, código 8885117990), para remover los residuos de gran tamaño, seguido de filtración con papel filtro 0,45 mm, al cual se agregó 5 ml de solución salina para la búsqueda del parásito; la otra mitad se centrifugó a 900g durante 30 minutos. Tanto al líquido filtrado como al sedimento se le hicieron placas en solución salina y Lugol para la evaluación de huevos de helmintos como también quistes de protozoos y coloración de Zielh Neelsen modificada. Además, se tomó una alícuota (20ml) para la determinación de coliformes fecales y *Escherichia coli*, siguiendo la técnica del número más probable (NMP) recomendada por Speck.

La identificación de *Giardia intestinalis*, se realizó mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína (Biovis Laboratories Lote 901) y el diagnóstico de *Cryptosporidium spp.*, se efectuó por medio de la tinción de Koster modificada (28).

#### Análisis estadístico

Los datos se tabularon en el programa Excel y el análisis estadístico se realizó en Epi-Info 6.0 en tablas 2x2, calculando el chi-cuadrado y el valor p. Se analizaron variables demográficas (Edad, género, ocupación, procedencia, nivel socioeconómico y condiciones higiénico-sanitarias), clínicas y de laboratorio, para las cuales se calcularon frecuencias y proporciones. Además, se realizó análisis de asociación de variables, de factores de riesgo y manifestaciones clínicas de los pacientes. Se consideró asociación un valor  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

En total se evaluaron 56 pacientes, mujeres 73,2 % (41/56), hombres 26,8 % (15/56) en edades comprendidas entre 2,5 a 75 años, sin embargo, el mayor número de pacientes estuvo en el rango de edad entre 31 y 45 años (53,6 %), Tabla 1. El 85,7 % (48/56) de los pacientes evaluados pertenecían a la Universidad de Antioquia, empleados 80,4 % (45/56), estudiantes 5, 3% (3/56), además se estudiaron 8 pacientes (14,3 %) que no pertenecían a esta institución.

Del total de pacientes evaluados 55,4 % (31/56) fueron positivos para *C. cayetanensis*, mientras que en el 44,6 % (25/56) no se observó este parásito (tabla1), de los positivos para *C. cayetanensis* el 77,4 % (24/31) fueron mujeres, el 22,6 % restante, hombres. El 83,9 % (26/31) pertenecieron a la Universidad de Antioquia, de éstos el 88,6 % (23/26) eran empleados, los 3 restantes fueron un docente, un estudiante y un jubilado. Por otro lado, en este grupo de pacientes se encontraron otros parásitos intestinales con una frecuencia global del 26,8 % (15/56); del complejo *Entamoeba histolytica/dispar* dos casos en el grupo de pacientes positivos para *C. cayetanensis* y cinco en el de los pacientes negativos para este parásito. *Ascaris lumbricoides* en un paciente del grupo de positivos y tres en el de los negativos, además dos casos de parásitos intestinales no patógenos tanto en el grupo positivo para *C. cayetanensis* como en el negativo. Es de resaltar que no se encontró el parásito en ninguno de los tres manipuladores de alimentos evaluados.

**Tabla 1.** Distribución porcentual de los casos de ciclosporiasis según rango de edad y sexo

Edad Años	Mujeres		Hombres		Total (%)
	Positivos (%)	Negativos (%)	Positivos (%)	Negativos (%)	
0-14	1(1,8)	1(1,8)	0	0	2 (3,6)
15-30	4(7,1)	1(1,8)	2(3,6)	2 (3,57)	9 (16,1)
31-45	14(25)	9(16,1)	2(3,6)	5(8,9)	30 (49,2)
> 46	5(8,9)	6(10,7)	3(5,4)	1(1,8)	15 (26,8)
Total	24	17	7	8	56

Las manifestaciones clínicas de la población evaluada se describen en la Tabla 2. Es de resaltar que no hubo diferencias significativas entre las personas en las cuales se observó *C. cayetanensis* con las que fueron negativas para el parásito, a excepción de la deshidratación que fue mayor en los pacientes con ciclosporiasis. El tipo de diarrea que predominó en el grupo de pacientes positivos para *C. cayetanensis* fue la diarrea acuosa con un 93,5 % (29/31), el 80,6 % de éstos presentaron mas de 7 deposiciones por día. Mientras que solo el 52 % (13/

25) del grupo de pacientes negativos para esta parasitosis estuvo por encima de este número de deposiciones ( $p=0,02$ ).

Al evaluar los alimentos consumidos por las personas involucradas durante este brote se encontró que hubo un mayor consumo de jugos y ensaladas entre los pacientes positivos a *C. cayetanensis* que en los negativos, lo cual fue estadísticamente significativo,  $p=0,01$  y  $0,03$ , respectivamente (Tabla 3). Con respecto a los demás alimentos consumidos no se encontró ninguna diferencia. Sin embargo, en el análisis parasitológico de los alimentos evaluados no se observó la forma parasitaria con ooquistes de *Cyclospora*, ni ningún otro parásito.

**Tabla 2.** Manifestaciones clínicas de pacientes con y sin ciclosporiasis

Manifestaciones Clínicas	Con ciclosporiasis		Sin ciclosporiasis		Valor p
	No.	%	No.	%	
Deshidratación	30	97	19	76	0,02
Anorexia	11	35,5	15	60	0,06
Diarrea	31	100	23	92	0,19
Astenia, adinamia	25	80,6	17	68	0,28
Dolor abdominal	26	83,9	23	92	0,36
Flatulencia	15	48,4	15	60	0,39
Fiebre	17	54,8	11	44	0,42
Cefalea	14	45,2	9	36	0,49
Vómito	15	48,4	11	44	0,74
Otros	11	35	8	32	0,78

**Tabla 3.** Tipo de alimento consumido por pacientes con y sin ciclosporiasis

Alimento	Con ciclosporiasis		Sin ciclosporiasis		Valor p
	No.	%	No.	%	
Jugo	26	83,9	13	52	0,01
Ensalada	28	90,3	17	68	0,03
Leche	9	29	12	48	0,14
Carne	17	54,8	10	40	0,27
Fríjoles	11	35,5	7	28	0,55
Mondongo	10	32,3	8	32	0,90
Otros	7	22,6	7	28	0,60

Con relación al sitio en donde almorzaban los pacientes se observó que la mayor proporción de casos positivos para *C. cayetanensis* consumieron el almuerzo en el restaurante contratista, 24/42, mientras que solo 4/8 en otro restaurante, 3/5 en la casa y ninguno en la cafetería universitaria de un paciente evaluado. Por otro lado, la época en la que se presentaron los casos estudiados de ciclosporiasis fue desde el 1° de abril hasta el 7 de mayo de 2002, con la aparición de un pico máximo de casos entre el 15 y 21 de abril con un total de 46 pacientes, no obstante, entre el 1° y el 14 de abril hubo 7 casos y del 22 de abril al 7 de mayo solo 3.

## DISCUSIÓN

Desde la descripción de los primeros casos de ciclosporiasis realizada por Ashford en 1979 (1), se ha implicado a esta parasitosis en diversos brotes epidémicos tanto en individuos inmunocompetentes como en inmunocomprometidos, los cuales han sido de origen hídrico o por una gran variedad de alimentos, principalmente los vegetales (1,2,6,7,29-32). Hasta la fecha los humanos son los únicos implicados en la eliminación de ooquistes en materia fecal, ya que no se han informado reservorios animales ni el origen zoonótico de esta infección (4,9,12,32), sin embargo, los ooquistes no son infectantes y requieren del medio ambiente para su esporulación (4,5,7,9,20,22). Se conoce poco acerca de las condiciones medioambientales que favorecen o retrasan la esporulación de los ooquistes y el tiempo que permanecen viables bajo condiciones externas, además, hasta la fecha solo se ha podido implicar el agua y los alimentos como las fuentes más importantes de infección, pero no la transmisión directa persona a persona.

El brote epidémico informado en este estudio se presentó durante los meses lluviosos de abril y mayo de 2002, con una precipitación total de 42 mm, mientras que el promedio anual fue de 15 mm (33), lo cual esta de acuerdo con la marcada estacionalidad en la presentación de los episodios de ciclosporiasis, aunque en algunos países se presenta el mayor número de casos en épocas secas, sin embargo, en la mayoría es mas frecuente en los periodos lluviosos, lo cual puede ser explicado por los rangos de temperatura, humedad y otros factores medioambientales que permiten la esporulación y sobrevivencia de los ooquistes, tal como ha sido informado por Soave (10) y Colomina-Rodríguez (34).

La mayoría de los pacientes estudiados en este brote fueron atendidos inicialmente por la IPS Univerdidad de Antioquia, los cuales se manejaron como una intoxicación alimentaria. Al hacer el estudio microbiológico de los alimentos consumidos por estos pacientes se informó que eran aptos para el consumo humano (según informe de SEILAM Ltda, 19-IV-2002). De otro lado, no se pudo determinar la tasa de ataque entre los expuestos a la ingestión de ooquistes de *C. cayetanensis*, debido a que no fue posible acceder a la totalidad de las personas usuarias del restaurante.

En este trabajo no se demostró la presencia del parásito en los alimentos crudos evaluados por la técnica descrita en materiales y métodos, sin embargo, los resultados muestran que el consumo de jugos y ensaladas parecen ser los factores de riesgo más implicados como fuente de infección de este parásito.



Esto pudo deberse a que la búsqueda de *C. cayetanensis* en muestras diferentes a materia fecal como vegetales y hierbas crudas demuestran una recuperación de ooquistes muy baja, entre el 12 y el 14 %. A la fecha se vienen implementando metodologías moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real (23,35,36), que es capaz de detectar la mitad del DNA de un quiste por gramo de muestra (8,36,37).

Debido a que el parásito no fue encontrado en ninguno de los manipuladores de alimentos evaluados, a la fuerte asociación encontrada en el consumo de ensalada y jugos por parte del grupo de pacientes positivos para *C. cayetanensis* y que la ensalada suministrada por el restaurante contratista y las frutas para la preparación de los jugos, habían sido sometidas a concentraciones de cloro de 50 ppm, la cual es insuficiente para eliminar los ooquistes de *C. cayetanensis* que se conocen son resistentes a concentraciones de cloro por debajo de 200 ppm (4,5,10,20,), podemos concluir que estos dos tipos de alimentos fueron la fuente de infección más probable de este brote epidémico de enteritis por *C. cayetanensis*. Sin embargo, no se pudo implicar con exactitud la fuente por la ausencia del parásito en las muestras de alimentos evaluadas.

No obstante lo anterior, se realizaron diferentes actividades educativas para el control en el manejo de los procesos en la preparación de alimentos tanto en los manipuladores de alimentos de los restaurantes como de los pacientes evaluados en el estudio. ♦

**Agradecimientos.** A la IPS Universidad de Antioquia por la evaluación y remisión de los pacientes, al Laboratorio de Aguas de Empresas Públicas de Medellín-EPM y a la profesora Yolanda López, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Antioquia por la realización del análisis estadístico.

#### REFERENCIAS

1. Ashford RW. Occurrence of an undescribed coccidian in man in Papua New Guinea. *Ann Trop Med Parasitol* 1979;73(5):497-500.
2. Abel B, Reshef R, Lejbkowitz F. Cyclospora cayetanensis: a Case Report. *Clin Microbiol Newsletter* 2004;26:23.
3. Cegielski JP, Ortega YR, McKee S, Madden JF, Gaido L, Schwartz DA, et al. Cryptosporidium, enterocytozoon, and cyclospora infections in pediatric and adult patients with diarrhea in Tanzania. *Clin Infect Dis* 1999;28(2):314-21.
4. Guerrant RL, Steiner TS. Cyclospora. In: Pearson SGaD, editor. *Principles and Practice of Clinical Parasitology*. New York: John Wiley & Sons Ltd.; 2001. pp. 165-170.

5. Herwaldt BL. *Cyclospora cayetanensis*: a review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990s. *Clin Infect Dis* 2000;31(4):1040-57.
6. Agudelo P, Restrepo M, Galvis MT, Botero D. Infección por *Cyclospora* sp. en tres pacientes inmunocompetentes. *Biomédica* 2000;20:25-32.
7. Logar J, Poljsak-Prijatelj M, Andlovic A. *Cyclospora cayetanensis*, potential cause of diarrhoea. *J Infect* 1997;34(3):284-5.
8. Shields JM, Olson BH. *Cyclospora cayetanensis*: a review of an emerging parasitic coccidian. *Int J Parasitol* 2003;33(4):371-91.
9. Ortega YR, Sterling CR, Gilman RH, Cama VA, Diaz F. *Cyclospora* species—a new protozoan pathogen of humans. *N Engl J Med* 1993;328(18):1308-12.
10. Soave R. *Cyclospora*: an overview. *Clin Infect Dis* 1996;23(3):429-35.
11. Smith HV, Paton CA, Mitambo MM, Girdwood RW. Sporulation of *Cyclospora* sp. oocysts. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(4):1631-2.
12. Bern C, Ortega Y, Checkley W, Roberts JM, Lescano AG, Cabrera L, et al. Epidemiologic differences between cyclosporiasis and cryptosporidiosis in Peruvian children. *Emerg Infect Dis* 2002;8(6):581-5.
13. Sherchand JB, Cross JH. Emerging pathogen *Cyclospora cayetanensis* infection in Nepal. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32 Suppl 2:143-50.
14. López AS, Bendik JM, Alliance JY, Roberts JM, da Silva AJ, Moura IN, et al. Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis* and other intestinal parasites in a community in Haiti. *J Clin Microbiol* 2003;41(5):2047-54.
15. Eberhard ML, Nace EK, Freeman AR, Streit TG, da Silva AJ, Lammie PJ. *Cyclospora cayetanensis* infections in Haiti: a common occurrence in the absence of watery diarrhea. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60(4):584-6.
16. Doller PC, Dietrich K, Filipp N, Brockmann S, Dreweck C, Vonthein R, et al. Cyclosporiasis outbreak in Germany associated with the consumption of salad. *Emerg Infect Dis* 2002; 8(9):992-4.
17. Nunez FA, Gonzalez OM, Gonzalez I, Escobedo AA, Cordovi RA. Intestinal coccidia in Cuban pediatric patients with diarrhea. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98(4):539-42.
18. Chacin-Bonilla L, Mejia de Young M, Estevez J. Prevalence and pathogenic role of *Cyclospora cayetanensis* in a Venezuelan community. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68(3):304-6.
19. Blans MC. Cyclosporiasis outbreak, indonesia. *Emerg Infect Dis* 2005;11(9):1453-5.
20. Heilpern KL, Wald M. Update on emerging infections: news from the Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of cyclosporiasis associated with snow peas—Pennsylvania, 2004. *Ann Emerg Med* 2005;45(5):529-31.
21. Hoang LM, Fyfe M, Ong C, Harb J, Champagne S, Dixon B, et al. Outbreak of cyclosporiasis in British Columbia associated with imported Thai basil. *Epidemiol Infect* 2005;133(1):23-7.

22. Mansfield LS, Gajadhar AA. *Cyclospora cayetanensis*, a food- and waterborne coccidian parasite. *Vet Parasitol* 2004;126(1-2):73-90.
23. Verweij JJ, Laeijendecker D, Brienen EA, van Lieshout L, Polderman AM. Detection of *Cyclospora cayetanensis* in travellers returning from the tropics and subtropics using microscopy and real-time PCR. *Int J Med Microbiol* 2003;293(2-3):199-202.
24. Villegas S, Arango A. *Cyclospora cayetanensis*. *Acta Médica Colombiana* 2000;25:84-86.
25. Allen AV, Ridley DS. Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. *J Clin Pathol* 1970;23(6):545-6.
26. Clarke SC, McIntyre M. Modified detergent Ziehl-Neelsen technique for the staining of *Cyclospora cayetanensis*. *J Clin Pathol* 1996;49(6):511-2.
27. Speck ML. *Compendium of Methods For Microbiological Examination of Foods*. Washington D.C.: American Public Health Association; 1984.
28. Kageruka P, Brandt JR, Taelman H, Jonas C. Modified Koster staining method for the diagnosis of cryptosporidiosis. *Ann Soc Belg Med Trop* 1984;64(2):171-5.
29. Gumbo T, Sarbah S, Gangaidzo IT, Ortega Y, Sterling CR, Carville A, et al. Intestinal parasites in patients with diarrhea and human immunodeficiency virus infection in Zimbabwe. *Aids* 1999;13(7):819-21.
30. Hoge CW, Echeverria P, Rajah R, Jacobs J, Malthouse S, Chapman E, et al. Prevalence of *Cyclospora* species and other enteric pathogens among children less than 5 years of age in Nepal. *J Clin Microbiol* 1995;33(11):3058-60.
31. Ochoa TJ, Salazar-Lindo E, Cleary TG. Management of children with infection-associated persistent diarrhea. *Semin Pediatr Infect Dis* 2004;15(4):229-36.
32. Dixon BR, Bussey JM, Parrington LJ, Parenteau M. Detection of *Cyclospora cayetanensis* oocysts in human fecal specimens by flow cytometry. *J Clin Microbiol* 2005;43(5):2375-9.
33. Empresas Públicas de Medellín 2002 [Internet]. Días de precipitación por mes registrados en el Edificio Miguel de Aguinaga del Municipio de Medellín. 1988-2002. Disponible en <http://www.medellin.gov.co/alcaldia/jsp/modulos/anuarioEstadistico/obj/html/2-4.html>. Consultado en Marzo de 2006.
34. Colomina-Rodríguez J, Villar-Serrano J. Características morfológicas, clínicas y terapéuticas de *cyclospora cayetanensis*. *Bol Chil Parasitol* 1997;52:26-32.
35. Varma M, Hester JD, Schaefer FW, 3rd, Ware MW, Lindquist HD. Detection of *Cyclospora cayetanensis* using a quantitative real-time PCR assay. *J Microbiol Methods* 2003;53(1):27-36.
36. Orlandi PA, Carter L, Brinker AM, da Silva AJ, Chu DM, Lampel KA, et al. Targeting single-nucleotide polymorphisms in the 18S rRNA gene to differentiate *Cyclospora* species from *Eimeria* species by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(8):4806-13.
37. Steele M, Unger S, Odumeru J. Sensitivity of PCR detection of *Cyclospora cayetanensis* in raspberries, basil, and mesclun lettuce. *J Microbiol Methods* 2003;54(2):277-80.