

***Cryptosporidium*: diagnóstico y prevalencia en niños sanos del estado Carabobo, Venezuela**

Emilia Barrios, Víctor Delgado, Wolfan Araque, María Chiang, Linmar Martínez, Giomar Materán, Yelitza López, Judith Peralta.

Laboratoriode Parásitos Intestinales (Centro-BioMoIP), Grupo de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Carabobo (UCGEI), Facultad de Ciencias de la Salud. Valencia.

Financiado por CDCH-99014; 458-02 y FONACIT-2000001901

Correspondencia: Víctor Delgado
Email: delgadov@uc.edu.ve
Telefax: 58-241-8673342

Recibido: febrero 2004

Aceptado: junio 2004

RESUMEN

Se estudió la prevalencia de *Cryptosporidium* en 260 muestras fecales de niños aparentemente sanos (1-10 años) en Valencia, estado Carabobo, Venezuela. En 128 muestras formadas-frescas se investigaron protozoarios intestinales por análisis microscópico al fresco y ooquistes en extendidos teñidos con Kinyoun, y en 132 muestras preservadas en formalina al 10% se investigó *Cryptosporidium*. Las muestras formadas (n=100) fueron concentradas en formalina-acetato de etilo y coloreadas. Las muestras líquidas (n=32) sólo fueron coloreadas. Antígenos fecales de ooquistes fueron determinados por ELISA (World Diagnostic). La prevalencia de *Cryptosporidium*, según la muestra, fue de 0,8% en formadas-frescas, 8% en formadas-preservadas y 12,5% en líquidas-preservadas. Otros protozoarios fueron identificados en heces formadas-frescas, *Blastocystis hominis* (23,4%), *Giardia lamblia* (14,1%), *Endolimax nana* (10,9%) y *Entamoeba coli* (3,1%). La captura de antígenos fecales mostró, respecto al coprodiagnóstico, 93,3% de especificidad y 66,7% de sensibilidad en 32 muestras líquidas, y 89,3% de especificidad y 53,3% de sensibilidad en 58 heces formadas. Los resultados muestran por primera vez una prevalencia de criptosporidiosis importante en la población infantil del estado Carabobo, de clase socio-económica baja, presentando o no diarrea. Se corrobora que la forma clásica de análisis de heces es ineficiente para detectar *Cryptosporidium*. Se demuestra poca confiabilidad diagnóstica del método de captura de antígenos fecales. Se recomienda el uso rutinario de concentración y

coloración de heces en el diagnóstico de laboratorio por ser el más económico y simple.

Palabras clave: *Cryptosporidium*, criptosporidiosis, prevalencia en niños

ABSTRACT

***Cryptosporidium*: Diagnosis and Prevalence in Healthy Children from Carabobo State, Venezuela**

Prevalence of *Cryptosporidium* was studied in 260 stool samples of healthy children (1 to 10 years) from Valencia City, Carabobo State, Venezuela. In 128 formed fresh fecal samples, intestinal protozoa were examined microscopically using wet preparations; oocyst identification was carried out using Kinyoun stained smears. *Cryptosporidium* was studied in 132 samples preserved in 10% formalin. Formed samples (n =100) were concentrated with formalin-ethyl acetate and stained by Kinyoun. In liquid samples (n=32), only non concentrated smears were stained. Coproantigens were determined by ELISA (World Diagnostic). *Cryptosporidium* infections were detected in 0.8% of formed fresh samples, 8% in formed preserved and 12.5% in liquid preserved ones. Other parasites were observed in formed fresh samples, *Blastocystis hominis* (23.4%), *Giardia lamblia* (14.1%), *Endolimax nana* (10.9%) and *Entamoeba coli* (3.1%). The coprocapture method had 93.3% specificity and 66.7% sensitivity in 32 liquid samples, and 89.3% specificity and 53.39% sensitivity in 58 formed samples with respect to coprodiagnostic. Results show for the first time a significant prevalence of cryptosporidiosis, with or without diarrhea, in the pediatric population from the low socio economic class Valencia City. It is confirmed that the conventional diagnostic method of stool analysis is less sensitive for *Cryptosporidium*. The coprocapture method has a low reliability. Laboratory diagnosis by routine use of fecal concentration and smear staining is recommended as being the most economical and simple.

Key words: *Cryptosporidium*, cryptosporidiosis, prevalence in children

INTRODUCCION

Cryptosporidium sp. es un coccidio emergente que puede inducir diarrea aguda autolimitante en pacientes inmunocompetentes o severa en pacientes con la forma avanzada del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (1). La prevalencia de 1 a 32% reportada en niños es

dependiente de factores intrínsecos del paciente, socio-económicos y medioambientales (2), aunque en la población los focos de infección no son detectados oportunamente. En Venezuela la información epidemiológica es escasa, pero sugestiva de un problema de salud pública importante (3-5). El diagnóstico de laboratorio se basa en la detección de los ooquistes de *Cryptosporidium* en las heces frescas o preservadas, mediante métodos de concentración y coloración, e Inmunológicamente, determinando anticuerpos circulantes (6) o captura de antígenos parasitarios en heces (7). Las técnicas inmunológicas existen como estuches comerciales (8), que pueden ser útiles en estudios poblacionales, pero son importados, costosos y no siempre producen resultados comparables al análisis microscópico de la heces (9, 10). En este trabajo se reportan los resultados de un estudio para diagnosticar *Cryptosporidium* en niños del estado Carabobo.

MATERIALES Y METODOS

Población y Procesamiento de muestras. Un total de 260 muestras fecales fueron obtenidas de niños aparentemente sanos menores de 10 años de edad de la ciudad de Valencia, estado Carabobo. Las muestras fueron suministradas de manera voluntaria por los padres y divididas en dos grupos. El grupo A (n=128) correspondió a muestras frescas no preservadas para determinar protozoarios intestinales y el grupo B (n=132) fueron muestras líquidas o formadas preservadas en 10% formalina (1:3) para investigar la presencia de *Cryptosporidium* en relación con la consistencia de las heces y la detección de antígenos fecales, mediante ELISA (World Diagnostic). Las heces frescas se emulsificaron y examinaron con solución salina, lugol y tinción de Kinyoun de extendidos observados a 1000x (confirmación de ooquistes), las heces líquidas preservadas (grupo B) se evaluaron en extendidos teñidos, mientras que las heces formadas fueron concentradas en formalina acetato de etilo (11). La sensibilidad y especificidad del kit comercial de ELISA fue determinada (12).

RESULTADOS

La Tabla 1 resume la frecuencia de protozoarios intestinales en 128 niños provenientes del grupo A, de los cuales 67 niños (52,3%) se encontraron infectados con, al menos, una protozoosis intestinal. De ellos 25 (19,6%) niños se ubicaron en el grupo de edad de 0-4 años, y 42 (32,8%) entre 5-10 años.

Tabla 1. Frecuencia de protozoarios intestinales en heces frescas formadas de 128 niños del estado Carabobo.

Parásito	Grupos etarios (años)					
	0-4		5-10		Total	
	f	%	f	%	f	%
<i>Blastocystis hominis</i>	13	10,2	17	13,3	30	23,4
<i>Giardia lamblia</i>	4	3,1	14	10,9	18	14,1
<i>Endolimax nana</i>	7	5,5	7	5,5	14	10,9
<i>Entamoeba coli</i>	-	-	4	3,1	4	3,1
<i>Cryptosporidium parvum</i> *	1	0,8	-	-	1	0,8
Total	25	19,6	42	32,8	67	52,3

* *Heces teñidas con Kinyoun sin concentración.*

Se detectó infección por *Cryptosporidium* en un niño menor de 4 años (0,8%). *Blastocystis hominis* fue encontrado en 13 (10,2%) en el grupo de 0-4 años, y 17 (13,3%) entre 5-10 años. *Giardia lamblia* estuvo presente en 14,1%, *Endolimax nana* 10,9%, y *Entamoeba coli* 3,1% de los niños. La prevalencia de protozoarios intestinales en el grupo de 5-10 años fue mayor. Las 132 muestras fecales (grupo B) preservadas para la búsqueda de *Cryptosporidium* mostraron una frecuencia de 9,1% (12 niños), de las cuales fueron positivas 12,5% de las heces líquidas y 8% de las formadas (Tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de *Cryptosporidium* en heces preservadas de 132 niños del estado Carabobo.

Consistencia de las heces	n	positivo	
		f	%
Líquida*	32	4	12,5
Formada**	100	8	8,0
Total	132	12	9,1

* *Heces teñidas con Kinyoun sin concentración*

** *Heces concentradas y teñidas*

La Tabla 3 muestra la comparación del diagnóstico microscópico de ooquistes de *Cryptosporidium* (concentración y coloración) con la coprocaptura de antígenos en 90 muestras fecales. Se observó que de 12 positivas microscópicamente, 3 fueron confirmadas por coproantígenos y de 78 muestras negativas microscópicamente 8 fueron positivas a la coprocaptura. La coprocaptura en heces líquidas dio una especificidad de 93,3% y en heces formadas 89,3%; la sensibilidad fue 66,7% en heces líquidas y 53,3% en heces formadas. La especificidad media fue de 90,7% y la sensibilidad de 57,1%.

Tabla 3. Comparación diagnóstica de ELISA (coproantígenos) con la observación microscópica de *Cryptosporidium* en 90 muestras de heces según la consistencia

ELISA	Estudio microscópico de las heces (Kinyoun)					
	Líquida		Formada		Total	
	+	-	+	-	+	-
Positivo	2	2	1	6	3	8
Negativo	2	26	7	44	9	70
Total	4	28	8	50	12	78
Especificidad	93,3		89,3		90,7	
Sensibilidad	66,7		53,3		57,1	

DISCUSION

Cryptosporidium es un parásito emergente responsable de diarrea aguda, especialmente en comunidades de bajos recursos de países no desarrollados, donde los factores de riesgos se asocian a contaminación del medioambiente (agua y alimentos). En pacientes inmunosuprimidos la infección cursa con clínica más severa, difícil de tratar y mayor morbilidad y mortalidad (1)

El coprodiagnóstico en heces frescas de niños menores a 10 años sin diarrea mostró una prevalencia de 52,3% de protozoarios intestinales (Tabla 1). *Blastocystis hominis* fue el parásito más prevalente (23,4%) independientemente de la edad de los niños, seguido por *Giardia lamblia* con 14,1%, que fue más frecuente en niños mayores de 4 años, *Endolimax nana* con 10,9% y *Cryptosporidium*, en extendidos teñidos fue observado en un niño (0,8%).

En las muestras preservadas formadas o líquidas, la prevalencia en heces formadas fue 10 veces superior que en muestras frescas (0,8 vs 8%). Similares resultados fueron reportados en niños (2). Las diferencias en prevalencia en muestras frescas (grupo A) y preservadas (grupo B) parece ser debido al proceso de concentración previa a la coloración de Kinyoun, corroborando que la infección por *Cryptosporidium* puede cursar con baja eliminación de ooquistes, y confirman las observaciones que señalan la baja sensibilidad de los métodos rutinarios de coprodiagnóstico en la detección de ooquistes (13). Nuestros resultados muestran que alrededor de 8% de la muestra pediátrica evaluada está infectada con *Cryptosporidium*, sin presentar diarrea.

En heces líquidas preservadas, la prevalencia de *Cryptosporidium* fue de 12,5%, en cuyo caso las muestras no fueron sometidas a concentración previa a la coloración. Los resultados permiten especular que más del 10% de los niños con diarrea puede corresponder a una criptosporidiosis aguda. Estos casos que, evidentemente, no son diagnosticados y tratados y, por lo que se desconoce la prevalencia real e importancia médica. Además, confirman las tendencias generales reportadas en países no desarrollados, y las cifras registradas (10%) en dos estudios en el estado Zulia (4, 5), sugiriendo estrecha relación entre prevalencia y mecanismo de transmisión fecal/oral. Desde el punto de vista inmunológico, la presencia de criptosporidiosis es inversamente proporcional al recuento de células CD4+ (< 200/mL) (14) Sería interesante conocer la condición inmunológica de los niños infectados así como la importancia de las reinfecciones (suministro de agua potable, convivencia con el ciclo zoonótico de animales domésticos) o estado de desnutrición (15).

Las dificultades y lo laborioso del diagnóstico coprológico de *Cryptosporidium* ha propiciado el desarrollo de estuches comerciales basados en la captura de antígenos fecales. En el presente trabajo se comparó la sensibilidad diagnóstica de un *kit* comercial de coprocaptura con los resultados coproscópicos de tinción. Las observaciones demuestran una baja sensibilidad (57,1%) y especificidad de 90,7% del *kit*. La mayor coincidencia de resultados observada en muestras fecales líquidas, sugiere que la sensibilidad del *kit* está determinada por la cantidad de parásitos, ya que fue mayor la frecuencia de ooquistes en heces líquidas que en formadas, confirmando las referencias previas (8). Además, otros factores pueden afectar la calidad de los estuches de diagnóstico importados, como la fecha de vencimiento, transporte desde el país de origen y mala conservación hasta su entrega por el proveedor, existiendo poca confianza en los procedimientos de captura de antígenos en heces (10, 16). Además se desconoce cómo las diferencias antigénicas de las cepas locales puedan producir resultados divergentes, justificando a nivel regional, el desarrollo de programas sobre inmunobiología y producción de antígenos que puedan ser empleados para la obtención de sueros inmunes útiles en el diagnóstico de *Cryptosporidium*.

Aunque nuestra muestra no es representativa de la población, los resultados sugieren que en el estado Carabobo la criptosporidiosis es endémica, especialmente en niños de estratos sociales bajos expuestos a factores de riesgo, que puede diagnosticarse mediante metodologías sensibles y de bajo costo, fáciles de adoptar por la mayoría de los laboratorios clínicos, sin recurrir a procedimientos inmunológicos importados, hasta tanto se disponga de reactivos nacionales para su aplicación en estudios seroepidemiológicos integrales.

BIBLIOGRAFIA

1. Crawford FG, Vermund SH. Human cryptosporidiosis. *CRC Crit Rev Microbiol* 1988; **16**:113-59.
2. Solórzano-Santos F, Penagos PM, Meneses ER, Miranda NMG, Leños, MB, Angulo GD, Fajardo GA. Infección por *Cryptosporidium parvum* en niños desnutridos y no desnutridos sin diarrea en una población rural mexicana. *Rev Invest Clin* 2000; **52**:625-31.
3. Chacín-Bonilla L, Guanipa L, Cano G, Raleigh X, Quijada L. Cryptosporidiosis among patients with acquired immunodeficiency syndrome in Zulia state, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 1992; **47**:582-6.
4. Chacín-Bonilla L, Mejia YM, Cano G, Guanipa N, Estevez J, Bonilla E. *Cryptosporidium* infections in a suburban community in Maracaibo, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 1993; **49**:63-7.
5. Chacín-Bonilla L, Estevez J, Monsalve F, Quijada L. *Cyclospora cayetanensis* infections among diarrheal patients from Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 2001; **65**:351-4.
6. Dann SM, Okhuysen PC, Salameh BM, DuPont HL, Chappell CL. Fecal antibodies to *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *Infec Immun* 2000; **68**:5068-74.
7. Ungar BL. Enzyme-linked immunoassay for detection of *Cryptosporidium* antigens in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1990; **28**:2491-5.
8. Johnston SP, Ballard MM, Beach MJ, Causser L, Wilkins PP. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 2003; **41**:623-6.
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). False-positive laboratory tests for *Cryptosporidium* involving an enzyme-linked immunosorbent assay-United States, November 1997-March 1999. *MMWR* 1999; **48**:4-8.
10. Haupt T, Davis JP, Warshauer D, Beach M, Johnson S, Croft D. Manufacturer's recall of rapid assay kits based on false positive *Cryptosporidium* antigen tests. Wisconsin, 2001-2002. *MMWR* 2002; **51**:189.
11. Clavel A, Arnal A, Sanchez E, Varea M, Quilez J, Ramirez I, Castilho FJ. Comparison of 2 centrifugation procedures in the formalin-ethyl acetate stool concentration technique for the detection of *Cryptosporidium* oocysts. *Int J Parasitol* 1996; **26**:671-2.

12. Kehl KS, Cicirello H, Havens PL. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J Clin Microbiol* 1995; **33**:416-8.
13. Weber R, Bryan RT, Juranek DD. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1992; **30**:2869-73.
14. Flanigan T, Whalen C, Turner J, Soave R, Toerner J, Havlir D, Kotler D. *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. *Ann Intern Med* 1992; **116**:840-2.
15. Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2002; **15**:145-54.
16. Paiba GA, Kay ACS, Marshall J, Smith GA, Catchpole J, Marshall LN, Futter RJ, Byrne CA, Smith RP, Stewart I. *Cryptosporidium parvum* detection: validation of a commercial Elisa for use on faeces from cattle and sheep & pigs. Disponible en:
<http://www.teagasc.ie/publications/2003/conferences/cryptosporidiumparvum/poster07.htm>