

ARTICULO BREVE

Ooquistes de *Cryptosporidium* sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) y presencia del *C. parvum* en niños de Costa Rica

Rosario Achí y Leonardo Mata

Sección de Infección-Nutrición, Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica, 2060 Costa Rica.

(Rec. 31-I-1996. Rev. 25-IV-1996. Acep. 8-VIII-1996)

Abstract: From 1982 to 1987 infant and preschool Costa Rican children with acute diarrhea were studied. *Cryptosporidium* (Tyzzer 1912) and other agents of diarrhea were investigated. *Cryptosporidium* oocysts were diagnosed in Giemsa and acid-fast (Kinyoun) stained smears. Ten *Cryptosporidium* oocysts per positive smear were systematically measured. Giemsa stained oocysts showed less variation respect to the mean. The oocysts corresponded to *C. parvum* with diameters of 5.0 x 4.5 μ m but not to *C. muris* with oocysts of 7.4 to 5.6 μ m.

Key words: *Cryptosporidium*, Apicomplexa, taxonomy, species, diarrhea, epidemiology, Costa Rica.

A partir del descubrimiento y descripción del *Cryptosporidium muris* en 1907 (Tyzzer 1910), varios autores designaron al menos 20 especies más de ese género, según el huésped que albergaba al coccidio (Tzipori 1983, Fayer y Ungar 1986).

Inicialmente, el *Cryptosporidium* fue considerado un parásito "especie-específico" No obstante, experimentos de "transmisión cruzada" en varias especies de vertebrados revelaron que los ooquistes del coccidio de un determinado huésped vertebrado infectan otras especies de mamíferos, aves, reptiles y peces (Tzipori 1983, 1985, Fayer y Ungar 1986). Sin embargo, los criptosporidios de mamíferos infectan preferencialmente a otros mamíferos, mientras que la transmisión cruzada de *Cryptosporidium* de aves a mamíferos no es exitosa (Tzipori 1983, 1985).

La proliferación de "especies" de *Cryptosporidium* generó cierta controversia sobre su taxonomía, lo que llevó a Levine a proponer cuatro especies: *C. muris*, Tyzzer 1910, de mamíferos; *C. meleagridis*, Slavin, 1995, de aves; *C. crotali*, Triffitt, 1925, de reptiles y *C. nasorum*, Hoover *et al.* 1981, de peces tropicales (Levine 1984). Este criterio tuvo el inconveniente de dejar fuera de esta clasificación a la

especie *C. parvum* (Tyzzer 1912), por considerarla sinónimo de *C. muris* (Tyzzer 1910). Este último fue aceptado como la especie prototipo responsable de las infecciones en mamíferos incluyendo al hombre (Levine 1984).

Desde las primeras descripciones del parásito se notó que *C. muris* y *C. parvum* difieren tanto morfológica como estructuralmente y que colonizan niveles distintos del tracto gastrointestinal del ratón (Tyzzer 1910, 1912).

Upton y Current (1985) corroboraron las observaciones iniciales de Tyzzer sobre la existencia de dos especies del coccidio en mamíferos. Esos autores midieron los ooquistes esporulados encontrados en heces de ternero. Los de mayor tamaño [7.4 X 5.6 (6.6-7.9)-(4.5-5.4) μ m] corresponden a *C. muris* y son ovoides con cuatro esporozoítos de 12 a 14 μ m de largo. Los de menor tamaño (5.0 X 4.5 (4.5-5.4)-(4.2-5.0) μ m) corresponden al *C. parvum* y son esféricos o ligeramente ovoides, con cuatro esporozoítos internos de 5 a 6 μ m (Upton y Current 1985). Recientemente, el *C. baileyi* de aves, con ooquistes ovales (6.2 X 4.0 μ m), ha sido asociado a la infección gastrointestinal y pulmonar en pacientes inmunodeficientes (Current *et al.* 1986, Ditrich, *et al.* 1991).

El objetivo del presente estudio fue medir sistemáticamente el tamaño de los ooquistes de *Cryptosporidium* sp. asociados a la diarrea del niño en Costa Rica, con el fin de establecer la especie o especies involucradas a la diarrea en nuestro medio.

En 1982, se inició estudios prospectivos sobre criptosporidiosis en niños inmunocompetentes de la región de Puriscal, así como en el Hospital Nacional de Niños, San José (Mata *et al.* 1984, Achí *et al.* 1985). Durante cinco años se recolectó muestras de heces para preparar frotos que fueron fijados y coloreados con Giemsa y ácido resistencia en frío (Kinyoun) (Fayer y Ungar 1986), para buscar ooquistes de *Cryptosporidium*. Los frotos fueron almacenados para ser observados posteriormente. A partir de ese "banco de laminillas", se seleccionó 76 frotos

positivos por ooquistes del coccidio, coloreados con la tinción de Kinyoun y 69 frotos teñidos con Giemsa, que se encontraban en buenas condiciones y correspondientes a los 76 niños menores de 3 años con diarrea, positivos por *Cryptosporidium*, de los estudios del área urbana y de Puriscal. Este trabajo resume los resultados del examen de esta recolección original de frotos. En cada frotis se midió diez ooquistes a nivel de los diámetros mayor y menor, utilizándose un microscopio, con micrómetro de ocular incorporado, calibrado con un micrómetro de lámina. Se usó la prueba estadística de *t* de Student.

La distribución de frecuencias de los valores promedio de los diámetros (mayor y menor) de los diez ooquistes medidos en los frotos con ambas tinciones, se presentan en la fig. 1.

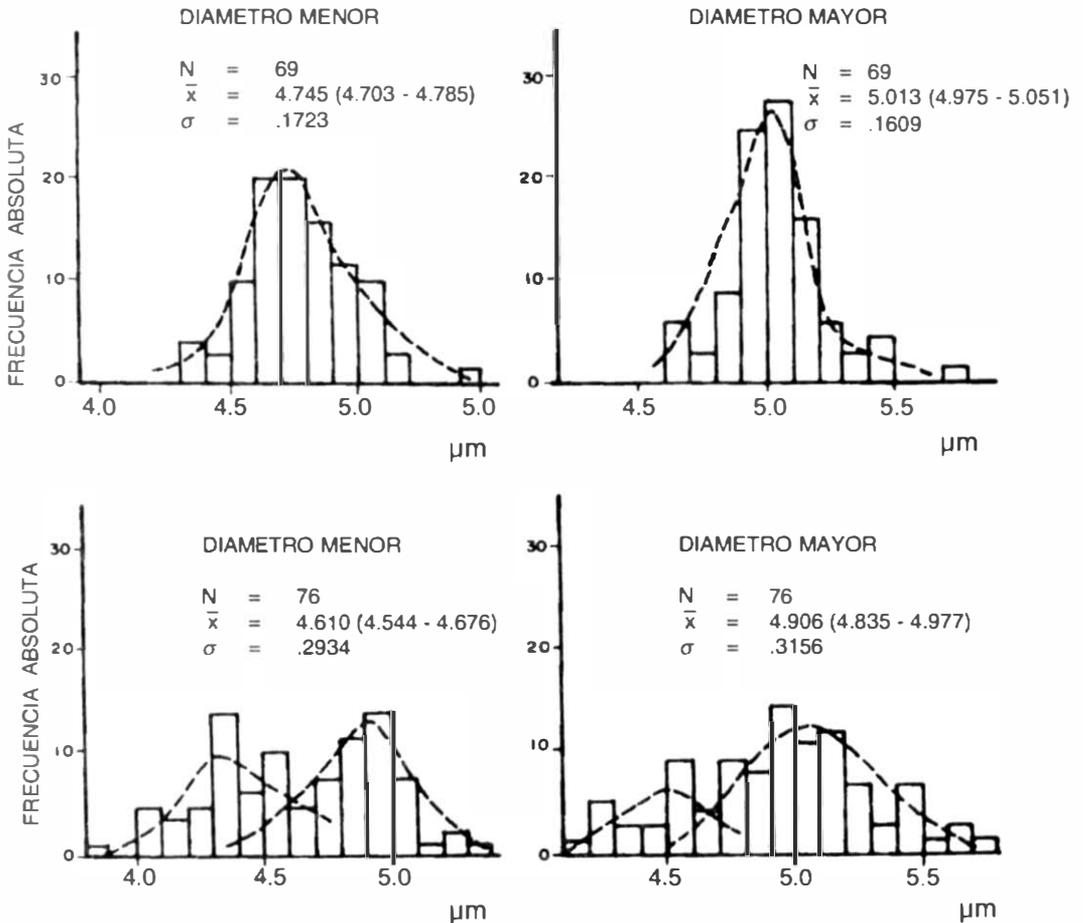


Fig. 1: Distribución de frecuencias del tamaño de los ooquistes (μm) de *Cryptosporidium* en las tinciones de Giemsa (arriba) y de ácido-resistencia (Kinyoun).

CUADRO 1

Medida de los ooquistes de Cryptosporidium (micrómetros), Costa Rica

	Giemsa		Kinyoun	
	Diámetro mayor	Diámetro menor	Diámetro mayor	Diámetro menor
Media	5.01*	4.74**	4.91	4.61**
Desviación estándar	0.16	0.17	0.32	0.29
Límite superior	5.05	4.79	4.98	4.68
Límite inferior	4.98	4.70	4.84	5.54
Variancia	0.03	0.03	0.10	0.09

T student= * y ** (P>.05)

Los valores promedio para los diámetros mayor y menor en las tinción de Giemsa y Acido resistencia se aprecian en el Cuadro 1. Los valores se distribuyeron muy cercanamente al promedio, con poca dispersión a su derredor. Con Giemsa, estos mostraron una distribución gaussiana, con una ligera desviación o sesgo a la izquierda en el diámetro mayor (Fig. 1). Con Kinyoun la distribución de diámetros fue relativamente bimodal (76 valores promedio), aunque en la realidad fue normal, con valores más dispersos respecto al promedio (Fig. 1). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (P>.05). Estos hallazgos sugieren un solo tipo morfológico, con ligeras diferencias atribuibles al tipo de tinción.

Se ha encontrado que este coccidio representa del cinco al 15 % de todos los patógenos entéricos en niños de países tropicales (Achí *et al.* 1985, Fayer y Ungar 1986, Molbak *et al.* 1994) y es un agente reconocido de diarrea persistente (Molbak *et al.* 1994), así como de criptosporidiosis generalizada en sujetos inmunosuprimidos o inmunodeficientes (Fayer y Ungar 1986). Los estudios previos del INISA revelan que el coccidio se asocia al 6% de las diarreas agudas en niños costarricenses menores de tres años (Achí *et al.* 1985).

El método de Giemsa, como técnica de medición del tamaño de los ooquistes mostró ser

mejor que el de ácido-resistencia en frío (Kinyoun) (Fig. 1). En las mediciones de los frotos teñidos con Giemsa, los valores se distribuyeron muy cercanamente al promedio, en tanto que el tamaño de los ooquistes coloreados por Kinyoun mostró mayor variabilidad en sus dimensiones, por lo que los valores promedio presentaron mayor dispersión con respecto a su media aritmética. Sin embargo, la diferencia numérica de los valores promedio obtenidos en ambas técnicas no es estadísticamente significativa (P>.05).

Varios autores han confirmado la presencia de al menos tres especies de *Cryptosporidium* responsables de la infección en mamíferos. La mayoría sugiere que los casos de criptosporidiosis en mamíferos, incluyendo al hombre, bien documentados desde 1912, se han asociado a un parásito indistinguible del *C. parvum*, acompañándose la infección de diarreas acuosas de moderadas a severas (Upton y Current 1985, Fayer y Ungar 1986). En contraste, sólo unos pocos casos aparecen en ganado vacuno, particularmente en adultos jóvenes, asociados a ooquistes de mayor tamaño morfológicamente similares al *C. muris*, en los que la infección es asintomática o clínicamente leve. Los resultados del presente estudio indican fuertemente, que la especie que se ha estado identificando en los niños costarricenses con diarrea, corresponde a *C.*

parvum y no a *C. muris* cuyos ooquistes son de mayor tamaño. Esto concuerda con las observaciones de que la especie *C. parvum* es probablemente la causa principal de infecciones en humanos y tiene amplia distribución geográfica. Sin embargo, las técnicas de biología molecular han demostrado la existencia de diferencias genéticas entre aislamientos de *C. parvum* de humanos y de animales, creando incluso dudas respecto a si debería o no de considerarse a las variantes como una sola especie (Morgan 1995). A fin de corroborar los resultados de la presente investigación y de estudiar detalles del parásito, deberán de realizarse estudios comparativos mediante biología molecular del criptosporidio asociado a la diarrea en humanos y en animales en Costa Rica. Agradecemos a Luis Rosero su ayuda con los análisis estadísticos. Este trabajo recibió financiamiento de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, Proyecto VI-742-84-061.

REFERENCIAS

- Achi, R. L. Mata, M. Vives & D. Pizarro. 1985. Aspectos clínico-epidemiológicos de la criptosporidiosis en Costa Rica. *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños* (Costa Rica), 20: 45-58.
- Current, W. S. J. Upton & T. B. Haynes. 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n.sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. Protozool* 33: 289-296.
- Ditrich, O. L. Palkovic, J. Sterba, J. Prokopic, J. Loudová & M. Giboda. 1991. The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. *Parasitol. Res.* 77: 44-47.
- Fayer, R. & B. Ungar. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 50: 458-482.
- Levine, N. 1984. Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa apicomplexa). *J. Protozool.* 31: 94-98.
- Mata, L. H. Bolaños, D. Pizarro & M. Vives. 1984. Cryptosporidiosis in children from some highland Costa Rican rural and urban áreas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 24-29.
- Molbak, K. P. Aaby, N. Jølyng & AP. J da Silva. 1994. Risk factors for *Cryptosporidium* diarrhea in early childhood: A case-control study from Guinea-Bissau, West Africa. *Am. J. Epidemiol.* 139: 734-740.
- Morgan, U.M. CC, Constantine, P. O'Donoghue, B.P. Meloni, P.A. O'Brien & R.C.A. Thompson. 1995. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52: 559-564.
- Tyzzar, EE. 1910. An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et. sp-nov) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23: 478-509.
- Tyzzar, EE. 1912. *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv. Protistenkd.* 26: 394-412.
- Tzipori, S. 1983. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiol. Rev.* 47: 84-96.
- Tzipori, S. 1985. *Cryptosporidium*: Notes on epidemiology and pathogenesis. *Parasitol. Today* 1: 159-165.
- Upton, S & N. Current. 1985. The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *J. Parasitol.* 71: 625-629.