

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

## Diagnóstico de coccidias y microsporas en muestras de heces diarreicas de pacientes cubanos seropositivos al VIH: primer reporte de microsporas en Cuba

Dra. Virginia Capó de Paz,<sup>1</sup> Téc. Marta Barrero Brínguez,<sup>2</sup> Téc. Beltrán Velázquez Viamonte,<sup>2</sup> Dra. Caridad Luzardo Suárez,<sup>3</sup> Lic. Alina Martínez Rodríguez<sup>4</sup> y Dra. Zaida Alujas Martínez<sup>5</sup>

### RESUMEN

Se estudiaron las numerosas muestras de diarreas líquidas que llegan al laboratorio clínico parasitológico del IPK, en las que se busca la presencia de agentes patógenos de la subclase Coccidia y de la familia Microspora. A partir del 13 de julio de 2000 se completaron las condiciones para diagnosticar microsporidiosis y el método se incorporó a la batería de técnicas diagnósticas que se emplean en el laboratorio. Después de 4 meses se hizo un corte para analizar la positividad hallada. Se presentó un estudio de distribución de frecuencias y se encontró que de 170 muestras estudiadas, 51 resultaron positivas para algún protozoo, lo que representa 30 % de positividad. Las especies más frecuentemente halladas fueron *Cryptosporidium parvum* y microsporidio. Se encontró asociación de varias especies en una misma muestra en 13,1 % de las muestras positivas. Las asociaciones más frecuentes fueron: *Cryptosporidium parvum* y *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum* y microsporidio y, *Cyclospora cayetanensis* y microsporidio, cada una con 2 pacientes. Se halló asociación de 3 especies diferentes en una misma muestra. Todos los individuos en la serie eran seropositivos al VIH y los más afectados tenían menos de 200 linfocitos T CD4 +/mL. Esto constituyó el primer reporte en Cuba de microsporidiosis en heces, lo cual fue posible luego de aplicar e interpretar la técnica previamente descrita para la identificación de este Phylum. Por la tendencia al aumento de los casos con infección VIH/SIDA, se impone que los laboratorios cuenten con los reactivos indispensables para realizar la tinción tricrómica de Didier modificada y que profesionales y técnicos de los laboratorios de parasitología del país se entrenen en los procedimientos para la identificación y el reconocimiento de estos protozoos oportunistas.

**DeCS:** COCCIDIA/inmunología; MICROSPORA/inmunología; INFECCIONES POR VIH; INFECCIONES OPORTUNISTAS RELACIONADAS CON SIDA; HECES/parasitología; DIARREA/etiología; CUBA.

Coccidias y microsporas son protozoos causantes de diarreas en los países tropicales. Han sido culpadas de las "diarreas del viajero" y las de tipo ocupacional. 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,<sup>1</sup> 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.

Bajo el término de coccidias se agrupan entre otras *Isospora belli*, *Sarcocystis hominis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*.<sup>1</sup>

Varias especies de *Cryptosporidium* han sido reconocidas en la naturaleza, que infectan una amplia variedad de hospederos, pero *C. parvum* es la especie que más frecuentemente se diagnostica

<sup>1</sup> Doctora en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Anatomía Patológica. Investigadora Titular.

<sup>2</sup> Técnico en Parasitología.

<sup>3</sup> Especialista de I Grado en Inmunología.

<sup>4</sup> Licenciada en Farmacia.

<sup>5</sup> Médico Residente de 4to. año de Parasitología.

en las diarreas de pacientes inmunodeprimidos y en niños.<sup>2</sup> Es considerado patógeno para humanos de todas las edades y sexos en cualquier latitud, a quienes puede causar infección subclínica, diarreas de intensidad moderada y, hasta la muerte. Con el microscopio de luz los ooquistes de *C. parvum* se observan como cuerpos redondos u ovoides de 2 a 4 mm de diámetro en muestras de heces.<sup>2</sup> Desdichadamente, no existe un tratamiento efectivo para cryptosporidiosis, pero los pacientes mejoran muchísimo con medidas que restablecen la inmunidad del paciente y con terapia sintomática.

Han sido identificadas 2 especies de esporozoos en heces humanas, *Isospora belli* y *Sarcocystis hominis*.<sup>3</sup> Raramente causan infección en humanos inmunocompetentes, sin embargo, pueden considerarse agentes patógenos intestinales oportunistas en pacientes con VIH/SIDA; en quienes pueden producir un síndrome de malabsorción con epigastralgia y lo más representativo de esta coccidia es que es la única que evoluciona con eosinofilia.

*I. belli* y *S. hominis* se identifican en muestras de heces diarreicas como ooquistes característicos, esporulados o no esporulados. Trimetroprim (160 mg), sulfametoxazol (800 mg), 2 veces al día por 7 d son las drogas de elección para el tratamiento de esta parasitosis.<sup>4</sup>

*Cyclospora cayetanensis* tiene una distribución mundial. En humanos causa diarreas acuosas.<sup>5</sup> Hasta hace unos años era una infección del todo desconocida pero, aparentemente, es endémica en zonas tropicales y en particular entre los individuos con la infección por VIH/SIDA. Su diagnóstico se realiza por la identificación al microscopio de los ooquistes en heces. El tratamiento recomendado para *C. cayetanensis* es el mismo que para *I. belli*.<sup>4</sup>

Los organismos del Phylum Microspora son parásitos intracelulares obligados, constituidos por esporas que varían en forma, tamaño y método de división celular según las diferentes especies.<sup>1</sup> Los géneros que infectan a los humanos incluyen *Encephalitozoon*, *Nosema* y *Enterocytozoon*, entre otros, y el diagnóstico de certeza se realiza con diversas técnicas, como reacción en cadena de la polimerasa,<sup>6</sup> inmunofluorescencia<sup>7</sup> y microscopía electrónica. En el laboratorio diagnóstico ordinario se emplea la tinción tricrómica

modificada.<sup>8</sup> Los pacientes con SIDA pueden desarrollar un síndrome diarreico crónico de abundantes diarreas acuosas y semilíquidas, anorexia, pérdida de peso y desgaste físico. Cuando la inmunidad celular es muy precaria, algunas especies producen una enfermedad diseminada grave; entonces, los síntomas corresponden con los órganos afectados; aunque esto depende también de la especie de microsporidium que esté infectando. El albendazol, un benzimidazol carbamato análogo al mebendazol, ha producido respuestas efectivas en el tratamiento de pacientes infectados con microsporidios.<sup>4,9</sup>

Al laboratorio diagnóstico de parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) llegan numerosas muestras de heces diarreicas, no solo de pacientes VIH +, en las que se busca la presencia de agentes patógenos. Se decidió realizar un estudio retrospectivo para determinar la incidencia que existe de coccidias y microsporas, entre estos pacientes con VIH/SIDA que acuden al centro para su atención médica especializada.

## MÉTODOS

### *Técnicas de laboratorio empleadas*

Para diagnosticar estos microorganismos se procesaron las muestras por métodos estándar de examen directo y del concentrado, según los *Métodos Básicos de Laboratorio en Parasitología Médica de la OMS*.<sup>10</sup> Las láminas fueron coloreadas con la técnica de Ziehl Nielsen modificada para la detección de *C. parvum*, *C. cayetanensis* e *Isospora sp.* Para la identificación de microsporidia se empleó la coloración tricrómica de Didier modificada.<sup>11</sup> Las láminas se observaron al microscopio de luz con objetivo de inmersión en aceite, con un aumento de 1 000 x.

A los casos cuyas heces resultaron positivas de alguna especie de coccidia y/o microspora se les estudiaron las subpoblaciones linfoides T, fenotipos CD3, CD4, CD8 para valorar el estado inmunológico de los pacientes infectados con VIH/SIDA. Para el estudio de las subpoblaciones linfocitarias se empleó la técnica de inmunofenotipaje por citometría de flujo.<sup>12</sup>

### Procesamiento de datos

Se buscaron todos los diagnósticos positivos de *C. cayetanensis*, *Isospora sp.*, *C. parvum* y *microsporidium* que se realizaron desde el 13 de julio hasta el 30 de noviembre de 1999. La información se vertió en una hoja de vaciamiento y se procedió al conteo de los casos positivos hallados.

Se incorporó la información referente al conteo global de linfocitos T CD4+ a la hoja de datos. De cada uno de los pacientes se hizo el análisis de los resultados con el diagnóstico de género hecho.

## RESULTADOS

En el laboratorio se recibió un total de 170 muestras de diarreas líquidas en el período analizado. De estas muestras, 51 (30 %) resultaron positivas para al menos un tipo de protozoo parasitario. El más frecuente fue *C. parvum* (n= 35; 20,58 %) seguido de microspora (n= 12; 7,05 %), *I. belli* (n= 8; 4,70 %) y *C. cayetanensis* (n= 6; 3,53 %).

En 8 pacientes se encontraron asociaciones de 2 especies o más en la misma muestra. Las asociaciones más frecuentemente halladas fueron

*C. parvum*-*C. cayetanensis* (n= 2), *C. parvum*-Microsporidio (n= 2), *C. cayetanensis*-Microsporidio (n= 2), seguida por *C. parvum*-*I. belli* (n= 1). Llamó la atención la asociación de 3 especies en 1 caso que involucró *C. parvum*, *C. cayetanensis* y microsporidio.

Al relacionar el conteo de los linfocitos T CD4+ y los tipos de microorganismos identificados en las heces (tabla), se halló que la diferencia en la frecuencia de casos con *C. parvum* entre los pacientes con < 200 células y aquellos con > 200

células fue estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ). Los valores de las frecuencias hallados para las otras especies que se estudiaron no fueron significativos ( $p > 0,05$ ) para ambos grupos, lo que quizás pudiera deberse al pequeño número de casos que presentaron estas infecciones.

## DISCUSIÓN

Este estudio presenta la importancia de algunas parasitosis intestinales en pacientes infectados con VIH/SIDA y síndrome diarreico. Otros agentes etiológicos como los virales, micóticos o bacterianos no fueron considerados en este trabajo. Sin embargo, queda documentada la importancia que las coccidias y microsporas tienen como agentes etiológicos en estos casos.

La frecuencia de diarreas a causa de coccidias y microsporas, según los resultados de este trabajo, puede considerarse de importancia porque 30 % de las muestras estudiadas presentaban al menos uno de estos agentes etiológicos. Además, 8 de ellos presentaron evidencias de infección por más de 1 de estos agentes en la misma muestra.

Como se ha reportado reiteradamente en la literatura, la infección por *C. parvum* es la más frecuente de las parasitosis intestinales prevalentes en pacientes con VIH/SIDA e inmunocomprometidos.<sup>13</sup> El valor de positividad de 20,6 % para *C. parvum* hallado en este trabajo fue mayor que los valores reportados previamente por *Hadad* y otros (38,3 %) en 1990<sup>13</sup> y por *Martínez* en 1998,<sup>14</sup> y que 11,9 % según *Escobedo*.<sup>15</sup> Todos estos estudios fueron realizados en el medio cubano.

En orden de frecuencia, siguió la infección por microsporidio con 7,05 %. Por no haber sido detectada esta parasitosis con anterioridad en Cuba,

**TABLA.** Distribución de frecuencia-especie de agente etiológico con respecto a los valores de recuento de linfocitos T CD4+

Recuento de linfocitos TCD4+ / mm <sup>3</sup>	<i>C. parvum</i> (n= 35)		<i>Isospora belli</i> (n= 8)		<i>Cyclospora cayetanensis</i> (n= 6)		Microsporidio (n= 12)	
	No	%	No	%	No	%	No	%
< 200	27	77,14	3	37,50	4	66,67	5	41,67
> 200	8	22,86	5	62,50	2	33,33	7	58,33
	(p > 0,01)		(p > 0,05)		(p > 0,05)		(p > 0,05)	

la valoración en cuanto a la frecuencia hallada solo puede ser hecha con datos de otros países. Por ejemplo, al comparar este dato con 11 % en Zimbabwe<sup>16</sup> y 39 % reportado por *Orenstein*<sup>17</sup> se puede considerar que en Cuba la infección por microsporidio es moderada.

Seguidamente, aparecieron *I. belli* y *C. cayetanensis* con una frecuencia de 4,70 % y 3,53 %, respectivamente. Estos valores se encuentran por encima de los hallados previamente en Cuba.<sup>14,15</sup>

La presencia de estos protozoos oportunistas se explica por los trastornos inmunitarios mediados por células, principalmente sobre las subpoblaciones de linfocitos T CD4+, que caracterizan la infección por VIH/SIDA. Estas células e inmunomoduladores segregados por otras células del aparato inmunitario, favorecen mecanismos de defensa contra parásitos en el tubo digestivo.<sup>18,19</sup> Los resultados obtenidos favorecen lo reportado antes acerca de que las coccidiosis y los microsporidios se comportan como agentes oportunistas en pacientes severamente inmunocomprometidos.<sup>19</sup> En este estudio, 68 % de los pacientes tenía un recuento de linfocitos T CD4+ por debajo de 200 células/mL, lo que indica la severa inmunodepresión que sufrían. Las cifras del recuento de linfocitos T CD4+ del resto de los casos tenía un valor por encima de 200 células/mL. Sin embargo, se debe aclarar que estos valores no necesariamente se correspondían con el momento del diagnóstico de las infecciones entéricas. En este trabajo se tomaron los valores de las últimas determinaciones que se habían realizado a los pacientes, lo que pudo suceder algún tiempo antes del comienzo del cuadro diarreico.

El presente estudio demuestra que los pacientes cubanos con diarreas crónicas y VIH/SIDA con frecuencia padecen infecciones intestinales por coccidias y microsporidios. Por lo tanto, es importante lograr la identificación de los agentes causantes del síndrome diarreico para imponer tratamiento específico oportunamente, si se encuentran especies que pueden ser tratadas de forma eficaz. Esto tiene un valor inestimable en el alivio de los síntomas y de las tantas complicaciones graves que los pacientes inmunodeprimidos presentan en el transcurso de su enfermedad.

Se demuestra por lo tanto, la necesidad de entrenar al personal que diagnostica en los laboratorios de parasitología clínica, principalmente a aquellos vinculados a las personas VIH/SIDA en tratamiento ambulatorio y a los sanatorios para estas personas, con la finalidad de que se pueda hacer el diagnóstico etiológico de todas las infecciones por protozoos y coccidias, que los pueden afectar en el medio cubano.

Este artículo constituye el primer reporte en Cuba de microsporidios en heces.

#### SUMMARY

The numerous specimens of liquid diarrheas received at the clinical parasitology laboratory of "Pedro Kouri" Institute of Tropical Medicine were studied searching for the presence of pathogenic agents of Coccidium subclass and of the microspore family. The conditions to diagnose microsporidia were created on July 13, 2000, and the method was incorporated to the battery of diagnostic techniques used in the laboratory. A cut-off was made after 4 months to analyze the positivity found. A frequency distribution study was conducted and it was observed that of the 170 studied samples, 51 proved to be positive for some protozoan, which represents 30 % of positivity. The most frequently found species were *Cryptosporidium parvum* and microsporidium. Association of various species in a same sample was found in 13.1 % of the positive samples. The most frequent associations were: *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum* and microsporidium, and *Cyclospora cayetanensis* and microsporidium, each with 2 patients. Association of 3 different species in a same sample was also found. All the individuals in the series were HIV seropositive and the most affected had less than 200 TCD4+ lymphocytes/mL. This was the first report of microsporidia in feces in Cuba. It was possible after applying and interpreting the technique previously described to identify this phylum. As there is a trend towards the increase of cases with HIV/AIDS infection, it is necessary that the laboratories have the indispensable reagents to perform the modified Didier's trichromic staining and that the professionals and technicians of the parasitology laboratories of the country be trained in the procedures for identifying and recognizing these opportunistic protozoa.

**Subject headings:** TUBERCULOSIS/mortality; TUBERCULOSIS/history; TUBERCULOSIS PULMONARY/mortality; TUBERCULOSIS PULMONARY/history; MORTALITY RATE; CUBA.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. 3. ed. Medellín:CIB; 1998, 69-76.
2. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 2000;30:1305-22.
3. Torres MF. Enteritis por *Isospora belli* en Centroamérica y su relación con el SIDA. *Rev Asoc Guatemalteca Parasit Med Trop* 1999;6:91-7.
4. Martindale. The Extra Pharmacopoeia, 31 ed. London:Royal Pharmaceutical Society 1996:109-10.

5. Ortega YR, Sterling ChR, Gilman RH, Cama VA, Díaz F. *Cyclospora* species: a new protozoan pathogen of humans. N Engl J Med 1993;328:1308-12.
6. Carnevale S, Velázquez JN, Lable JH, Chertcoff A, Cabrera MG, Rodríguez MJ. Diagnosis of *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in a patient with AIDS. Clin Diagn Lab Immunol 2000;7:504-6.
7. Contreas C, Donovan J, Berlin OG, Saverby TM, La Riviere M. Comparison of fluorescence and standard light microscopy for diagnosis of microsporidia in stools of patients with acquired immunodeficiency virus and chronic diarrhoea. AIDS 1997;11:386-7.
8. Honore PS, Houze S, Sarfati C, Challier S, Kac G, le Bras J *et al.* Contribution of Trichrome blue in the diagnosis of microsporidiosis. Bull Soc Pathol Exot 1996;89:179-80.
9. Dietrich DT, Lew EA, Kotler DP, Poles MA, Orenstein JM. Treatment with albendazole for intestinal disease due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with AIDS. Infect Dis 1994;169:178-82.
10. Organización Mundial de la Salud. Métodos Básicos de laboratorio en Parasitología Médica. Ginebra:WHO; 1992.
11. Didier ES, Orenstein JM, Aldrus A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. J Clin Microbiol 1995;33:3138-45.
12. Nicholson JKA, Jones BM, Hubbard M. CD4 T-lymphocyte determinations on whole blood specimens using a single-tube three-color assay. Cytometry 1993;14:685-9.
13. Hadad P, Fernández H, Millán JC, Ramos A, Núñez F. Infección por *Cryptosporidium* sp. en individuos cubanos infectados por el VIH. Rev Cubana Med Trop 1993;45:55-8.
14. Martínez G. Parasitosis intestinales en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana con síndrome diarreico. Tesis para optar por el grado de Máster en Infectología y Medicina Tropical, Ciudad de La Habana: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, 1998:42.
15. Escobedo AA, Núñez FA. Prevalence of intestinal parasites in Cuban acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients. Acta Tropica 1999;72:125-30.
16. Van Gool T, Luderhoff E, Nathoo KJ, Kiire CF, Dankert J, Manson PR. High prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* infection among HIV/positive individuals with persistent diarrhoea in Harare, Zimbabwe. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1995;89:478-80.
17. Orenstein JM, Chiang K, Steinberg W. Intestinal microsporidiosis as a cause of diarrhoea in human immunodeficiency virus-infected patients: a report of 20 cases. Human Pathol 1994;21(5):475-81.
18. Cox FEG, Liew EY. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. Parasitol Today 1992;8:371.
19. Abraham R, Ogra PL. Mucosal microenvironment and mucosal response. Am J Trop Med Hyg 1994;50:3-9.

Recibido: 14 de marzo de 2001. Aprobado: 15 de agosto de 2002.  
 Dra. Virginia Capó de Paz. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", Autopista Novia del Mediodía, km 6 ½, La Lisa, Apartado Postal 601. Marianao 13; Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: vcapo@ipk.sld.cu