



Informe final de proyecto de investigación.

Directora: Dra. Patricia Cordoba

Nombre del Proyecto:

Estudio de *Cryptosporidium* spp en diferentes poblaciones de La Rioja.

Directora

Dra. Patricia Cordoba

Colaboradores Profesionales:

Cerezuela, Flavia : Hospital Nacional de Clínicas. La Rioja.

Miniti Eliana: Hospital Nacional de la madre y el niño. La Rioja.

Ocampo Macarena: Centro de integración comunicaría. Milagro. La Rioja.

Spano Cruz Angeles: Departamento de Ciencias Exactas. UNLAR. La Rioja.

Recchioni Liliana: Departamento de Ciencias Aplicadas. UNLAR. La Rioja.

Rivero Adriana: Instituto Universitario de Ciencias de la Salud de Fundación Barceló HA. La Rioja

Rodríguez Marcela: Cátedra de química biológica. Facultad de Medicina. UNC
Instituto Universitario de Ciencias de la Salud de Fundación Barceló HA. La Rioja
Colaboradores Alumnos del Instituto Universitario de Ciencias de la Salud de
Fundación Barceló HA. La Rioja

-Pablo Ojeda,

- Ana Surai Fra

- Ana Carrizo

-Fabricio Ovelar Méndez

-Rocio Ruiz Medina,

-Yesica Valenzuela Cruz

Realizado en la provincia de La Rioja. Subsidiado en Convocatoria: 2014-2016.

Fundación Barceló H.A. Res Nro: HCS N°: 5747/14.

Informe final de proyecto de investigación.
Directora: Dra. Patricia Cordoba

Índice

	Pagina
Resumen	3
Introducción	5
Objetivo	6
Materiales y Métodos	7
Resultados	9
Discusión	12
Conclusión	14
Bibliografía	15



Informe final de proyecto de investigación.

Directora: Dra. Patricia Cordoba

Resumen

El *Cryptosporidium* causa una infección gastrointestinal en varios mamíferos, incluido el hombre. Nuestro objetivo fue estudiar la presencia de este agente en niños de edad escolar, terneros y perros callejeros en la provincia de La Rioja. Se recolectaron un total de 193 muestras de materia fecal (93 muestras de niños, 40 muestras de perros y 60 muestras de vacas) desde mayo 2013 a diciembre de 2016 en los departamentos Capital, Sanagasta, Independencia y General Ocampo. Los 93 niños estudiados poseen una edad promedio: $6,65 \pm 2,05$. Las muestras seriadas fueron obtenidas con formaldehído y la muestra única con solución fisiológica. Todas fueron procesadas por coloración de Z-N modificada previa concentración por el método de Telemann. Cuatro muestras positivas fueron procesadas para obtener el ADN del parásito por columnas de afinidad y purificadas por electroforesis horizontal en gel de agarosa. El análisis estadístico utilizado fue el test t para diferencias de medias independientes y un test chi cuadrado para análisis de asociación ambas con un nivel de significación del 5%. De las muestras analizadas, 18 de niños (19,35%), 8 de perros (20%) y 15 de terneros (25%) fueron positivas. Se comparó la presencia de coinfección y de síntomas entre los niños estudiados. En el grupo de niños con presencia del *Cryptosporidium*, el 61,1% poseen presencia de otros parásitos, especialmente la *Giardia* spp, y en el grupo sin presencia el 13,3%. Esta diferencia fue significativa ($p=0,0001$). Además, en el primer grupo el 66,67% de los niños no poseen síntomas y en el segundo el 69,33%, no se detectaron diferencias significativas ($p=0,265$). Se obtuvo ADN de las 4 muestras positivas.



Informe final de proyecto de investigación.

Directora: Dra. Patricia Cordoba

Los resultados muestran que es un parásito importante en la provincia infectando niños en coinfección con otros parásitos protozoarios, como *Giardia* spp. y *Entamoeba* spp., con o sin síntomas donde el perro y los terneros estudiados podrían ser transmisores ambientales por tierra o por agua. Más estudios son necesarios como las características moleculares para conocer su potencial zoonótico a fin colaborar en establecer medidas de vigilancia y control adecuadas en nuestra población.



Informe final de proyecto de investigación.

Directora: Dra. Patricia Cordoba

Introducción

El *Cryptosporidium* causa una infección gastrointestinal en varios mamíferos, incluido el hombre. El ooquiste, su estadio infectivo, se elimina en grandes cantidades con las heces del hospedador. Su resistencia a condiciones adversas y a los tratamientos de potabilización del agua permite su diseminación y persistencia en el ambiente (1). Los terneros menores de 30 días constituyen una de las principales fuentes de contaminación ambiental con ooquistes de *Cryptosporidium parvum*, la principal especie zoonótica del género (1). Aunque las infecciones humanas se han observado con más de 15 especies, la mayoría de las infecciones en todo el mundo se han atribuido a *Cryptosporidium hominis* y *Cryptosporidium parvum* (2).

En sujetos inmunocomprometidos, sobre todo en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), ocasiona cuadros clínicos más graves y duraderos (3). En humanos inmunocompetentes produce diarreas, sin sangre ni leucocitos, tras una semana de incubación. Este agente fue detectado en el 1% de muestras de material fecal de huéspedes inmunocompetentes en la mayoría de los países y en el 5–10% de material fecal de huéspedes con bajos recursos.(4) La infección puede presentarse sintomática o asintomática y podría estar relacionada con bajo crecimientos.(5) La prolongación (7–14 días) y persistencia (≥ 14 días) de la diarrea son características de la infección (6) y podría estar asociada a malnutrición y problemas de crecimientos en los niños.(6,7)



Informe final de proyecto de investigación.

Directora: Dra. Patricia Cordoba

En Argentina este agente etiológico, fue detectado con potencial zoonótico en agua (8,9), en terneros (10,11) y perros (12) en diferentes ciudades, produciendo patologías en la población inmunocomprometida (13,14,15) con pocos estudios en niños inmunocompetentes o con problemas de crecimiento .

La Rioja es una población del noroeste de Argentina con alrededor de 300.000 mil personas con 89 680 km² donde predomina un relieve montañoso de escasa vegetación con altas temperaturas sin muchos curso de agua permanente por lo que varias especies comparten las mismas fuentes de agua. Algunas parasitosis zoonoticas fueron detectadas en la ciudad de La Rioja (16,17) y *Cryptosporidium* fue detectado en el 50% de las muestras de materia fecal de infectados de HIV y en baja porcentaje en Animales domésticos (18). Desconocemos la importancia de este agente en los niños inmunocompetentes y las especies reservorios de esta región.

Objetivo

El objetivo del presente proyecto fue estudiar la presencia de *Cryptosporidium* spp en niños inmunocompetentes, en perros y en terneros, de la provincia de La Rioja desde 2013-2015.



Informe final de proyecto de investigación.

Directora: Dra. Patricia Cordoba

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal. Se recolectaron un total de 193 muestras de materia fecal: 93 muestras de niños (entre 2-12 años), 40 muestras de perros y 60 muestras de terneros desde mayo a diciembre de 2013-2016 en los departamentos Capital, Sanagasta, Independencia y General Ocampo. Las muestras seriadas fueron obtenidas con formaldehído y la muestra única con solución fisiológica. Los perros estudiados eran callejeros y cachorros. Los terneros estudiados estaban con diarrea y eran menores de 2 años. Los niños asintomáticos estaban escolarizados en el primer año del primer ciclo escolar argentino y los niños con síntomas clínicos de diarrea estaban en consultorios ambulatorios en el Hospital pediátrico de la Madre y el niño, Hospital de clínicas Virgen María de Fátima y centro de integración comunitaria. Se definió como diarrea a más de tres deposiciones diarias o más 100gr por día. Todas fueron procesadas por coloración de Ziehl-Neelsen (Z-N) modificada (19) previa concentración por el método de Telemann o flotación de sacarosa. Se consideró positivo a partir de la visualización de más de 5 ooquistes en adelante. El proyecto y el consentimiento informado fue aprobado por el comité de ética de la Fundación Barceló H.A. Res Nro: HCS N°: 5747/14.

Las variables estudiadas en los niños fueron edad y género. Para estudiar la coinfección, se detectaron rotavirus, adenovirus y Giardia sp. en cada muestra de materia fecal de los niños. Rotavirus y adenovirus fue detectado por Inmunocromatografía Biomerieux y Giardia sp por visualización directa previa concentración por Telemann (19). Las variables cualitativas fueron presencia o no



Informe final de proyecto de investigación.

Directora: Dra. Patricia Cordoba

de *Cryptosporidium*; presencia o no de otros microorganismos (Rotavirus, Adenovirus y Protozoo) y presencia de diarrea o no. El análisis de asociación fue realizado mediante un test chi cuadrado. Se conforman dos grupos: uno con los niños con presencia de *Cryptosporidium* y otro de los niños sin presencia.

Para el análisis de las diferencias en edad se utilizó el test t para diferencias de medias independientes. Ambas pruebas se realizaron con un nivel de significación del 5%.

Resultados

Tabla 1: Muestras positivas para *Cryptosporidium* spp. en las poblaciones estudiadas.

Poblaciones	Muestras positivas Nro/%	Muestras negativas	Muestras totales obtenidas
Niños	18(19,35%)	75	93
Perros	8(20%)	32	40
terneros	15(25%)	45	60

De las muestras analizadas, 18 de niños (19,35%), 8 de perros (20%) y 15 de terneros (25%) fueron positivas.

Tabla 2: Agentes infecciosos detectados en materia fecal de niños estudiados.

Agentes detectados	Numero de muestras	Edad
<i>Cryptosporidium</i> spp Único agente	6	5,33± 2,06
Coinfección de <i>Cryptosporidium</i> spp - Giardia spp.	12	6,33 ±1,82
Giardia spp. Único agente	10	6,90 ±2,96
Rotavirus	3	4,00 ± 2,82
Adenovirus	1	7,00
Negativos	61	6,88 ± 1,87
Totales	93	

Cryptosporidium spp. se presenta en coinfección con Giardia spp.

Comparación entre grupos de los niños con y sin infección de *Cryptosporidium*

A partir de los 93 niños analizados se conforman dos grupos: uno con los niños con presencia y otro de los niños sin presencia de *Cryptosporidium*. Las variables cuantitativas observadas se presentan los siguientes valores descriptivos.

	Totales	Positivo	Negativo	p
Edad	6,65±2,05	6,00 ±1,90	6,81±2,07	0,330
Número absoluto de muestras/porcentaje (%)	93 (100%)	18 (19,35%),	75 (80,64%)	

Aunque los niños positivos son meses menores esta diferencia no es significativa.

Tabla 3: Distribución de muestras de niños según presencia de *Cryptosporidium* y síntomas.

			Presencia de <i>Cryptosporidium</i>		Total
			No	Si	
Con Giardia spp	No	Frecuencia	65	7	72
		%	86,67	38,89	77,42
	Si	Frecuencia	10	11	21
		%	13,33	61,11	22,58
Total		Frecuencia	75	18	93
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Se observó que del total de niños que poseen la presencia del *Cryptosporidium* el 61,11% poseen presencia de otros parásitos. Sin embargo, del total de niños sin la presencia de *Cryptosporidium* el 13,3% poseen otros parásitos. Por lo tanto,

mediante el test de asociación se detectó una asociación significativa entre ambas variables ($p=0,0001$). Esto implica que la presencia de un parásito favorece la presencia de otros.

Tabla 4: Distribución de muestras de niños según presencia de *Cryptosporidium* y síntomas

			Presencia de <i>Cryptosporidium</i>		Total
			No	Si	
Síntomas	No	Frecuencia	52	12	64
		%	69,33	66,67	68,82
	Si	Frecuencia	23	6	29
		%	30,67	33,33	31,18
Total		Frecuencia	75	18	79
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Se observó que del total de niños que poseen la presencia del *Cryptosporidium* el 66,67 % no poseen síntomas. Además del total de niños sin la presencia de *Cryptosporidium* el 69,33 % tampoco poseen síntomas. Por lo tanto mediante el test de asociación no se detectó una asociación entre los síntomas y la presencia de *Cryptosporidium* (0,265). Esto implica que la presencia del parásito no se ve reflejada en los síntomas.



Informe final de proyecto de investigación.

Directora: Dra. Patricia Cordoba

Discusión

Varios estudios a nivel mundial establecen que en los países desarrollados hay prevalencias entre 1% y 3% y en los países en vía de desarrollo entre 10% y 12%. (4) En el presente trabajo se determinó la presencia de *Cryptosporidium* spp. en 17,7% de los niños escolarizados en la Provincia de La Rioja. Prevalencias más altas fueron informadas por ciudades pertenecientes a Latinoamérica, en países como Venezuela (20), Perú (5,6), Colombia (21) y México (22), utilizando la misma técnica de detección con concentración previa. La detección por ZN muestra un porcentaje que podría ser superior si se detecta por técnicas moleculares que aumentan la sensibilidad. (23)

Varios factores fueron asociados a la infección de *Cryptosporidium* así como el nivel socioeconómico, la presencia de otros agentes etiológicos y la desnutrición (4). En este sentido se estudiaron las frecuencias de este agente en diferentes sectores sociales en Venezuela (20) sin encontrar diferencias entre ellos aunque no fue estudiado en el presente trabajo. La población de La Rioja se caracteriza por tener el 15,5% de la población tiene necesidades básicas insatisfechas y una tasa de analfabetismo de 1,82 y la desnutrición es un dato relevante pero no conocida por varios sectores de la provincia. En el presente trabajo determinamos que la presencia de *Cryptosporidium* spp se encuentra asociado a la presencia de otros protozoo como *Giardia* sp. como también fue determinado en niños del Líbano. (24) sugiriendo que podría estar relacionado a vías comunes de infección como el agua. Además determinamos que la infección se desarrolla mayoritariamente con ausencia de síntomas, como ya fuera demostrado



Informe final de proyecto de investigación.

Directora: Dra. Patricia Cordoba

anteriormente (6), que propicia la diseminación de la infección en el medio ambiente ya que la transmisión puede producirse por cualquier vía de ingestión de material contaminado con ooquistes viables excretados por individuos infectados. Los terneros infectados fueron observados y su potencial zoonótico identificado en otras provincias de Argentina (10-11) pero los perros infectados fueron reportados en Argentina como al sur, Neuquén (12) y al centro (25), aunque con porcentajes menores. Estos resultados muestran que el ooquistes, resistentes a la cloración, está presente en diferentes especies, no solo en animales de cría sino también de compañía, en la provincia indicando que la difusión de la infección a nivel ambiental está presente y se deben tomar las medidas sanitarias adecuadas.



Informe final de proyecto de investigación.

Directora: Dra. Patricia Cordoba

Conclusión

Este trabajo constituye el primer reporte de *Cryptosporidium* spp en esta región del noroeste del país en animales hospederos ya que determinamos que los terneros y los perros en esta provincia se encuentran altamente infectados, aunque desconocemos en este momento su potencial zoonótico.

En conclusión, los resultados del presente trabajo muestran que la provincia de La Rioja, situado al noroeste de Argentina, presenta niños infectados, sin síntomas, con coinfección de *Giardia* spp. Estos niños se encuentran en un medio donde otras especies, como el ternero y el perro, se encuentran infectadas pudiéndose difundir no solo por actividades ganaderas sino también por animales de compañía constituyéndose en una enfermedad ambiental en nuestra región.



Informe final de proyecto de investigación.

Directora: Dra. Patricia Cordoba

Bibliografía

1. Del Coco VF, Córdoba MA, Basualdo JA.(2009) Cryptosporidiosis: an emerging zoonosis.Rev Argent Microbiol. Jun-Sep;41(3):185-96.
2. Bouzid M, Hunter PR, Chalmers RM, Tyler KM. (2013) *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. Clin Microbiol Rev.; 26:115–34.
3. Nissapatorn V, Sawangjaroen N. (2011)Parasitic infections in HIV infected individuals: diagnostic & therapeutic challenges.Indian J Med Res. Dec;134(6):878-97.
4. Lima, AA.; Samie, A.; Guerrant, RL. Cryptosporidiosis. In: Guerrant, RL.; Walker, DH.; Weller, PF., editors. Tropical Infectious Diseases. Philadelphia, Pa: Elsevier-Churchill Livingstone; (2011). p. 640-63.
5. Checkley W, Gilman RH, Epstein LD, et al. (1997) Asymptomatic and symptomatic cryptosporidiosis: their acute effect on weight gain in Peruvian children. Am J Epidemiol.; 145:156–63.
6. Moore SR, Lima NL, Soares AM, et al. (2010) Prolonged episodes of acute diarrhea reduce growth and increase risk of persistent diarrhea in children. Gastroenterology.; 139:1156–64.
7. Ajjampur SS, Liakath FB, Kannan A, et al. (2010) Multisite study of cryptosporidiosis in children with diarrhea in India. J Clin Microbiol.; 48:2075–81.
8. Abramovich BL, Gilli MI, Haye MA, Carrera E, Lurá MC, Nepote A, Gómez PA, Vaira S, Contini L. (2001) *Cryptosporidium* y *Giardia* in surface water. Rev Argent Microbiol. Jul-Sep;33(3):167-76.



Informe final de proyecto de investigación.

Directora: Dra. Patricia Cordoba

9. Basualdo J, Pezzani B, De Luca M, Córdoba A, Apezteguía M. (2000) Screening of the municipal water system of La Plata, Argentina, for human intestinal parasites. *Int J Hyg Environ Health*. Oct;203(2):177-82.
10. Del Coco VF, Córdoba MA, Bilbao G, de Almeida Castro AP, Basualdo JA, Fayer R, Santín M. (2014) *Cryptosporidium parvum* GP60 subtypes in dairy cattle from Buenos Aires, Argentina. *Res Vet Sci*. Apr;96(2):311-4.
11. Tomazic ML, Maidana J, Dominguez M, Uriarte EL, Galarza R, Garro C, Florin-Christensen M, Schnittger L. (2013) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Argentina. *Vet Parasitol*. Dec 6;198(3-4):382-6.
12. Soriano SV, Pierangeli NB, Roccia I, Bergagna HF, Lazzarini LE, Celescinco A, Saiz MS, Kossman A, Contreras PA, Arias C, Basualdo JA. (2010). A wide diversity of zoonotic intestinal parasites infects urban and rural dogs in Neuquén, Patagonia, Argentina. *Vet Parasitol*. Jan 20; 167(1):81-5.
13. Carnevale S, N Velásquez J, M E, G Astudillo O, Etchart C, V Chertcoff A, Di Risio C. (2010) Identification of *Cryptosporidium hominis* in a patient with sclerosing cholangitis and AIDS. *Acta Gastroenterol Latinoam*. Sep;40(3):271-5.
14. Corti M, Villafañe MF, Muzzio E, Bava J, Abuín JC, Palmieri OJ. (2008) Pulmonary cryptosporidiosis in AIDS patients. *Rev Argent Microbiol*. Apr-Jun; 40(2):106-8.

15. Barboni G6, Candi M, Inés Villacé M, Leonardelli A, Balbaryski J, Gaddi E. (2008) Intestinal cryptosporidiosis in HIV infected children. *Medicina (B Aires)*; 68(3):213-8.
16. J C Amaya, N Moreno, N Salmaso, E Bazan, G Ricoy, P Córdoba, Santillan G. (2016) Estudio de infestación de caninos con *Echinococcus granulosus* en la provincia de La Rioja, Argentina. Study of infestation of dogs with *Echinococcus granulosus* in the province of La Rioja, Argentina". Aceptado para la publicación en *Revista Argentina de Microbiología*. *Rev Argent Microbiol*. Jan 13. pii: S0325-7541(15)00162-5.
17. PN. Castillo, L N. Salmaso, G Sosa Mangano, B N.E. Rombolá y P A. Cordoba. (2014) *Trypanosoma cruzi* en un paciente inmunocomprometido. Reactivación de la enfermedad de Chagas de la ciudad de La Rioja, Argentina. *Rev. Argent Microbiol.*; 46(4): 378-9.
18. Mirabal P, Cuffia V, Guerra N, y col. (2007) Presencia de *Giardia* y *Cryptosporidium* spp. en animales domésticos de la ciudad de La Rioja. XI Congreso Argentino de Microbiología. Córdoba. Argentina. Octubre 10-12. 2007. Resumen publicado *Revista Argentina de Microbiología*. Vol. 39, supl.1 p 98
19. Organization of International Epidemiology (OIE), 2004. Cryptosporidiosis. In: *Manual of 309 Diagnostic Tests and vaccines for Terrestrial Animals*, fifth ed., Part 2 Section 310 2.10. Chapter 2.10.9, pp. 37.
20. Díaz de Suárez, O. B. Calvo Morales y M. Calchi La Corte (2016) Prevalence of cryptosporidiosis in children less than 6 years and its relation



Informe final de proyecto de investigación.

Directora: Dra. Patricia Cordoba

with the risk factors. PLOS Neglected Tropical Diseases |
DOI:10.1371/journal.pntd.0004496 March 14, 2016

21. Velasco CA, Sarmiento IC, Calderón J, Fonseca RA, CastroP, Carreño M. (2002) Prevalence of criptosporidiosis in children younger than 13 years. J Pediatr Gastroenterol Nutr;35: 437-438.
22. Solórzano-Santos F. (2000) *Cryptosporidium* parvum infection in malnourished and non malnourished children without diarrhea in a Mexican rural population. Rev Invest Clin; 52: 625-631.
23. W Checkley, A C White Jr, D Jaganath, M J Arrowood, R M Chalmers, et al. (2015) A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium* Lancet Infect Dis. January; 15(1): 85–94.
24. Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, et al. (2016) PLoS Negl Trop Dis. Mar 14;10(3):e0004496. doi: 10.1371/journal.pntd.0004496.
25. Fontanarrosa MF, Vezzani D, Basabe J, Eiras DF. (2006) An epidemiological study of gastrointestinal parasites of dogs from Southern Greater Buenos Aires (Argentina): age, gender, breed, mixed infections, and seasonal and spatial patterns. Vet Parasitol. Mar 31;136(3-4):283-95. Epub 2005 Dec 20.