

CITOLOGÍA DE EXCRETAS DIARREICAS ASOCIADAS A ROTAVIRUS, *CAMPYLOBACTER* Y *CRYPTOSPORIDIUM*

HILDA BOLAÑOS*
ALBERTO SIMHON*
LEONARDO MATA*

RESUMEN

Se estudiaron las heces diarreicas de 200 niños menores de 2 años y se anotaron las características macroscópicas de las heces y la presencia de leucocitos y glóbulos rojos en frotos teñidos con Giemsa y en suspensiones salinas a fresco, así como sangre oculta por la prueba de bencidina. Se correlacionaron estos resultados con la presencia de rotavirus. *Campylobacter fetus jejuni*, y *Cryptosporidium* sp.

En 6 de 68 muestras (8,8%) positivas por rotavirus se encontraron leucocitos, y en 2 (2,9%) sangre oculta. Estudios previos han demostrado la ausencia de tales elementos en la diarrea por rotavirus, por lo que la presencia de estos elementos sugiere infección mixta. En 3 de 13 casos (23,1%) positivos por *Campylobacter* se encontraron leucocitos y en 2 (15,3%) se demostró la presencia de sangre oculta. Se concluye que el hallazgo de moco y sangre macro- y/o microscópicos no es un buen parámetro para decidir el cultivo por esta bacteria. En 8 casos *Cryptosporidium*-positivo no se encontraron elementos celulares ni sangre.

SUMMARY

200 children with diarrhea aged less than 2 years were studied in order to determine macroscopic and microscopic features of their feces, including leukocytes, red blood cells (in Giemsa-stained smears and in saline suspensions), and occult blood by the bencidine test. The findings are correlated with the presence of rotavirus and *Campylobacter* in the feces. In 6 of 68 (8.8%) rotavirus-positive samples leukocytes were present and in 2 (2.9%) occult blood. Previous studies have demonstrated an absence of these cells in rotavirus diarrhea, so their presence suggest mixed infection. In 3 of 13 cases (23.1%) positive for *Campylobacter* leukocytes were found, and in 2 (15.3%) occult blood was demonstrated. It is concluded that the finding of mucus and blood (macro-and/or microscopically) does not constitute a good parameter to decide whether or not to culture for *Campylobacter*. The feces of 8 *Cryptosporidium*-positive cases were devoid of blood or cells.

INTRODUCCION

La enfermedad diarreica ha sido reconocida como uno de los principales problemas de salud pública por su alta morbilidad y letalidad, especialmente en niños (17).

Estudios previos realizados en el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) en pacientes del Hospital Nacional de Niños y del área rural de Puriscal, han demostrado que en Costa Rica los rotavirus y el *Campylobacter fetus jejuni* y *Cryptosporidium* sp. figuran entre los agentes más comunes en la diarrea del niño menor de dos años de edad (7, 8, 15).

Instituto de Investigaciones en Salud (INISA)
Universidad de Costa Rica
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Recientemente se ha dado cierta importancia al examen citoscópico de las heces diarreicas por su potencial

ayuda en el diagnóstico presuntivo de ciertas etiologías de la diarrea (5, 11, 12, 16). Tal examen podría ser de interés en servicios de emergencias de hospitales, en que diariamente se atiende un número considerable de niños con diarrea aguda.

El objetivo del presente estudio fue evaluar las características macroscópicas y microscópicas (leucocitos y eritrocitos) y la presencia de sangre oculta de heces de niños con diarrea aguda para correlacionar los hallazgos obtenidos con la presencia de rotavirus, *Campylobacter fetus jejuni*, y *Cryptosporidium* sp.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron las heces diarreicas de 200 niños menores de 2 años de edad, atendidos en el Servicio de Emergencias del Hospital Nacional de Niños entre abril y diciembre de 1982. De cada paciente se recogió una muestra de heces en un frasco estéril, para estudiar la presencia de células, sangre oculta, rotavirus, *Campylobacter fetus jejuni*, y *Cryptosporidium* sp.

El análisis coprocitológico se realizó mediante observación a fresco de suspensiones fecales, tanto en solución salina como lugol.

Además se prepararon frotis delgados de heces sobre portaobjetos desengrasados y limpios, que fueron fijados con metanol por 3 minutos, y luego teñidos con colorante Giemsa durante 30 minutos. Las preparaciones se realizaron preferencialmente con aquellas porciones de muestra que contenían moco y/o sangre. Las laminillas se examinaron al microscopio con el objetivo de inmersión en busca de *Cryptosporidium* sp. y de leucocitos y glóbulos rojos.

Para investigar la presencia de rotavirus se hizo un ELISA de "doble sandwich" (7). Brevemente, el método consistió de recubrimiento de bandejas Microtiter de polivinilo con suero de cabra anti-rotavirus; seguidamente se añadió la muestra (suspensión al 10-20⁰/o); luego se reaccionó con antisuero de cobayo anti-rotavirus; y por último se añadió suero de cabra anti-cobayo conjugado a fosfatasa alcalina. Los pocillos rotavirus-positivos produjeron un color amarillo intenso.

Para el aislamiento de *Campylobacter fetus jejuni*, cada muestra de heces se inoculó en agar Skirrow que contenía base de agar Brucella (BBL), sangre lisada de caballo al 7⁰/o y vancomicina (10 ug/ml), polimixina B (2,5 U.I./ml) y trimetoprin (5 ug/ml). Los platos se incubaron a 42⁰C durante 48 horas, en jarras de anaerobiosis Don Whitley, utilizando el sistema de evacuación y reemplazo con 90⁰/o de N₂ y 10⁰/o de CO₂. La confirmación de colonias sospechosas se realizó mediante pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa, reducción de nitratos, y fermentación de carbohidratos), y observación de movilidad característica tipo "dar-

do" en el examen de gota pendiente (1, 7, 15).

Para el estudio de sangre oculta en heces se realizó la prueba de bencidina en tubo, en un período no mayor de dos horas de evacuada la muestra (14).

RESULTADOS

En 68 (34⁰/o) de los niños estudiados se diagnosticó rotavirus, en 13 (6,5⁰/o) *Campylobacter fetus jejuni* y en 8 (4,0) *Cryptosporidium* sp. (Cuadro 1). En ningún paciente se detectó infección simultánea por los 3 agentes estudiados.

La observación microscópica de las muestras de heces a fresco y en lugol permitió diagnosticar la presencia de leucocitos y glóbulos rojos, que fueron confirmados en el examen de los frotis teñidos con Giemsa en que se diferenciaron fácilmente de células epiteliales, protozoarios y detritos celulares presentes en la materia fecal. En general, los glóbulos rojos se tiñeron débilmente con la coloración de Giemsa, y en algunas ocasiones se alteró su morfología, pero pudieron ser reconocidos.

En los casos en que había presencia de exudado inflamatorio abundante, éste se observó con el objetivo de bajo poder, con el que se apreciaban múltiples células que se identificaron fácilmente como polimorfonucleares con el objetivo de inmersión, principalmente por su tamaño y núcleo característico, aunque en algunos casos aparecían dañados.

En 6 (8, 8⁰/o) de 68 muestras positivas por rotavirus se encontraron leucocitos, y en 2 casos (2,9⁰/o), sangre oculta (Cuadro 2). En 3 de 13 casos (23,1⁰/o) positivos por *Campylobacter fetus jejuni* se encontraron leucocitos y en 2 (15,3⁰/o) se demostró la presencia de sangre oculta (Cuadro 2). En ninguno de los 8 casos *Cryptosporidium*-

Cuadro 1

ROTAVIRUS Y CAMPYLOBACTER FETUS JEJUNI EN 200 NIÑOS CON DIARREA AGUDA, SERVICIOS DE EMERGENCIAS, HOSPITAL NACIONAL DE NIÑOS, 1982

Agente	Número de casos (°/o)
Rotavirus	68 (34,0)
<i>Campylobacter fetus jejuni</i>	13 (6,5)
<i>Cryptosporidium</i> sp.	8 (4,0)
Sin rotavirus ni <i>Campylobacter</i> ni <i>Cryptosporidium</i> *	111 (55,5)

* No se investigó *Shigella*, *Salmonella*, ni *Escherichia coli* (E.CEP, ECET, ECEI).

Cuadro 2

**CARACTERISTICAS DE LAS HECES DIARREICAS DE 200 NIÑOS
SERVICIO DE EMERGENCIAS HOSPITAL NACIONAL DE NIÑOS, 1982**

	Rotavirus N=68	<i>Campylobacter</i> N=13	<i>Cryptosporidium</i> N=8	Sin rotavirus, ni <i>Campylobacter</i> , ni <i>Cryptosporidium</i> N=111
Moco macroscópico	27 (39,7)*	7 (53,8)	5 (62,5)	58 (52,2)
Sangre macroscópica	1 (1,4)	1 (7,7)	0	3 (2,7)
Leucocitos	6 (8,8)	3 (23,1)	0	16 (14,4)
Eritrocitos	1 (1,4)	2 (15,4)	0	7 (6,3)
Macrófagos	0	0	0	5 (4,5)**
Sangre oculta (bencidina)	2 (2,9)	2 (15,4)	0	17 (15,3)

* Número (porcentaje)

** Probablemente shigelosis

positivo se encontraron elementos celulares o sangre. Además se encontraron leucocitos en 16 de 111 muestras (14,4^o/o) negativas por rotavirus, *Campylobacter* y *Cryptosporidium*. En 17 de estos casos (15,3^o/o) se demostró la presencia de sangre oculta (Cuadro 2).

La prueba de bencidina confirmó la presencia de sangre en los casos en que se observaron glóbulos rojos a fresco o en tinción, y además se detectó sangre en 11 casos en que no se observaron eritrocitos microscópicamente.

Únicamente en el 25,8^o/o de las muestras que presentaban moco macroscópico se observaron leucocitos al examen microscópico.

DISCUSION

Varios estudios han sugerido que la presencia de leucocitos y eritrocitos en heces está relacionada con algún tipo de lesión en la mucosa intestinal (5, 11, 12). Esto se ha observado principalmente en pacientes que sufren infecciones por agentes enteroinvasores que lesionan la mucosa intestinal. Entre éstos se ha incriminado a bacterias como *Shigella* (5, 10, 12), *Salmonella* (5, 16), *Escherichia coli* enteroinvasora (3), y algunos protozoarios y helmintos (4).

Por el contrario, en diarreas causadas por bacterias toxigénicas o por rotavirus no se demuestran leucocitos ni glóbulos rojos en heces, posiblemente debido a que los me-

canismos patogénicos de estos agentes no implican lesiones profundas de la mucosa intestinal (3, 9).

En la diarrea por *Campylobacter fetus jejuni* se ha descrito el hallazgo de leucocitos en el 8,5^o/o de los casos en pacientes menores de dos años de edad (2), mientras que algunos informes describen la presencia de este tipo de células hasta el 70^o/o de los casos (6). En el presente estudio se encontraron leucocitos en 3 de 13 casos (23,1^o/o) positivos por *Campylobacter*, y en 2 de ellos (15,3^o/o) se demostró la presencia de sangre oculta, por lo que se demuestra que el hallazgo de moco y sangre macro- y/o microscópicos no es un buen parámetro para definir si una muestra debe ser cultivada por esta bacteria.

En 6 de 68 muestras (8,8^o/o) positivas por rotavirus se encontraron leucocitos y en dos de estos casos (2,9^o/o) sangre oculta. Sin embargo, en este estudio no se investigó la presencia de otros enteropatógenos, por lo que no se puede descartar la posibilidad de infecciones mixtas con otros agentes invasores que podrían ser responsables de la presencia de tales elementos en las heces. Un estudio previo realizado por el INISA en colaboración con el Hospital Nacional de Niños demostró que el 8,8^o/o de enfermedad diarreica aguda presentaron infecciones mixtas, en las que el rotavirus era uno de los agentes diagnosticados (7).

Los casos negativos por *Campylobacter*, rotavirus y *Cryptosporidium* sp. que presentaron leucocitos y glóbulos rojos sugieren la presencia de otros agentes enteroinvasores

capaces de lesionar la mucosa intestinal.

Se concluye que el hallazgo de leucocitos y/o glóbulos rojos en las heces evidencia la presencia de un agente enteroinvasor, pero que la presencia de estos elementos no es indicativa de un agente en particular (e.g., *Campylobacter*) y que además pueden ocurrir infecciones leves por *Campylobacter* en que tales elementos celulares no son detectados.

En 8 casos *Cryptosporidium*-positivo no se encontraron elementos celulares ni sangre, lo que sugiere que no hay daño profundo en el intestino infectado por este coccidio.

REFERENCIAS

- 1.— Butzler, J.P.; Skirrow, M.B.: *Campylobacter* enteritis. Acta Paediatr. Belg. 1979, 32: 89-94.
- 2.— Communicable Disease Surveillance Centre (Scotland). *Campylobacter* infections in Britain 1977. Brit. Med. J. 1978, 1:1357.
- 3.— Dupont, H.L.; Forman, S.B.; Hornick, R.B.; Snyder, M.J.; Libonati, J.P.; Sheahan, D.G.; LaBrec, E.H.; Kalas, J.P.: Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. N. Engl. J. Med. 1971, 285: 1-9.
- 4.— Faust, E.C.; Russell, P.F.; Jung, R.C.: Parasitología Clínica. Salvat Editores, S.A., Barcelona, 1979, p. 139-148, 246-247, 289-291.
- 5.— Harris, J.C.; DuPont, H.L. & Hornick, R.B. Fecal leucocytes in diarrheal illness. Ann. Intern. Med. 1972, 76: 607-703.
- 6.— Lambert, M.E.; Schofield, D.I.; Ironside, A.G.; Mandal, B.K.: *Campylobacter* colitis. Brit. Med. J. 1979, 1:857-859.
- 7.— Mata, L., Simhon, A.; Padilla, R.; Gamboa, M.M.; Vargas, G.; Hernández, F.; Mohs, E.V.; Lizano, C.: Diarrhea associated with rotaviruses, enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Campylobacter* and other agents in Costa Rican children, 1976-1981. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1983, 32: 146-153.
- 8.— Mata, L.; Bolaños, H.; Pizarro, D.; Vives, M.: Cryptosporidiosis in children from some highland Costa Rican rural and urban areas. Am. J. Trop. Med Hyg. 1984, 33: 24-29.
- 9.— Mebus, C.A.; Wyatt, R.G., Kapikian, A.Z.: Intestinal lesions in gnotobiotic calves by the virus of human infantile gastroenteritis. Vet. Pahol. 1977, 14: 273-282.
- 10.— Nelson, J.D.; Haltalin, K.C.: Accuracy of diagnosis of bacterial diarrheal disease by clinical features. J. Pediatr. 1971, 78:519-522.
- 11.— Pickering, L.K.; DuPont, H.L.; Olarte, J.; Conklin, R.; Erickson, C.: Fecal leucocytes in enteric infections. Am. J. Clin. Pathol. 1977, 68: 562-565.
- 12.— Pierce, J.E.; DuPont, H.J.; Lewis, K.R.: Acute diarrhea in a residential institution for the retarded. Usefulness of fecal leucocyte examination. Am. J. Dis. Child. 1974, 128:772-775.
- 13.— Tallet, S.: Clinical, Laboratory and epidemiological features of viral gastroenteritis in infants and children. Pediatrics, 1978, 60: 217-222.
- 14.— Tietz, N.W. Química Clínica Tietz. Editorial Interamericana, Barcelona, España. 1972, p. 289.
- 15.— Vives, M.; Mata, L.; Castro, B.; Simhon, A.; Jiménez, P.: Estudio de Puriscal V. Infección entérica en niños menores de 2 años. Rev. Med. Hosp. Nal. Niños (Costa Rica), 1982, 17: 57-70.
- 16.— Wolf, H.L.: The fecal smear in the therapy of diarrheas. Trop. Geogr. Med. 1969, 21: 427-435.
- 17.— W.H.O. Scientific working group reports, 1978-1980. W.H.O. Geneva, 1980.