

Hallazgo de Protozoarios en Pacientes Infeccionados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

Laura Hernández Alvarado*, Nury Mora Brenes*, Abigail Porras*

Antecedentes y objetivos: El síndrome de inmunodeficiencia humana (sida) es causado por los retrovirus de inmunodeficiencia humana (VIH) 1 y 2. Estos virus depletan en forma selectiva y progresiva los linfocitos T CD4+ ayudadores; cuando el nivel de estos alcanza un punto crítico (200 células/mm³) el paciente se vuelve susceptible a sufrir infecciones por agentes oportunistas. Dentro de los agentes oportunistas que pueden causar diarrea en estos pacientes se encuentran *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica*. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de parásitos en una población VIH seropositiva y un grupo control VIH seronegativo.

Métodos: Entre agosto de 1996 y febrero de 1997 se analizaron 1541 muestras de heces de pacientes que acudieron al laboratorio clínico del Hospital San Juan de Dios, de estas 1416 muestras fueron de pacientes VIH seronegativos y 125 de pacientes VIH positivos. Las muestras de heces se procesaron por tres métodos: con solución salina al 0,85%, con solución de Lugol y con solución de Kato. Se compararon los métodos de concentración por flotación con NaCl (25%) y con Sacarosa (33%). Se realizaron 2 frotis, se dejaron secar, se fijaron con metanol y se tiñeron por dos métodos: (1) Koster y (2) Ziehl-Neelsen modificado. A los pacientes VIH positivos se les realizó un conteo de linfocitos T CD4+ y CD8+ en sangre periférica por citometría de flujo, utilizando un citómetro de Facs Scan de Becton Dickinson.

Resultados: De las 1416 muestras de pacientes seronegativos analizadas, en 4,38% se encontró alguno de los 3 parásitos estudiados; 2,8% de las muestras fueron positivas para *E. histolytica* y 1,6% para *G. intestinalis*. En ninguna de las muestras analizadas de pacientes VIH negativos se encontró *C. parvum*. De las 125 muestras de pacientes VIH positivos, 31,2% fueron positivas por parásitos. *Entamoeba histolytica* se encontró en un 4,8% de las muestras, el promedio de linfocitos T CD4+ en estos pacientes fue de 347 linfocitos/mm³. *Giardia intestinalis* se encontró en un 8,0% de las muestras de pacientes VIH+, en este grupo el promedio de linfocitos T CD4+ fue de 185 linfocitos/mm³. *Cryptosporidium parvum* se encontró en un 4,8% de los casos seropositivos, y en estos pacientes el promedio linfocitos T CD4+ fue de tan solo 13 linfocitos/mm³. Un 13,2% de las muestras tenían protozoarios no patógenos. La correlación entre la presencia de *C. parvum* y un conteo de menos de 200 linfocitos T CD4+/mm³ fue significativa ($p < 0,005$) en la prueba estadística de Chi Cuadrado (χ^2).

Conclusión: La población estudiada de pacientes VIH positivos presentó una mayor incidencia de parásitos en los exámenes de heces que el grupo control. La presencia de *C. parvum* se observó únicamente cuando existía inmunosupresión profunda. Este parásito se encontró sólo en pacientes con sida con conteos de linfocitos CD4+ inferiores a 50 células/mm³. La mejor observación microscópica de *C. parvum* se obtuvo con el empleo de una combinación del método de Shearer para concentrar y el método Ziehl-Neelsen modificado para teñir.

Descriptores: Sida, *Cryptosporidium*, linfocitos TCD4+, VIH.

Abreviaturas: Sida: síndrome de inmunodeficiencia adquirida; VIH: virus de inmunodeficiencia humana; HSJD: Hospital San Juan de Dios.

* Laboratorio Clínico, Hospital San Juan de Dios. Distrito Merced, San José, Costa Rica.

Correspondencia: Laura Hernández Alvarado, Apartado 137-1000 San José, Costa Rica.

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (sida) constituye el estadio final de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), esta infección puede ser causada por los retrovirus VIH 1 y 2, estos producen una depleción específica y progresiva de los linfocitos T CD4+, generando un estado de inmunosupresión en el individuo.¹ Este es aprovechado por microorganismos oportunistas para causar diferentes infecciones, algunas de las más frecuentes son las diarreas. Entre

los agentes oportunistas causantes de diarrea en los pacientes inmunosuprimidos sobresalen *Cryptosporidium parvum* y *Giardia intestinalis*.²

La enfermedad diarreica, tanto aguda como crónica, constituye uno de los principales problemas de las personas con sida, no sólo por ser una de las manifestaciones más frecuentes de la enfermedad, sino que es causa importante de desnutrición y síndrome de desgaste y puede llevar al paciente a la muerte.^{2,3} Dentro de los principales agentes etiológicos de las infecciones diarreicas en estos pacientes se encuentran: *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis*, Microsporidios, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Strongyloides stercoralis*.^{4,7}

Cryptosporidium parvum es un coccidio con distribución mundial, infecta células epiteliales del intestino y tracto respiratorio,⁵ e induce un cuadro diarreico autolimitado de unos 20 a 30 días de duración. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos puede causar una diarrea persistente y severa, que puede llevar a una importante pérdida de peso, deshidratación y muerte.⁶ Existe evidencia convincente de que la infección con el VIH predispone al individuo a una intensa manifestación clínica de cryptosporidiosis.⁷ El diagnóstico se hace por la observación de los ooquistes, ya sea "al fresco" entre lámina y laminilla o en frotis teñidos. La frecuencia con la cual se encuentran los ooquistes está relacionada con el conteo de linfocitos T CD4⁺, usualmente se manifiesta más en pacientes con conteo inferior a 100 células/mm³ y presencia de síntomas gastrointestinales.⁴

Entamoeba histolytica es un protozoario intestinal, agente causal de la amibiasis humana. Se considera que unos 500 millones de personas en el mundo pueden estar infectadas.⁸ Actualmente se estima que la amibiasis es responsable de 50 000 a 100 000 muertes anualmente en todo el mundo, siendo superada solamente por la malaria y esquistosomiasis como causa de muerte por parásitos.⁹ La respuesta inmune en caso de *Entamoeba histolytica* es dada por una serie de eventos, los cuales sugieren que la inmunidad mediada por células es importante en la defensa del huésped contra este parásito. Una disminución de las células T CD4⁺, como ocurre en el sida, retarda el desarrollo de la inmunidad celular específica contra este parásito, debido a la falta de activación de los macrófagos por células T ayudadoras.⁹

Giardia intestinalis, es un parásito intestinal con distribución mundial, se presenta principalmente en niños, ancianos y personas inmunosupresas. El agua contaminada ha sido considerada la principal fuente de infección.¹⁰ Es uno de los parásitos más frecuentes en muestras de heces y una causa muy común de diarrea en humanos y animales.¹¹ Actualmente es considerado como uno de los agentes más importantes productores de diarrea en pacientes infectados con el VIH.^{2,7} Es conocido que el ser humano desarrolla una inmunidad específica

protectora contra la giardiasis, por lo que un primer contacto confiere cierta resistencia contra la reinfección. Sin embargo cuando hay algún problema inmune como la hipogammaglobulinemia existe una mayor prevalencia de la giardiasis, esto demuestra la importancia de la inmunidad por anticuerpos en este caso, pero además la observación de una alta prevalencia de este agente en homosexuales con defectos de células T, sugiere que la inmunidad celular juega un papel muy importante en esta infección.^{7,11}

El presente trabajo buscó determinar la presencia de algunos protozoarios intestinales asociados con diarrea, en pacientes infectados con el virus de VIH y en una población control VIH negativa. Además se analizó la relación entre el conteo de linfocitos T CD4⁺ y la infección por *Cryptosporidium parvum*.

Materiales y Métodos

En el laboratorio clínico del Hospital San Juan de Dios (HSJD) se analizaron 1541 muestras de heces, de estas 125 muestras provenían de pacientes VIH seropositivos los cuales fueron referidos desde diferentes centros hospitalarios del país hacia el laboratorio de citometría de flujo del HSJD. A cada uno de estos pacientes el día que se les dio la cita se les pidió una muestra de heces para este estudio, por lo tanto se tomaron en cuenta los casos de aquellos pacientes que voluntariamente llevaron la muestra. Las otras 1416 fueron las muestras de rutina analizadas en el servicio de Parasitología del HSJD entre agosto de 1996 y febrero 1997 y que pertenecían a individuos VIH seronegativos. Cada muestra de heces se analizó con solución salina al 0,85% y lugol doble. Se utilizó la técnica de Kato, para observación de huevecillos de helmintos. Para el análisis de las muestras de los pacientes VIH positivos y los VIH negativos con diarrea o sospechoso de *Cryptosporidium parvum* se realizaron dos métodos de concentración, uno de flotación con NaCl al 25% (Willis y Malloy) y un Scheerer (solución de azúcar al 33%). Se realizaron dos frotis a partir de cada concentración, las extensiones se dejaron secar al aire, se fijaron con metanol durante 10 minutos y se tñieron con Koster y Ziehl-Neelsen modificado. Cuando en el examen "a fresco" se observaron leucocitos las muestras fueron cultivadas, para buscar algún agente enteropatógeno. Además, se hizo tinción de Gram modificado para buscar *Campylobacter* sp y bacterias similares a *Treponema*.

A los 125 pacientes seropositivos por VIH se les realizó concomitantemente un conteo de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ por medio de la técnica de citometría de flujo, utilizando un Facs Scan de Becton Dickinson.

Se aplicó además la prueba estadística de Chi-cuadrado en una tabla de contingencia de 2 x 2 con una p<0,005, para determinar la asociación entre tener un conteo de linfocitos TCD4⁺ menor a 200 cel/mm³ y la infección por *Cryptosporidium parvum*.

Cuadro 1
Total de muestras analizadas

Pacientes	Positivas	Negativas	Total
VIH +	39 (31,2%)	86 (68,8%)	125
VIH -	62 (4,4%)	1354 (95,6%)	1416
Total	101	1440	1541

Fuente: Sección de Parasitología, Laboratorio Clínico Hospital San Juan de Dios. Agosto de 1996 a Febrero de 1997

Resultados

En el 31,2% de las muestras analizadas de pacientes VIH positivos se observaron parásitos (Cuadro 1). En 10 muestras (8%) se observó *Giardia intestinalis*, de éstas, 6 presentaban por lo menos otro protozoario no patógeno. En estos pacientes los conteos de linfocitos T CD4⁺ oscilaban entre 2 y 736 con un promedio de 185 células/mm³ (Cuadro 2). En 6 muestras (4,8%) se observó *Entamoeba histolytica* y 4 de ellas presentaron también otros protozoarios no patógenos. Los conteos de linfocitos T CD4⁺ en estos pacientes oscilaban entre 162 y 936 con un promedio de 347 células/mm³ (Cuadro 2).

Cryptosporidium parvum fue hallado en 6 muestras diarreicas de pacientes VIH positivos (4,8%), 2 de ellas observadas "al fresco"; luego al hacer frotis y tinción de Ziehl-Neelsen modificado se pudieron detectar 2 casos más con este protozoario. Otros 2 casos fueron observados después de realizar métodos de concentración y tinciones de Koster y Ziehl-Neelsen modificado. Estas muestras no eran diarreicas. En éstas muestras no se observaron otros agentes como: protozoarios patógenos, helmintos, *Campylobacter sp.*, *Treponema*. Es decir, *Cryptosporidium parvum* fue el único parásito encontrado en ellas, los conteos de linfocitos T CD4⁺ de estos casos estuvieron entre 0,5 y 53 células/mm³ con un promedio de 13 células/mm³ (Cuadro 2).

Cuadro 2
Patógenos encontrados según el
conteo de linfocitos T CD4⁺

Patógeno	CD4 > 200 cel/mm ³	CD4 > 200 cel/mm ³
<i>E. histolytica</i>	2	4
<i>G. intestinalis</i>	8	2
<i>C. parvum</i>	6	0

Fuente: Sección de Hematología, Laboratorio Clínico, Hospital San Juan de Dios.

En el período en estudio se analizaron en el laboratorio clínico 1416 muestras de heces provenientes de pacientes VIH negativos (Cuadro 1). En ninguna de estas muestras se encontró *Cryptosporidium parvum*, a estas muestras no se les realizó ninguna técnica de concentración especial ni de tinción. En 4,38% de estos casos sí se encontraron otros protozoarios patógenos (Cuadro 3).

Cuadro 3
Muestras analizadas en pacientes VIH negativos

Patógeno	Muestras positivas	Muestras negativas
<i>E. histolytica</i>	39 (2,8%)	1377 (97,2%)
<i>G. intestinalis</i>	23 (1,6%)	1393 (98,4%)
<i>C. parvum</i>	0 (0%)	1416 (100%)

Fuente: Sección de Parasitología, Laboratorio Clínico, Hospital San Juan de Dios. Agosto de 1996 a Febrero de 1997.

La relación entre la presencia de *Cryptosporidium parvum* y un conteo de linfocitos T CD4⁺ fue estadísticamente significativa ($p < 0.005$). Luego de analizar las muestras concentradas por medio de la técnica de Schearer (azúcar al 33%), los ooquistes de *Cryptosporidium parvum* se observaron mejor que cuando estas muestras fueron concentradas con la técnica de Willis y Malloy (solución salina al 25%). Por otra parte, al observar las muestras con la tinción de Ziehl-Neelsen modificado se pudo ver una mejor morfología del ooquiste que con la tinción de Koster.

Discusión

Dentro de los cuadros clínicos que pueden presentarse en pacientes infectados por VIH se encuentran las enfermedades diarreicas.² Cuando los conteos de linfocitos T CD4⁺ se encuentran entre 200-700 cel/mm³, muchos agentes patógenos pueden presentarse como productores de diarrea, entre ellos bacterias y protozoarios patógenos. Sin embargo, cuando el paciente llega al estadio de sida y el número de linfocitos T CD4⁺ es inferior a 200 cel/mm³, aumenta el riesgo de sufrir enfermedad diarreica por agentes oportunistas como puede ser la criptosporidiosis, la cual en si es una enfermedad definitiva de sida.¹²

En el presente estudio, *Cryptosporidium parvum* fue observado en 6 muestras (4,8%), porcentaje ligeramente menor que el reportado por Gutiérrez y col. (7,4% de positividad por este patógeno),¹³ sin embargo es importante señalar que número de casos es muy diferente en ambos estudios. Dos de las muestras en las que se encontró *C. parvum* en este estudio provenían de pacientes asintomáticos, estas eran sólidas y el número de

ooquistes observado fue mucho menor que el hallado en las 4 muestras diarreas, de hecho en las dos muestras sólidas no fue posible identificar los ooquistes al fresco, sino que sólo se pudieron observar luego de utilizar métodos de concentración.^{4,14}

Los conteos de linfocitos T CD4⁺ en los pacientes con este coccidio fueron inferiores a 200 células/mm³ en todos los casos, cifra establecida por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) como parámetro para definir un caso de sida en un individuo infectado por el VIH que hasta ese momento no ha sufrido ninguna de las enfermedades definitorias de sida. Lo anterior se debe a que un conteo en ese nivel se asocia en forma directa con alto riesgo de sufrir infecciones oportunistas.¹

De acuerdo con Flanigan y col.,¹⁵ el conteo de linfocitos T CD4⁺ es el mejor parámetro para definir la habilidad del sistema inmune para eliminar la infección por *Cryptosporidium parvum*. Según estos investigadores, las personas con conteos de 180 cel/mm³ o más, pueden eliminar la infección espontáneamente, mientras que conteos inferiores correlacionan con una diarrea persistente y severa.¹⁵ Los resultados del presente estudio concuerdan con esta observación, al encontrarse que todos los pacientes en los que se observó el parásito correspondían a casos de sida con conteos de células T CD4⁺ muy bajos, inferiores a 60 en todos los casos, reflejando un estadio avanzado de la enfermedad con inmunosupresión profunda.

En este trabajo, el mejor método encontrado para la observación de ooquistes de *Cryptosporidium parvum* fue la flotación con azúcar al 33% (Scheerer), la cual incrementa la detección debido a la concentración de los ooquistes³ y la tinción de Ziehl-Neelsen modificado. Esto último, concuerda con lo reportado por MacPherson, quien sugiere que la técnica de Ziehl-Neelsen modificado podría ser integrada al trabajo diario en el laboratorio de parasitología.¹⁶ Algunas de las ventajas mencionadas son: su costo relativamente bajo, su rapidez, el hecho de poder coleccionar las láminas y la posibilidad de conservación de una buena morfología.¹⁶ Por otra parte, Peters y col., manifiestan que debido al incremento en la importancia de este coccidio como patógeno en los pacientes con sida y el riesgo que ello implica, la tinción de ácido resistencia debe hacerse rutinariamente.¹⁷ De la misma manera García y col., califican como de buena a excelente la calidad con que se observa la morfología de los ooquistes utilizando la flotación con azúcar y la tinción de Ziehl-Neelsen modificado.¹⁸

Los pacientes VIH negativos eran tanto pacientes hospitalizados como de consulta externa y de diferentes partes del país, por lo cual se puede considerar representativo de la población atendida. La única limitación del resultado podría estar en el procesamiento de las muestras negativas, las cuales siguieron todo el proceso excepto los métodos de concentración y tinción de Koster y Ziehl-Neelsen modificado. Estos métodos fueron llevados a cabo solo en aquellos casos de muestras diarreas o sospecha de infección por *Cryptosporidium*. Esta situación

pudo haber causado que muestras de pacientes VIH seronegativos con baja concentración de ooquistes no fueran detectados.

Agradecimientos

A la Dra. Ivette Argüello y a Carlos Sánchez de la sección de Hematología del Hospital San Juan de Dios y al personal de las secciones de Bacteriología y Parasitología del Laboratorio Clínico Hospital San Juan de Dios.

Abstract

Background and aims: The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is caused by the human retrovirus (VIH) 1 and 2. These virus selectively and progressively deplete the CD4⁺ helper T lymphocytes; when the level of these cells reaches a critical point (200 cells/mm³) the patients becomes susceptible to infections by opportunistic agents. Among the opportunistic agents that can cause diarrhea are *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica*. The aim of the present work was to determine the presence of parasites in the stools of an VIH seropositive population and an VIH seronegative population.

Methods: A total of 1541 stool samples were analyzed between August 1996 and February 1997, from patients attending the Clinical Laboratory of the San Juan de Dios Hospital in Costa Rica. From these samples 1416 were from VIH seronegatives patients and 125 from VIH seropositive patients. The stool samples were processed by three methods: direct, with Lugol solution and with Kato solution. Two methods of stool concentration were used, by flotation with NaCl (25%) and with Sacarose (33%). Two smears were performed, which were allowed to dry at air, fixed with methanol and stained by the methods of Koster and modified Ziehl-Neelsen. To all VIH positive patients a lymphocyte counting, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were analysed by flow cytometry on blood samples using a FACS Scan from Becton Dickinson and the results were correlated with the parasites found on stool.

Results: Of the 1416 samples studied from VIH seronegative patients, in 4,38% one of the three parasites under study was found; 2,8% of the samples were positive for *E. histolytica* and 1,6% for *G. intestinalis*. In any of the samples studied from VIH negative patients *C. parvum* was found. Of the 125 samples from VIH positive patients, 31,2 were positive for parasites. *E. histolytica* was found in 4,8% of the samples, the mean CD4⁺ T cell count was of 347 linfocitos/mm³. *Giardia intestinalis* was found in 8,0% of the samples from VIH+ patients, in this group the mean CD4⁺ T cell count was of 185 cells/mm³. *C. parvum* was found in 4,8% of the seropositive patients, and their mean CD4⁺ T cell count was of 13 cells/mm³. In 13,2% of the samples the parasites found were non-pathogenic protozoa. The correlations between the presence of *C. parvum* and a CD4⁺ T cell count under 200 cells/mm³ was significant (p<0,005) by Chi square⁽²⁾

Conclusions: The VIH positive population studied had a higher incidence of parasites in the stool samples than the control VIH negative group. The presence of *C. parvum* was observed only when there was evidence of a profound immunosuppression characteristic of AIDS. This parasite was found only in patients with CD4⁺ T cells counts below 50 cells/mm³. The best microscopic detection of *C. parvum* was achieved with the concentration method of Shearer and the modified Ziehl-Neelsen stain.

Referencias

1. Morbidity and Mortality Weekly Report. 1993 Revised classification system for VIH infection and expanded surveillance case definition for aids among adolescents and adults. 1992. 41:1-20, CDC.
2. Goodgame, RW. Understanding intestinal spore-forming protozoa: cryptosporidia, microsporidia, isospora and cyclospora. Ann Intern Med, 1996, 124:429-441.
3. Lew, E.A., Poles, M.A., Dieterich, D.T. Diarrheal diseases associated with VIH infection. Gastroenterology clinics of North America. 1997, 26(2):259-290.
4. Smith PD, Clifford LH, Vee GJ, Manischewitz JF, Quinnan GV, Fauci AS, and Masur, H. Intestinal infection in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Annals of Internal Medicine. 1988, 108:328-333.
5. Ebrahim JG. *Cryptosporidium*- An unrecognized enteropathogen. Journal of Tropical Pediatrics. 1992, 38:98-99.
6. Davidson H y Keusch GT. Protozoal gastrointestinal infections. Current Opinion in Infectious Diseases. 1992, 5:88-98.
7. Heyworth, M.F. Parasitic diseases in immunocompromised hosts. Gastroenterology clinics of North America. 1996, 25(3):691-707.
8. Que X y Reed SL. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. Parasitology Today. 713(5): 190-194.
9. Campbell D y Chadee K. Survival of *Entamoeba histolytica*: modulation of cell mediated immune response. Parasitology Today. 1997, 13(5):184-190.
10. Jokipii L., Pohjola S, Jokipii AMM. Cryptosporidiosis associated with traveling and giardiasis. Gastroenterology. 1985, 89:838-842.
11. Faubert GM. The immune response to *Giardia*. Parasitology Today. 1996, 12(4):140-145.10.
12. Kuby J. Inmunology. 2da ed. Freeman and Company. E.U.A. 1994.
13. Gutiérrez G, Reyes L, Chinchilla M, Herrera G, Rodríguez M y Frajman M. Presencia de parásitos intestinales en pacientes VIH seropositivos. Primer informe de microsporosis humana en Costa Rica. Parasitología al Día. 1997, 21(1-2):3-6.
14. Goodgame RW, Genta RM, White AC y Chappell CL. Intensity of infection in AIDS-associated cryptosporidiosis. J Infect Dis. 1993, 167:704-709.
15. Flanigan T, Whalen C, Turner J, Soave R, Toerner J, Havlir D y Kotler D. *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. Ann Intern Med. 1992, 116(10):840-842.
16. MacPherson DW. Cryptosporidiosis: Multiattribute evaluation of six diagnostic methods. J Clin Microbiol. 1993, 31(2):98-202.
17. Peters CS, Sable R, Janda WM, Chittom ALy Kocka FE. Prevalence of enteric parasites in homosexual patients attending an outpatient clinic. J Clin Microbiol. 1986, 24(4):684-685.
18. García LS, Bruckner DA, Brewer TC y Robyn. Techniques for the recovery and identification *Cryptosporidium* oocysts from stool specimen. J Clin Microbiol. 1983, 18:185-190.