

IDENTIFICACION MOLECULAR DE LAS ESPECIES DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. EN MUESTRAS DIARREICAS DE NIÑOS MENORES DE CINCO AÑOS, PANAMA 2008.

Vanessa Pineda, Ana María Santamaría, José E. Calzada, Azael Saldaña
 Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES)

INTRODUCCION

Cryptosporidium spp. es un protozooario parásito intestinal intracelular, descrito como patógeno humano en 1976; actualmente es reconocido como uno de los principales causantes de infección gastrointestinal y diarreas alrededor del mundo. (Xiao-Ming C., 2002; Botero D., 1998; Mosier D., 2000) La infección con *Cryptosporidium* spp. se transmite generalmente por la ingesta de ooquistes presentes en aguas, alimentos, superficies mediaambientales o entre animales o personas infectadas. La infección se presenta en individuos de todas las edades, pero con mayor frecuencia en niños menores de 5 años y en individuos inmunocomprometidos (Ledesma, 2005; Carpenter, 1999). La identificación de las especies de este género, basadas en técnicas como la microscopía/morfometría es poco fiable. Esto hace necesario el uso de técnicas moleculares como el PCR que son más sensibles y específicas, permitiendo identificar especies e incluso genotipos. Esta metodología molecular ha confirmado la presencia de más de veinte especies y un gran número de genotipos. En el ser humano, las más frecuentes son: *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. canis* y *C. felis*. (Xiao y col, 1999, 2004)

Son muy pocos los estudios realizados en Panamá sobre la criptosporidiosis humana y hasta donde conocemos no se han realizado trabajos orientados a la identificación de las especies que circulan en nuestro medio. La definición taxonómica de las especies de *Cryptosporidium* spp. así como los estudios sobre su diversidad genética son muy importantes en la elaboración de los programas de prevención, manejo y control de esta infección parasitaria.

OBJETIVO

- Identificar mediante análisis de PCR anidado (gen SSU rRNA) la presencia y especies de *Cryptosporidium* spp. vinculadas con episodios de diarreas en niños menores de cinco años de la provincia de Panamá.

METODOLOGIA

Se colectaron 354 muestras de heces diarreicas de niños menores de cinco años, que fueron remitidas por la Policlínica Dr. Santiago Barraza (Chorrera), Hospital del Niño y Hospital Regional de Chepo entre los meses de abril 2006 a diciembre de 2007. Las muestras diarreicas de cada paciente se distribuyeron en dos microtubos, la primera se mezcló con un volumen igual de formalina al 10% y la segunda se congeló a -20°C. Las muestras congeladas fueron transportadas al ICGES donde se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento, mientras que las muestras preservadas con formalina al 10% se almacenaron a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron empleando un kit comercial de ELISA de captura para coproantígenos de *Cryptosporidium* spp. (Ridascreen C1201) y mediante la coloración permanente de Ziehl-Neelsen modificada. Aquellas que presentaban ooquistes de *Cryptosporidium* se les extrajo el ADN total empleando el kit comercial QIAamp DNA stool kit (QIAGEN). La presencia e identificación de las especies de *Cryptosporidium* spp. fue analizada mediante un PCR-RFLP siguiendo los procedimientos descritos por Xiao y cols. 2006.

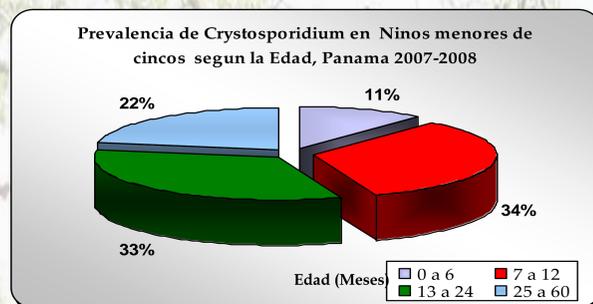


Figura 1: En la provincia de Panamá (Chorrera, Chepo y Panamá Metro) se estableció la colecta de muestras diarreicas en niños menores de cinco años. Se evaluó la presencia de *Cryptosporidium* spp. empleando las técnicas de ELISA de captura de coproantígeno, tinción modificada de Ziehl - Neelsen y PCR-RFLP.

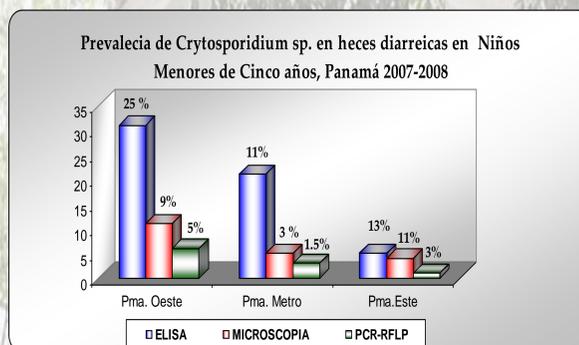
RESULTADOS

De las 354 muestras diarreicas estudiadas el 53.8% provenían de niños y el 46.1% de niñas menores de cinco años. Todas las muestras de heces diarreicas fueron analizadas mediante un ELISA de captura de coproantígenos para *Cryptosporidium* spp. Se encontró una prevalencia de 16.2% (57/354), con predominio en las edades de 1-2 años (Gráfica 1). Las muestras positivas por ELISA fueron teñidas mediante la coloración de Ziehl-Nielsen. En ellas fue posible visualizar ooquistes compatibles con la morfología de *Cryptosporidium* spp. en 35.1% (20/57) de las muestras (Gráfica 2).

A las muestras con presencia de ooquistes se les realizó la extracción de ADN total empleando el kit QIAamp DNA stool kit (QIAGEN). El producto extraído fue utilizado en la técnica de PCR-RFLP para la identificación de *Cryptosporidium* spp., logrando hasta ahora la detección de 10 muestras positivas con una banda de 836-849 pb dependiendo de la especie (Figuras 1 y 2). Al momento de presentar este avance se trabaja en la identificación de las especies correspondientes,



Gráfica 1: Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. según edad (meses)



Gráfica 2: Prevalencia de *Cryptosporidium* spp. según la técnica empleada y su procedencia.

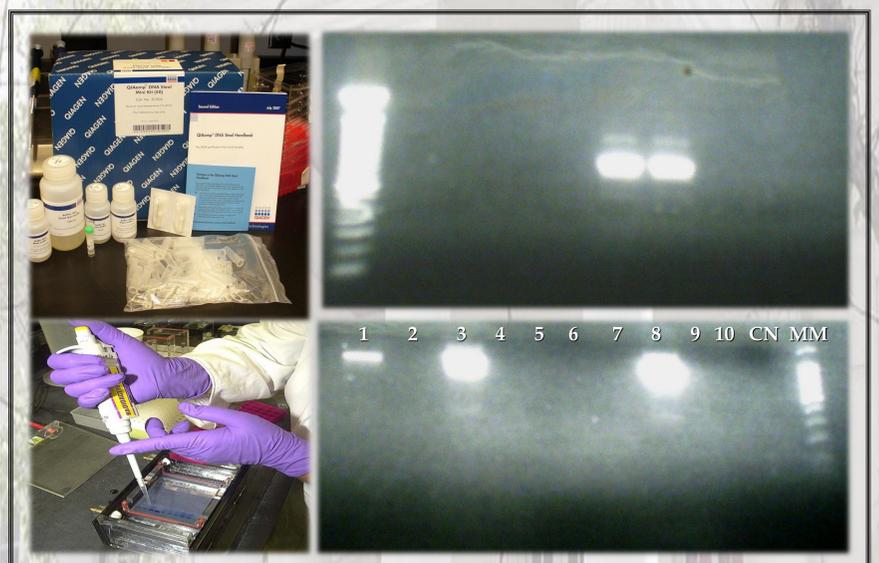


Figura 2: La muestras positivas fueron sometidas a ensayos moleculares como el PCR-RFLP, permitiendo evidenciar la presencia de ADN de *Cryptosporidium* spp.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos por el ELISA de captura nos sugieren la presencia de *Cryptosporidium* spp. en 16.2% de las muestras analizadas. La prevalencia mayor (25%) se encontró en el área de Panamá Oeste (La Chorrera). De estas muestras positivas sólo fue posible encontrar ooquistes teñidos en un 35.1% de los casos.

Se logró estandarizar la técnica de PCR-RFLP (gen SSU rRNA) para la detección y genotipificación de las especies de *Cryptosporidium* spp. Actualmente se trabaja en la etapa final correspondiente a la digestión con las endonucleasas SspI y VspI. Este análisis finalmente permitirá la identificación de las especies de *Cryptosporidium* presentes en las muestras analizadas.

Esta investigación fue parcialmente financiada mediante el Programa Multifase de Transformación Institucional del Sector Salud-Fase; Tema: FOI; Concurso Privado N°: CMP-006-2003 y por la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT), proyecto de investigación FID08-048.