

DIAGNÓSTICO E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *CRYPTOSPORIDIUM* EN POBLACIÓN INFANTIL DE ÁREAS RURALES EN PANAMÁ. DIAGNOSIS AND IDENTIFICATION OF *CRYPTOSPORIDIUM* SPECIES IN CHILDREN'S POPULATION OF RURAL AREAS IN PANAMA.

Álvarez, Dayra^{*}; Pineda, Vanessa⁺; Santamaría, Ana⁺; Calzada, José⁺; Saldaña, Azael^{*,+}

^{*} Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias (CIDEP), Departamento de Microbiología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá

⁺ Departamento de Investigación en Parasitología, Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) Panamá

Recibido: 30 agosto 2017

Aceptado: 30 julio 2019

Álvarez D, Pineda V, Santamaría A, Calzada J, Saldaña A. Diagnóstico e identificación de especies de *Cryptosporidium* en población infantil de áreas rurales en Panamá.. Rev méd cient. 2018;31:32-42.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La criptosporidiosis es una enfermedad entérica causada por diversas especies del género *Cryptosporidium*. Este parásito se asocia con episodios de diarrea aguda, cuadros de malabsorción y efectos negativos en el desarrollo físico y mental, principalmente en niños menores de cinco años. En Panamá se conoce poco sobre la prevalencia de esta infección y las especies involucradas.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se analizaron 618 muestras de heces de niños(as) menores de cinco años en cinco comunidades del país. Para el diagnóstico de *Cryptosporidium* se realizó el método de concentración por sedimentación con formol-acetato de etilo y tinción de Kinyoun para el análisis microscópico. Para la identificación de las especies de *Cryptosporidium* se realizó una PCR-anidada-RFLP del gen SSUrRNA.

RESULTADOS: El análisis microscópico mostró una prevalencia de parasitosis intestinal general de 83% y de 1.94% para *Cryptosporidium* spp en frotis fecales teñidos con tinción de Kinyoun. Mediante una PCR-anidada-RFLP del gen SSUrRNA de *Cryptosporidium* se logró identificar a *Cryptosporidium hominis* como la especie más frecuente (62.5%, 5/8). Además, se confirma la presencia de *C. meleagridis* (25%, 2/8) y *C. parvum* (*C. pestis*) (12.5%, 1/8). Adicionalmente, se reporta el hallazgo de *Cyclospora cayetanensis* en un 2.5% de las muestras procedentes de la comunidad indígena de Emplanada de Chorchá en Panamá.

CONCLUSIÓN: En este estudio se describen por primera vez las especies circulantes de *Cryptosporidium* en niños menores de cinco años procedentes de seis comunidades rurales de Panamá. Aun cuando las prevalencias encontradas para la criptosporidiosis infantil fueron bajas, la presencia de diversas especies de este gregarino representa un llamado de atención a las autoridades de salud para la correcta implementación de medidas de vigilancia, manejo y prevención acordes con el comportamiento epidemiológico de cada especie.

PALABRAS CLAVE: Criptosporidiosis, Niños menores de cinco años, Diarrea, Panamá, *Cryptosporidium*, Áreas Rurales, Subunidad pequeña del RNA ribosomal SSU rRNA.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cryptosporidiosis is an enteric disease caused by various species of the genus *Cryptosporidium*. This parasite is associated with episodes of acute diarrhea, malabsorption and negative effects on physical and mental development, mainly in children under five years of age. In Panama, little is known about the prevalence of this infection, as well as the species involved. This study describes, for first time, the circulating species of *Cryptosporidium*.

METHODS: 618 Stool samples from children under five years old were analyzed, in six rural communities *Cryptosporidium* spp. Concentration by sedimentation formol-acetate of ethyl was used. Then, one aliquot of the sediment was stained with Kinyoun stain. To identify, *Cryptosporidium* sp. we amplify the SSUrRNA gene region of the parasite using the RFLP-PCR technique.

RESULTS: Microscopic analysis of 618 stool samples showed a prevalence of intestinal parasitic infection of 83% and 1.94% for *Cryptosporidium* spp in fecal smears stained with Kinyoun staining. A PCR-nested RFLP of the *Cryptosporidium* SSUrRNA gene, identified *Cryptosporidium hominis* as the most common species (62.5%, 5/8). In addition, the presence of *C. meleagridis* (25%, 2/8) and *C. parvum* (*C. pestis*) (12.5%, 1/8) was confirmed. The finding of *Cyclospora cayetanensis* in 2.5% of samples from the indigenous community of Emplanada de Chorchá in Panama is a matter of concern.

CONCLUSION: This study describes for the first time the circulating species of *Cryptosporidium* in children under five years old from six rural communities in Panama. Although the prevalence found for cryptosporidiosis in children was low, the presence of several species of this gregarine parasite, represents a call for attention to the health authorities for the correct implementation of surveillance, management and prevention measures in accordance with the epidemiological behavior of each species.

KEY WORDS: Cryptosporidiosis, Children under five years old, Diarrhea, Panama, *Cryptosporidium*, Rural Areas, Small subunit of ribosomal RNA SSU rRNA.

Diagnóstico e identificación de especies de *Cryptosporidium* en población infantil en áreas rurales en Panamá by Álvarez D, Pineda V, Santamaría A, Calzada J, Saldaña A is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/). Permissions beyond the scope of this license may be available at www.revistamedicocientifica.org.



INTRODUCCIÓN

Los parásitos del género *Cryptosporidium* son patógenos intracelulares que afectan el epitelio gastrointestinal del hombre y otros animales ^{1,2}. Estos protozoarios son de distribución cosmopolita presentando además una gran diversidad genética ^{2,3}. Hasta hace poco, este parásito había sido considerado como un coccidio intestinal al igual que *Cystoisospora belli* y *Cyclospora cayetanensis*, sin embargo, estudios filogenéticos recientes lo vinculan más con el grupo de los gregarinos ⁴. La principal fuente de infección para los humanos es el consumo de agua o alimentos contaminados con heces conteniendo los ooquistes esporulados de *Cryptosporidium*. También se puede adquirir la infección por el contacto directo de personas infectadas con malos hábitos higiénicos y/o a través del contacto zoonótico con animales infectados ^{1,5,6}.

La criptosporidiosis se presenta con variaciones de las manifestaciones clínicas las cuales están asociadas a diversos factores tales como la edad, el estado nutricional, el estatus inmune del huésped y la especie o subtipo que infecta ⁷. Muchas de las infecciones por *Cryptosporidium* se presentan de forma asintomática con cuadros de diarrea leve y autolimitados que muchas veces pasan desapercibidos, eliminando ooquistes esporulados al ambiente especialmente en lugares con deficiencias sanitarias lo que contribuye a su transmisión.

En niños, la criptosporidiosis puede afectar el desarrollo en el crecimiento debido al aumento de episodios diarreicos repetitivos ⁸, lo que conlleva a una rápida pérdida de fluidos que contienen micronutrientes y macronutrientes favoreciendo la pérdida de peso y talla en los niños lo que permite que este parásito contribuya a una malnutrición en niños que se infectan constantemente. ⁹.

El diagnóstico parasitológico de *Cryptosporidium* spp. se basa generalmente en la demostración de los ooquistes luego de ser teñidos en frotis de heces; sin embargo, esta metodología no permite la identificación de las especies involucradas.

Análisis moleculares revelan la existencia de por lo menos 37 especies de *Cryptosporidium*, nombrando a 21 especies válidas y 16 genotipos clasificados conforme a sus características morfológicas, biológicas y moleculares ¹. Alrededor de 10 genotipos infectan al hombre, siendo *Cryptosporidium hominis* la especie mayormente implicada en la mayoría de los casos a nivel mundial ^{5,10-12} seguida de *C. parvum* reconocida actualmente como *C. pestis* ¹¹. Con menos frecuencia han sido reportadas las infecciones humanas con otras especies, entre las cuales destacan: *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. andersoni* y *C. ubiquitum* (genotipo cervino) entre otras ¹²⁻¹⁴.

En la mayoría de los escenarios epidemiológicos, la transmisión de este parásito se asocia a factores socioeconómicos, condiciones sanitarias, disponibilidad de agua potable y factores medioambientales: como la duración de la estación lluviosa, la deforestación y otras variaciones climáticas, entre otros ⁵. Esta parasitosis, presenta tasas de infección variables tanto en países en vías de desarrollo como en industrializados ^{2,8}. La criptosporidiosis puede afectar a individuos inmunocompetentes e inmunocomprometidos; en estos últimos, la infección puede desarrollarse oportunista y aumentar su morbilidad y mortalidad ¹⁴. Las regiones rurales son las que presentan un mayor riesgo de infección, probablemente debido a condiciones higiénicas deficientes, falta de agua potable, estados de malnutrición y escasa educación sanitaria ^{8,15,16}; sin embargo, en regiones urbanas y en países desarrollados también la criptosporidiosis se reporta con frecuencia como brotes epidémicos, esto debido primordialmente a la contaminación de las fuentes de agua potable ^{5,17}. En estudios realizados en Latinoamérica, la infección con *Cryptosporidium* spp. en adultos se presenta con prevalencias variables en Argentina: con 11.4% y Brasil con 19.1% ¹². Otros estudios de criptosporidiosis en niños de Perú y Brasil reflejan prevalencias variables de 36% y 6.9% respectivamente ^{8,21}.

En países cercanos a Panamá los estudios sobre prevalencia y caracterización molecular de los parásitos que causan la criptosporidiosis son escasos; algunos trabajos reportan prevalencias de 7% en Colombia y de 35.7% en Nicaragua^{18,22}.

En Panamá, los casos de diarrea y malnutrición infantil constituyen un problema importante de salud pública²³; no obstante, debido a que la criptosporidiosis no es una infección de reporte obligatorio, la información sobre la prevalencia/incidencia de esta parasitosis y más aún sobre las especies involucradas es escasa o totalmente inexistente en la mayoría de las regiones de salud del país.

La correcta identificación de la(s) especie(s) involucradas permite conocer la heterogenicidad de *Cryptosporidium* spp, su distribución geográfica en diversas regiones, grupos de riesgo más susceptibles y la prevalencia de cada especie/subtipo. La caracterización genética de las especies de este protozoo nos permiten conocer la epidemiología, los diversos comportamientos en la transmisión del parásito por vía zoonótica o antropofílica; las variaciones entre regiones, lo que permite reforzar las medidas de control, vigilancia, prevención y manejo clínico de este enteropatógeno^{2,18,24}.

El presente estudio tiene como objetivo principal la identificación molecular de las especies de *Cryptosporidium* spp presente en niños menores de cinco años de algunas regiones rurales de la República de Panamá.

MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio de tipo descriptivo para determinar la prevalencia y la diversidad de especies circulantes de *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces de niños/niñas menores de cinco años de diversas regiones de Panamá desde noviembre del 2007 hasta junio del 2012.

En cada comunidad investigada se intentó evaluar la mayoría de los niños menores de cinco años residentes de las comunidades a estudiar.

Las muestras de heces fueron colectadas durante giras de campo a las siguientes comunidades: El Salto y Las Lajas (Provincia del Darién); Ipetí Choco (Panamá Este); comunidad rural de El Guabal del distrito de Santa Fé, Calle Lourdes en el distrito de Cañazas (provincia de Veraguas) y comunidad de Emplanada de Chorchá dentro del distrito de San Félix (provincia de Chiriquí).

Este estudio fue aprobado por el Comité Nacional de Bioética de la Investigación del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, Panamá (1985/CNBI/ICGES). A cada padre y/o tutor se le explicó los objetivos del estudio antes de solicitarle la firma del consentimiento informado; seguidamente, se aplicó una encuesta básica en donde se incluían datos generales de cada niño(a), como la edad, sexo, lugar de residencia, entre otros.

Criterios de inclusión: muestras de heces de niños (as) menores de cinco años que residan en las comunidades evaluadas y cuyos padres/tutores aceptaron el consentimiento informado. **Criterios de exclusión:** sin criterios de exclusión.

Variables a estudiar: muestras de heces positivas por *Cryptosporidium* spp, sexo, edad (meses), procedencia, presencia de parásitos intestinales y especie de *Cryptosporidium* circulante.

Procesamiento de la muestra

Una vez colectadas, las muestras de heces fueron inmediatamente divididas en dos alícuotas. Una parte fue congelada el mismo día a -20°C para su posterior análisis molecular y la otra fue preservada en formalina al 5% y concentrada según la metodología de sedimentación con formol-acetato de etilo²⁴. Cada sedimento fue observado al microscopio en busca de helmintos y protozoarios y teñido mediante la técnica de Kinyoun⁷ en busca de ooquistes de 4-6µm compatibles con *Cryptosporidium* spp u otros coccidios. Sólo las muestras positivas por la tinción de Kinyoun fueron analizadas molecularmente.

Tabla.1. Infección y distribución de parásitos intestinales en niños menores de cinco años de diversas regiones rurales de Panamá.

Parásito	El Salto	Lajas Blancas	Ipetí Choco	El Guabal	E. Chorcha	Calle Lourdes	Total
Número de muestras	50	42	40	85	194	207	618
<i>A. lumbricoides</i>	0	0	1 (2.5%)	13 (15.3%)	73 (37.6%)	21 (10.01%)	108 (17.5%)
<i>T. trichiura</i>	0	0	0	1 (1.25%)	10 (5.2%)	4 (1.9%)	15 (2.4%)
<i>Urcinarias</i>	1 (2%)	0	1 (2.5%)	2 (2.35%)	21 (10.8%)	6 (2.9%)	31 (5%)
<i>H. nana</i>	5 (10%)	2 (4.7%)	2 (5%)	0	1 (0.5%)	0	10 (1.62%)
<i>S. stercoralis</i>	1 (2%)	0	0	0	3 (1.5%)	1 (0.48%)	5 (0.81%)
<i>G. lamblia</i>	18 (36%)	12 (28.5%)	13 (32.5%)	3 (3.5%)	52 (27%)	24 (11.6%)	122 (19.7%)
<i>Complejo histolytica-dispar</i>	3 (6%)	2 (4.7%)	5 (12.5%)	9 (10.5%)	16 (8.2%)	4 (1.9%)	39 (6.3%)
<i>Cryptosporidium spp</i>	0	1 (2.4%)	0	5 (5.9%)	4 (2.0%)	2 (0.9%)	12 (1.94%)
<i>C. cayetanensis</i>	0	0	0	0	5 (2.5%)	0	5 (0.81%)
<i>Otros Protozoarios Comensales</i>	25 (50%)	4 (9.5%)	24 (60%)	4 (4.7%)	88 (45.3%)	19 (9.1%)	164 (26.5%)
Total de Casos positivos por Comunidad	50	21	46	37	273	81	511 (83%)

Fuente: Base de datos, Centro de Investigación de Enfermedades Parasitarias -CIDEP-UP-ICGES.

Para la obtención del ADN genómico de *Cryptosporidium* spp se realizó una extracción alcalina para romper la pared de los ooquistes. Brevemente, se pesó 250 mg de heces a la cual se le añadió 200 µl de agua destilada, 50 µl de 1 M KOH y 18 µl de 1 M ditiotretol, se incubó por 15 minutos a 65°C y luego fue neutralizada con 8µl de HCl al 25% y 80 µl de tris-HCl (pH: 8.3) previamente descrito²⁴. El ADN genómico fue purificado de la suspensión con el uso del kit de extracción de ADN QIAamp DNA Stool Mini Kit Qiagen (Valencia, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN eluído fue conservado a -20°C para su posterior uso.

Para el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp se utilizó el análisis molecular de PCR anidado- polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), previamente descrito(14–16,18,20,24,25). Con esta técnica, se amplifica una región del locus que codifica la subunidad pequeña del ácido ribonucleico ribosomal 18S (SSU rRNA), generando un producto amplificado de 826-864 pares de bases (bp). Para determinar las especies de *Cryptosporidium* presentes, 10 µl del producto amplificado se digirió con las enzimas de restricción *VspI* y *SspI* (Promega, USA) incubado a 37°C durante 2 horas.

La visualización del producto digerido se realizó en electroforesis de gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

RESULTADOS

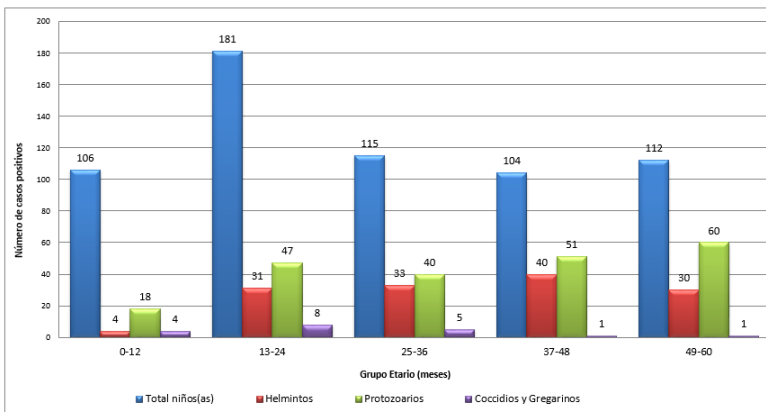
Se analizaron 618 muestras de heces, el 46% (286/618) de las muestras provenía de niños y 54 % (332 /618) de niñas. Estos niños y niñas conformaron los siguientes grupos etarios estudiados: 0-12 meses 17% (106/618), de 13-24 meses 29 % (181/618), de 25 a 36 meses 19 % (115/618), de 37 a 48 meses 17% (104/618) y de 49 a 60 meses 18% (112/618).

El porcentaje de niños(as) con uno o más parásitos intestinales en este estudio fue de 83% (511/618). La Tabla No.1 muestra la infección y distribución de los parásitos intestinales en niños(as) menores de cinco años según la comunidad rural estudiada. La prevalencia de helmintos fue de 27% (166/618). *A. lumbricoides* fue el helminto más frecuentemente encontrado 17.5% (108/618). Los protozoarios intestinales presentaron una prevalencia de 55.2% (342/618); entre ellos, *G. lamblia* presentó la mayor prevalencia con 19.7% (122/618).

Cryptosporidium spp fue detectado por microscopía (tinción de Kinyoun) en un 1.94% (12/618) del total de las muestras analizadas. De este total, siete casos presentaban infección únicamente por *Cryptosporidium* spp, tres casos presentaban coinfección con *A. lumbricoides*, uno con *G. lamblia* y uno con el complejo histolytica-dispar y *G. lamblia*.

La infección por helmintos intestinales fue más frecuente en el grupo de niños y niñas de 37 a 48 meses de edad. Los protozoarios intestinales fueron más frecuentemente encontrados en los niños de 49-60 meses de edad y los coccidios y/o gregarinos en los niños de 13 a 24 meses de edad. La distribución de los parásitos intestinales según el grupo etario se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Casos positivos de infección por helmintos, protozoarios, coccidios y/o gregarinos intestinales según el grupo etario (meses) de los niños (as) de las comunidades estudiadas.



Fuente: Base de Datos -CIDEP-ICGES

La distribución de la infección por *Cryptosporidium* spp según el grupo etario estudiado se presentó de la siguiente forma: en el grupo de 0-12 meses fue 25% (3/12), en el grupo de 13-24 meses un 42% (5/12), en el grupo de 25-36 meses fue de 17% (2/12), en el grupo de 37 a 48 meses 8% (1/12) y en el grupo de 49 a 60 meses 8% (1/12).

Del total de muestras positivas a *Cryptosporidium* spp por microscopía, sólo en 8 resultaron positivas mediante el uso de la PCR anidada del gen SSU rRNA, mostrando un

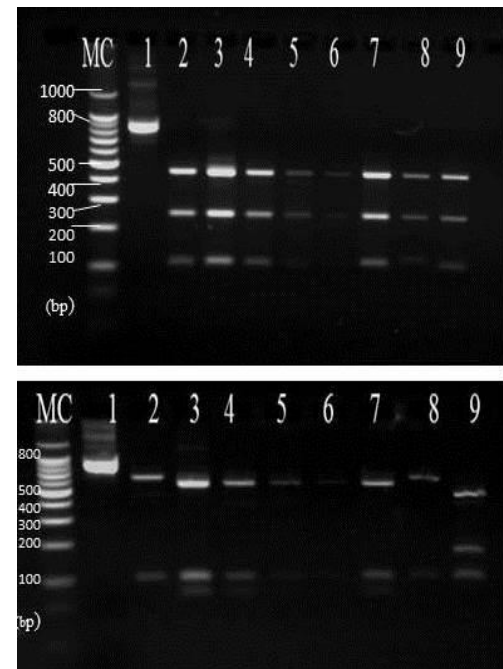
producto amplificado de 826-864 pares de bases. El análisis de las muestras por RFLP reveló la presencia de 3 especies de *Cryptosporidium* spp. La digestión con la endonucleasa *Sspl* mostró un patrón de bandas de 449, 254 y 108 bp característico para *C. hominis*, *C. parvum* y *C. meleagridis*. Con la endonucleasa *Vspl* se obtuvieron bandas de 561 y 104 bp para *C. hominis*, para *C. parvum* bandas de 628 y 104 bp y para *C. meleagridis* de 449 y 254 bp¹⁸. Ver “Figura 2”.

La especie *C. hominis* fue la más frecuente en las muestras evaluadas con un 62.5 %, seguida de *C. meleagridis* con 25% y *C. parvum* (*C. pestis*) con un 12.5% de las muestras amplificadas.

En cuanto a la distribución de las especies de *Cryptosporidium* en relación a las comunidades rurales evaluadas en la comunidad de Emplanada de Chorchá se encontraron *C. hominis* (3/8) y *C. meleagridis* (1/8). En la comunidad de El Guabal se identificó *C. hominis* (1/8) y *C. meleagridis* (1/8). En la comunidad de Calle Lourdes se observó solamente *C. parvum* (1/8). En la comunidad de Las Lajas se observó *C. hominis* (1/8), y en las comunidades de El Salto e Ipetí Choco no se encontraron muestras positivas para *Cryptosporidium*.

Figura 2. Diagnóstico molecular de 3 especies de *Cryptosporidium* por PCR-RFLP basado en el gen SSU rRNA.

Izquierda a derecha: marcador de peso molecular en pares de bases (bp), producto sin digerir (~823 bp) 1; *C. parvum* 2; *C. hominis* 3-7, *C. parvum* 8, y *C. meleagridis* 9. Arriba: digestión con *Sspl*. Abajo: digestión con *Vspl*.



DISCUSIÓN

La criptosporidiosis se presenta tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, siendo las regiones suburbanas y rurales las que presentan una mayor prevalencia de especies zoonóticas de *Cryptosporidium*^{10,14,26,27}. Generalmente en estas comunidades existen factores asociados a condiciones higiénicas y de salud deficientes que favorecen la persistencia de infecciones por *Cryptosporidium* y otros enteropatógenos. Panamá no escapa de esta realidad. Los cuadros diarreicos afectan con alta frecuencia a la población infantil en las diversas comunidades en donde la persistencia de los mismos puede afectar el estado nutricional y el desarrollo cognitivo, principalmente en niños menores de cinco años²⁸.

Sin embargo, el poco uso de métodos parasitológicos en los laboratorios clínicos y de pruebas diagnósticas confirmatorias para *Cryptosporidium* spp hace que los datos de prevalencia e incidencia de esta parasitosis no se conozcan y mucho menos las especies circulantes en las distintas regiones del país. Es importante señalar que los pocos casos de criptosporidiosis diagnosticados en Panamá no son reportados en las estadísticas epidemiológicas nacionales; en contraste con países como Estados Unidos, donde la criptosporidiosis es de notificación obligatoria, lo cual les permite establecer un mayor monitoreo y control de esta parasitosis²⁹.

Nuestros hallazgos muestran que la prevalencia de este protozooario por análisis microscópico y tinción de Kinyoun fue de 1.94% del total de muestras evaluadas en las 6 comunidades estudiadas. Esta prevalencia difiere con los resultados reportados en un estudio piloto realizado en el año 2007 por el Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) por Saldaña y colaboradores donde reportan una prevalencia de *Cryptosporidium* spp de un 15.6% en niños menores de cinco años²³. Sin embargo, es probable que en ese estudio la prevalencia fuera mayor debido a la vinculación de *Cryptosporidium* spp como agente etiológico de cuadros diarreicos en la población evaluada.

Otro estudio realizado en nuestro país ese mismo año, encontró una prevalencia de infección con *Cryptosporidium* spp de 20% en pacientes con VIH/SIDA³⁰. Se reconoce, que en los pacientes inmunocomprometidos la criptosporidiosis, se presenta como una infección oportunista por lo que los datos de prevalencia, incidencia y caracterización molecular de las diversas especies pueden orientar en cierta forma sobre las medidas preventivas y de control de esta parasitosis en esta y otras poblaciones susceptibles^{2,12,24}.

Sin embargo, en ninguno de los dos estudios anteriores se identificaron las especies de *Cryptosporidium* circulantes en las distintas poblaciones estudiadas. Como se ha mencionado, la caracterización de este parásito a nivel de especie solo resulta posible mediante metodologías moleculares^{7,14,24}. Estos análisis genéticos contribuyen significativamente no sólo a mejorar la sensibilidad diagnóstica sino también a conocer la distribución de las especies en las distintas poblaciones y regiones, así como sus características epidemiológicas particulares y la patobiología ligada a cada especie¹⁸. Las pruebas de PCR anidado para *Cryptosporidium* spp y PCR en tiempo real, son aplicables para el diagnóstico en individuos infectados con baja eliminación de ooquistes y en los cuales la microscopia es negativa; sin embargo, estas pruebas moleculares presentan un alto costo para ser utilizadas como diagnóstico de rutina.

En consideración a la presencia de otros parásitos intestinales vinculados frecuentemente con cuadros clínicos, en este estudio se determinó que la mayor prevalencia de parasitismo intestinal fue debido al protozooario *Giardia lamblia* y al complejo histolytica-dispar, con prevalencias de 19.7 y 6.3% respectivamente. Los niños de 49 a 60 meses de edad fueron los que presentaron el mayor número de infecciones por estos protozoarios entéricos. Al comparar la alta prevalencia que presenta *G. lamblia* en relación a *Cryptosporidium* spp. Probablemente este gregarino tiene una menor relevancia como agente causal de infecciones intestinales en estas comunidades rurales.

Cabe destacar que la prevalencia de *Cryptosporidium* spp en nuestro estudio fue mayor en los niños menores de 2 años. Tal y como lo demuestran reportes de estudios realizados en países como Nigeria, India, Perú y Bangladesh^{13,18,24,28}; la criptosporidiosis es una importante enteroinfección dentro de este grupo etario. Un cuadro de malnutrición en niños menores de dos años predispone al riesgo de infección por *Cryptosporidium* spp y a sufrir otras manifestaciones clínicas comparado con los niños con una buena nutrición⁷. En un estudio longitudinal realizado en Brasil, se observó que niños nacidos con bajo peso tienen mayor predisposición a presentar cuadros sintomáticos por criptosporidiosis⁸. Estos hallazgos sugieren que la criptosporidiosis en niños menores de 2 años está asociada a un aumento de los cuadros diarreicos y contribuye a la malnutrición en general teniendo como consecuencia: bajo desarrollo físico y cognitivo de los infantes^{7,28}.

La prevalencia y caracterización molecular de las especies de *Cryptosporidium* circulantes en población infantil, ha sido estudiada parcialmente en países vecinos a Panamá. Investigaciones previas realizadas en niños de edad escolar en comunidades urbanas y rurales del departamento de Río San Juan de Nicaragua, reflejan una alta prevalencia de *Cryptosporidium* spp con un 35.7%¹⁸. Sin embargo, otro estudio llevado a cabo en niños indígenas de 7 a 14 años de comunidades de la región del Amazonas en Colombia, encontró prevalencias de 1.9 % de *Cryptosporidium* spp²⁵, una situación similar a la reportada en el presente trabajo. Si bien la vía de transmisión de la criptosporidiosis es la misma, es importante considerar que cada región/comunidad puede presentar escenarios epidemiológicos particulares que favorecen o no la presencia de esta parasitosis. Un estudio realizado en la India reflejó que la ocurrencia de los casos era elevada (6.3%) durante los meses de junio y octubre cuando la época lluviosa era mayor¹⁵, lo que nos indica la relación de las variaciones climáticas con el aumento de los casos de criptosporidiosis en determinadas regiones. La distribución geográfica de la criptosporidiosis ha presentado altas prevalencias en países poco desarrollados, donde es más común en niños

que en adultos, y donde el contacto con animales juega un papel importante en la transmisión de la infección^{5,27}. En nuestro estudio, debido a la complejidad y distribución de las comunidades no se tomó en cuenta las variables climáticas, estacionales ni el contacto con animales infectados. A diferencia, en los países desarrollados la prevalencia de la criptosporidiosis se relaciona a diarrea del viajero, cambio de pañales en guarderías y aumento de casos durante el verano por piscinas contaminadas^{7,10}.

A nivel mundial, existen diversos estudios en donde ha sido posible la caracterización de *Cryptosporidium* a nivel de especie^{15,24,32,33-35}. No obstante, hasta donde conocemos, este es el primer reporte de las especies de *Cryptosporidium* circulantes en niños menores de cinco años de comunidades rurales en Panamá.

Mediante el análisis del gen SSU rRNA se logró identificar 3 especies de *Cryptosporidium* presentes en las heces de niños menores de cinco años. *C. hominis* fue la especie predominante (62.5%) en este estudio. Esto concuerda con otros resultados observado en países en vías de desarrollo tales como Nicaragua¹⁶, Nigeria¹⁴, México³⁰, Perú¹² y Sur África²¹. Al ser *C. hominis* la especie mayormente reportada en el humano¹, estos resultados sugieren que el modo de transmisión predominante en las áreas rurales evaluadas involucra el contagio a través de la ingesta de agua/alimentos contaminados con heces humanas. De igual manera, podemos señalar que la prevención de esta infección debe considerar la mejora en los hábitos higiénicos y la correcta disposición de las heces humanas en las comunidades afectadas⁵. *C. hominis* presenta una alta diversidad genética con diversos subtipos que juega un papel importante en la epidemiología molecular, patobiología y la dinámica de la transmisión de una región a otra^{2,9,24}. En este sentido, investigaciones orientadas al estudio de los subtipos de *C. hominis* presentes en las comunidades rurales evaluadas y en otras, ayudarían significativamente en los programas de prevención y vigilancia para esta parasitosis intestinal.

Desde otra perspectiva, en este estudio se identificó *C. meleagridis* como la segunda especie más frecuentemente diagnosticada (25%) en las heces evaluadas. Sin embargo, en algunos países tales como Perú, *C. meleagridis* suele ser tan prevalente como otras especies o subtipos considerados antropofílico¹². En el caso de *C. parvum*, sólo se identificó un caso positivo (12.5%) en la comunidad de Calle de Lourdes en el distrito de Cañazas, provincia de Veraguas. Tanto *C. meleagridis*, como *C. parvum* se caracterizan por una dinámica de transmisión de tipo zoonótico^{1,2} principalmente en países en vías de desarrollo. *C. meleagridis* generalmente se asocia con la cría de aves domésticas²⁵, situación muy frecuente en las comunidades de Emplanada de Chorchá en el distrito de San Félix y El Guabal en el distrito de Santa Fé donde fueron encontrados los casos. Es importante destacar que existen reportes en donde esta especie ha infectado a personas inmunocomprometidas induciendo características clínicas graves³¹.

Pocos estudios han demostrado la variabilidad genética de *C. meleagridis*. En uno reciente, basado en el análisis del gen Gp60 (glicoproteína 60kDa)³², se han demostrado la presencia de al menos siete subtipos de familias, sin embargo aún no se ha confirmado una relación entre la patobiología y los subtipos de esta especie³². *C. parvum* al igual que *C. hominis*, presentan una alta diversidad genética. Se reconoce la presencia de un subtipo o variante antropofítica IIc, la cual es la responsable de la mayoría de las infecciones humanas en países en vías de desarrollo; a diferencia de la variante zoonótica IIa que prevalece en países industrializados². La metodología molecular utilizada en este estudio no permite la identificación de los subtipos de *C. parvum*, *C. hominis* ni *C. meleagridis* por lo que esta importante tarea queda aún pendiente de realizarse en nuestro medio.

Por otra parte, el hallazgo de 5 casos del coccidio intestinal *C. cayetanensis* resultó inesperado. Hasta donde conocemos, este es el primer reporte de este parásito en niños panameños menores de cinco años principalmente en el rango de 13 a 24 meses de edad. Todos los casos positivos por este parásito se localizaron

en la comunidad de la Emplanada de Chorchá en el distrito de San Félix, provincia de Chiriquí. Es bien conocido, que este coccidio está asociado a infecciones tanto en individuos inmunocomprometidos como inmunocompetentes³³. Coincidentemente, existen algunos estudios que señalan altas prevalencias de ciclosporiasis en comunidades indígenas en Venezuela con un 11.9% principalmente en niños menores de 9 años³⁴ y en adultos indígenas en Brasil, con un 10.8% de prevalencia³⁵. Nepal, reporta prevalencias de 3.94% en población escolar menor de 14 años³⁶, lo que sugiere variaciones en la transmisión y epidemiología de esta coccidiosis. En Panamá, solo se ha reportado *C. cayetanensis* en pacientes con VIH/SIDA con una prevalencia cercana al 12%²⁷. Nuestros hallazgos, sugieren la necesidad de realizar otros estudios en poblaciones indígenas panameñas para conocer la prevalencia real e importancia clínica de esta parasitosis.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados confirman la presencia de la infección con *Cryptosporidium* spp en la población infantil de algunas comunidades rurales de Panamá. Sin embargo, las prevalencias encontradas fueron bajas, limitando de este modo el papel de este parásito como agente etiológico de enfermedad entérica infantil en las comunidades evaluadas. La presencia de diversas especies de *Cryptosporidium* spp circulando en las regiones investigadas debe alertar a las autoridades de salud en la implementación de pruebas de diagnóstico molecular que puedan dar un resultado rápido y más específico a las poblaciones más susceptibles, también deben implementar medidas de vigilancia y prevención acordes con el comportamiento epidemiológico de cada especie.

RECOMENDACIONES

Este estudio no descarta la presencia de otras especies de *Cryptosporidium* spp y *C. cayetanensis*, es por ello que se sugiere realizar investigaciones adicionales con un mayor número de muestras y en diversas áreas geográficas del país. También es necesario establecer el uso de otros marcadores moleculares tales como el GP60 (gen que codifica la glicoproteína 40/60) para dar a conocer la diversidad genética y subtipos circulantes de *C. hominis* y *C. parvum* (*C. pestis*).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a cada uno de los padres, tutores y niños(as) que participaron en este estudio. Al Licdo. Kadir González, del Departamento de Parasitología del ICGES por su valiosa colaboración en las giras de campo. A las autoridades del Ministerio de Salud por su apoyo en este estudio.

Esta investigación fue financiada a través de los Fondos obtenidos por la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) mediante el Fondo de Investigación y Desarrollo FID 08-048, el Programa de Estímulo de las actividades de Ciencia y Tecnología EST-09-034B y el Sistema Nacional de Investigación (SIN).

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que esta investigación fue realizada en ausencia de algún tipo de conflicto de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ryan UNA, Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* [Internet]. 2014 Nov 8 [cited 2017 Apr 24];141(13):1667–85. Available from: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182014001085
2. Xiao L. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp Parasitol*. 2010;124(1):80–9.
3. Thompson RCA, Ash A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2016 [cited 2017 Apr 25]; 40:315–23. Available from: http://ac.els-cdn.com/S1567134815004049/1-s2.0-S1567134815004049-main.pdf?_tid=8cd97bb0-29c9-11e7-92d3-00000aab0f26&acdnat=1493133308_4e7a17dbe2ce5103736bcbbb7befa300
4. Thompson RCA, Koh WH, Clode PL. *Cryptosporidium* — What is it? *Food Waterborne Parasitol* [Internet]. 2016 [cited 2017 Apr 24]; 4:54–61. Available from: http://ac.els-cdn.com/S2405676616300142/1-s2.0-S2405676616300142-main.pdf?_tid=468fe1e0-2923-11e7-96c1-00000aacb35e&acdnat=1493061894_3a46c545400e2fa0dd1939245f48b292
5. Putignani L, Menichella D. Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *cryptosporidium*. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010;(2010):39.
6. Li N, Xiao L, Alderisio K, Elwin K, Cebelinski E, Chalmers R, et al. Subtyping *Cryptosporidium* ubiquitum, a zoonotic pathogen emerging in humans. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(2):217–24.
7. Fayer R XL. *Cryptosporidium* and *Cryptosporidiosis*. 2nd ed. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Boca Raton (FL); 2007.
8. Newman RD, Sears CL, Moore SR, Nataro JP, Wuhib T, Agnew DA, et al. Longitudinal Study of *Cryptosporidium* Infection in Children in Northeastern Brazil. *J Infect Dis* [Internet]. 1999 Jul 1 [cited 2017 Aug 16];180(1):167–75. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/314820>
9. Khalil IA, Troeger MPH C, Rao MPH PC, Blacker MPH BF, Brown AM, Colombara D V, et al. Morbidity, mortality, and long-term consequences associated with diarrhoea from *Cryptosporidium* infection in children younger than 5 years: a meta-analyses study [Internet]. Vol. 6, *Articles*

Lancet Glob Health. 2018 [cited 2019 Jun 23]. Available from: www.thelancet.com/lancetgh

10. Snelling WJ, Xiao L, Ortega-Pierres G, Lowery CJ, Moore JE, Rao JR, et al. Cryptosporidiosis in developing countries. [Internet]. Vol. 1, Journal of infection in developing countries. 2007 [cited 2017 Apr 24]. p. 242–56. Available from: <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/19734601/208>

11. Valenzuela O, González-Díaz M, Garibay-Escobar A, Burgara-Estrella A, Cano M, Durazo M, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in children from Mexico. PLoS One. 2014;9(4).

12. Saramago Peralta RH, Nestor Velasquez J, de Souza Cunha F, Laura Pantano M, Campos Sodra F, da Silva S, et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium* identified in clinical samples from cities in Brazil and Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]. 2016 [cited 2017 Apr 25];111(1):30–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4727433/pdf/0074-0276-mioc-111-1-0030.pdf>

13. Šlapeta J. Naming of *Cryptosporidium pestis* is in accordance with the ICZN Code and the name is available for this taxon previously recognized as *C. parvum* “bovine genotype” [Internet]. Vol. 177, Veterinary Parasitology. 2011 [cited 2017 Apr 25]. p. 1–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21367525>

14. Xiao L, Bern C, Limor J, Sulaiman I, Roberts J, Checkley W, et al. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. J Infect Dis [Internet]. 2001 [cited 2017 Apr 24];183(3):492–7. Available from: https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/jid/183/3/10.1086/318090/2/183-3-492.pdf?Expires=1493409349&Signature=QflPMS5Usd49c8ixiFeuxUZVikooBjZw5Oz1-mADfvThDkz7SeThGbNsz6szZg9D-9OIxxlcVhzaPAYj6kNhH561S9I~1Lf3MFKbOXruxk5O7fs5B3M2Q

15. Das P, Roy SS, MitraDhar K, Dutta P, Bhattacharya MK, Sen A, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from children in Kolkata, India. J Clin Microbiol [Internet]. 2006 Nov [cited 2017 Apr 25];44(11):4246–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16971647>

16. Molloy SF, Smith H V., Kirwan P, Nichols RAB, Asaolu SO, Connelly L, et al. Identification of a high diversity of *Cryptosporidium* species genotypes and subtypes in a pediatric population in Nigeria. Am J Trop Med Hyg. 2010;82(4):608–13.

17. Yang Y, Zhou Y-B, Xiao P-L, Shi Y, Chen Y, Liang S, et al. Prevalence of and risk factors associated with *Cryptosporidium* infection in an underdeveloped rural community of southwest China. Infect Dis Poverty [Internet]. 2017 [cited 2017 Jun 7];6(1):2. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5267368/pdf/40249_2016_Article_223.pdf

18. Muñoz-Antoli C, Pavón A, Marcilla A, Toledo R, Esteban JG. Prevalence and molecular characterization of *cryptosporidium* in schoolchildren from department of Rio San Juan (Nicaragua). Trop Biomed [Internet]. 2011 Apr [cited 2017 Apr 25];28(1):40–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21602767>

19. Shirley D-AT, Moonah SN, Kotloff KL. Burden of disease from cryptosporidiosis. Curr Opin Infect Dis [Internet]. 2012 [cited 2017 Apr 24];25(5):555–63. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4465599/pdf/nihms654379.pdf>

20. Cama VA, Bern C, Roberts J, Cabrera L, Sterling CR, Ortega Y, et al. *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. Emerg Infect Dis [Internet]. 2008 [cited 2017 Apr 24];14(10):1567–74. Available from: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/10/pdfs/07-1273.pdf>

21. Bern C, Ortega Y, Checkley W, Roberts JM, Lescano AG, Cabrera L, et al. Epidemiologic differences between

- cyclosporiasis and cryptosporidiosis in Peruvian children. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2002 Jun [cited 2017 Jul 25];8(6):581–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023913>
22. Bayona M, Avendaño C, Amaya Á. Criptosporidiosis En Población Infantil De La Región Sabana Centro (Cundinamarca). *Rev UDCA Actual Divulg Científica* [Internet]. 2011 [cited 2017 Jun 7];14(1):7–13. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v14n1/v14n1a0.pdf>
23. Saldaña Azael, Pineda Vanessa, Bayard Vicente CJ. Protozoarios enteropatógenos asociados a diarrea en niños menores de cinco años. Panamá 2006-2007. Informe Técnico Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud. ICGES. Panamá; 2007.
24. Samie A, Bessong PO, Obi CL, Sevilleja JEAD, Stroup S, Houpt E, et al. *Cryptosporidium* species: Preliminary descriptions of the prevalence and genotype distribution among school children and hospital patients in the Venda region, Limpopo Province, South Africa. *Exp Parasitol* [Internet]. 2006 Dec [cited 2017 Jun 9];114(4):314–22. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489406001020>
25. Sánchez A, Munoz M, Gómez N, Tabares J, Segura L, Salazar Á, et al. Molecular epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among Indigenous children from the Colombian Amazon basin. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Jul 18];8(FEB):248. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28270802>
26. Molloy SF, Smith H V., Kirwan P, Nichols RAB, Asaolu SO, Connelly L, et al. Identification of a high diversity of *Cryptosporidium* species genotypes and subtypes in a pediatric population in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2010 [cited 2017 Apr 24];82(4):608–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2844578/pdf/tropmed-82-608.pdf>
27. Xiao L, Feng Y. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2008 Apr 1 [cited 2017 Jul 18];52(3):309–23. Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-695X.2008.00377.x>
28. Guerrant DI, Moore SR, Lima a a, Patrick PD, Schorling JB, Guerrant RL. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban community in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61(5):707–13.
29. Centers for Disease Control and Prevention. *Cryptosporidiosis Surveillance United States, 2011-2012. Giardiasis Surveillance 2011-2012. Surveill Summ*. 2015;64(3).
30. Castillo, Boris; Castillo, Milton; Vega S. Características clínicas y etiológicas de las diarreas infecciosas en pacientes adultos con VIH o Sida de la sala de infectología del Complejo Hospitalario Metropolitano Dr. Arnulfo Arias Madrid (CHMDAAM)-abril a diciembre del 2007-Panamá. *Rev Panam Infectol* [Internet]. 2009 [cited 2017 Jul 19];11(3):18–22. Available from: http://www.revistaapi.com/wp-content/uploads/2014/03/API_03_09_C.pdf
31. Hira KG, Mackay MR, Hempstead AD, Ahmed S, Karim MM, O’Connor RM, et al. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. from Bangladeshi children. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2011 [cited 2017 Apr 25];49(6):2307–10. Available from: <http://jcm.asm.org/content/49/6/2307.full.pdf>
32. Valenzuela O, González-Díaz M, Garibay-Escobar A, Burgara-Estrella A, Cano M, Durazo M, et al. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in children from Mexico. *PLoS One* [Internet]. 2014 [cited 2017 Apr 24];9(4). Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0096128&type=printable>
33. Mohammadian H, Azizi H, Dabirzadeh M. Genetic study of *Cryptosporidium* with SSU-rRNA in children

younger than ten referring to hospitals of Zabol, Southeast of Iran. Shiraz E Med J. 2019 Apr 1;20(4).

34. Mohammadian H, Azizi H, Dabirzadeh M. Genetic Study of *Cryptosporidium* with SSU-rRNA in Children Younger Than Ten Referring to Hospitals of Zabol, Southeast of Iran. Shiraz E-Medical J [Internet]. 2019 Mar 12; In Press (In Press). Available from: <http://emedicalj.com/en/articles/81106.html>

35. Peralta JM, Souza Cunha F, Helena R, Peralta S. New insights into the detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* with emphasis in Brazilian studies: a review. [cited 2019 Jun 23]; Available from: <http://doi.org/10.1590/S1678-9946201961028>

36. Matos O, Alves M, Xiao L, Cama V, Antunes F. *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal [1]. Vol. 10, Emerging Infectious Diseases. 2004. p. 2256–7.

37. Stensvold CR, Beser J, Axelsen C, Lebbad M. High applicability of a novel method for gp60-based subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. J Clin Microbiol [Internet]. 2014 [cited 2017 Aug 17];52(7):2311–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4097674/pdf/zjm2311.pdf>

38. Ortega YR, Sanchez R. Update on *Cyclospora cayetanensis*, a food-borne and waterborne parasite [Internet]. Vol. 23, Clinical Microbiology Reviews. 2010 [cited 2017 Aug 16]. p. 218–34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2806662/pdf/0026-09.pdf>

39. Devera R, Blanco Y, Cabello E. Elevada prevalencia de *Cyclospora cayetanensis* en indígenas del estado Bolívar, Venezuela. Cad Saude Publica [Internet]. 2005 [cited 2017 Jul 18];21(6):1778–84. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/04bc/3cd67efe1d119f7941bb6f225f0b9847b2fa.pdf>

40. Borges JD, Alarcón RSR, Amato NV, Gakiya E. Parasitoses intestinais de indígenas da comunidade

Mapuera (Oriximiná, Estado do Pará, Brasil): elevada prevalência de *Blastocystis hominis* e encontro de *Cryptosporidium* sp e *Cyclospora cayetanensis*. Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2009 [cited 2017 Aug 20];42(3):348–50. Available from: <http://producao.usp.br/handle/BDPI/9516>

41. Bhandari D, Tandukar S, Parajuli H, Thapa P, Chaudhary P, Shrestha D, et al. *Cyclospora* Infection among School Children in Kathmandu, Nepal: Prevalence and Associated Risk Factors. Trop Med Health [Internet]. 2015 [cited 2017 Aug 20];43(4):211–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4689608/pdf/tmh-43-4-211.pdf>