

Diarrea del viajero por *Cyclospora cayetanensis* en España: a propósito de un caso

Raquel Navajas¹
Guillermo
González-Castelao²
Soledad Fenoy¹
Carmen del Águila¹

¹Sección de biología animal y parasitología Facultad de Ciencias experimentales y de la salud Universidad San Pablo CEU Urbanización Montepríncipe Boadilla del Monte Madrid

²Laboratorio Castelao (análisis clínicos) San Pedro de Alcántara Marbella. Málaga

Correspondencia:
Soledad Fenoy
Sección de biología animal y parasitología Facultad de Ciencias experimentales y de la salud Universidad San Pablo CEU Urbanización Montepríncipe Boadilla del Monte 28668 Madrid

Resumen

Objetivos: Diagnóstico específico de estructuras compatibles con ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* aisladas en un paciente procedente de Indonesia y diagnosticado de diarrea del viajero.

Métodos: El diagnóstico específico se realizó mediante la observación directa de los ooquistes con filtro de epifluorescencia, tinción de Kinyoun® para ácido-alcohol resistentes, tinción de Safranina modificada para *Cyclospora cayetanensis* y mediante el test de esporulación en dicromato potásico al 2,5%.

Resultados: La observación directa al microscopio con filtro de epifluorescencia reveló estructuras redondeadas de 8-10 µm que emitían autofluorescencia. La tinción de Kinyoun mostró los ooquistes teñidos de coloración rosa de intensidad variable y la de safranina modificada permitió la observación de las mencionadas estructuras teñidas de color rojo-anaranjado característico, confirmándose la presencia de ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* tras la aplicación del test de esporulación en dicromato potásico. **Conclusiones:** *Cyclospora cayetanensis* es un parásito inusual en nuestro país, y por ello, su determinación no se encuentra incluida en los protocolos rutinarios de estudio parasitológico de heces. Su diagnóstico debería considerarse en pacientes con diarreas prolongadas.

Palabras clave: Diarrea del viajero. Coccidios. *Cyclospora cayetanensis*.

Summary

Objectives: Specific diagnosis of structures compatible with *Cyclospora cayetanensis* oocysts isolate of a patient proceeding from Indonesia, and diagnoses of traveller's diarrhoea.

Methods: The specific diagnosis was carried out by direct observation of oocysts using epifluorescence microscopy, Kinyoun's acid-fast stain, modified Safranin's *Cyclospora cayetanensis* stain and by the sporulation test in 2,5% in potassium dichromate.

Results: The application of different techniques showed round structures, measuring 8 to 10 µm and exhibiting autofluorescence. Kinyoun's acid-fast stain showed highly variable pink stained oocysts. Modified Safranin stain allowed the observation of characteristic reddish orange oocysts. The confirmation of *Cyclospora cayetanensis* was

performed after application of the sporulation test in potassium dichromate.

Conclusion: *Cyclospora cayetanensis* is an unusual parasite in our country. For this reason, its determination is not included in routine protocols for stool parasitologic study. However, this parasite has been described in 1-4% of traveller's diarrhoea in our country and in a patient residing in Spain with no travel antecedents. For these reasons, the diagnosis should be considered in coccidiosis cases with prolonged diarrhoea

Key words: Travellers' diarrhoea. Coccidiosis. *Cyclospora cayetanensis*.

Introducción

Cyclospora cayetanensis es un coccidio parásito causante de enfermedad diarreica en el hombre. Perteneció al Phylum Sporozoa¹ que fue descrito por primera vez en 1979 por Ashford², y cuyo nombre se debe a Ortega, *et al.*³. Los ooquistes son esféricos, miden entre 8-10 µm, y en su interior contienen 2 esporoquistes con dos esporozoitos cada una de ellos³. Se emiten con las heces sin esporular habiéndose establecido en el laboratorio un tiempo de entre 7 a 13 días para completar su desarrollo³.

La importancia de *Cyclospora cayetanensis* va en aumento al estar considerado como un nuevo parásito emergente, causante de diarrea a veces prolongada, dolores abdominales, fatiga y pérdida de peso⁶. Su transmisión se ha asociado a la ingestión de alimentos y aguas contaminadas con ooquistes. El carácter zoonótico de esta infección es controvertido ya que mientras que algunos estudios realizados sugieren que ciertos animales como perros, pollos o patos, incrementan el riesgo de infección por *Cyclospora*^{7,8}, en otros se plantean serias dudas sobre la posibilidad de que sea realmente zoonótico. Se ha identificado mayoritariamente en individuos inmunocompetentes con historia reciente de viaje a zonas tropicales y subtropicales¹²⁻¹⁹, áreas consideradas

como endémicas^{3,7,9,20,21}. Aunque se han producido casos de infección en individuos sin antecedentes de viajes pero asociados al consumo de ciertos alimentos importados desde regiones endémicas²²⁻²⁴. La infección también se ha descrito en pacientes de SIDA entre los que se encuentran tanto viajeros como residentes en áreas endémicas en quienes la infección tiene un curso más prolongado²⁵⁻²⁸.

En el presente trabajo describimos el caso de un paciente con clínica de diarrea que había regresado recientemente de un viaje a Indonesia y que liberaba en sus heces estructuras compatibles con ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*.

Material y métodos

El paciente se trata de un varón de 26 años inmunocompetente, con antecedentes de viaje a Indonesia, que presentaba dolor abdominal y diarrea prolongada de más de 1 mes de evolución. Acudió a consul-

ta médica para exploración física y se le indicó remitir 3 muestras de heces al laboratorio para análisis coprológico completo, incluyendo la detección de bacterias patógenas, protozoos y huevos de helmintos.

En el laboratorio Castelao (Marbella-Málaga) se llevó a cabo un análisis bacteriológico completo de las heces, realizando la tinción de Gram directa y coprocultivos en medios selectivo- diferenciales: Agar SS, Agar Yersinia-CIN, Agar Skirrow, Agar sal-manitol y Agar MaConkey-Sorbitol para aislamiento de *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli* O157:H7, respectivamente. En el caso del agar SS, se realizó previamente un enriquecimiento en el caldo Selenito F.

Para el análisis parasitológico, se practicó una visualización directa con lugol, examen tras concentración con formol-eter y flotación en sulfato de zinc y tinciones de Giemsa, Negro de Clorazol y Ziehl-Neelsen para ácido alcohol resistentes.

Ante la sospecha de parasitismo por *Cyclospora cayetanensis* la muestra se remitió al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad San Pablo CEU (Madrid), donde tras la observación directa de la muestra con filtro de epifluorescencia a 360 nm²⁹ se realizó tinción de Kinyoun para ácido alcohol resistentes y de Safranina modificada para *Cyclospora cayetanensis*⁶. Posteriormente se realizó el test de esporulación en dicromato potásico al 2,5% junto a un control positivo de *Cyclospora cayetanensis*³.

Resultados

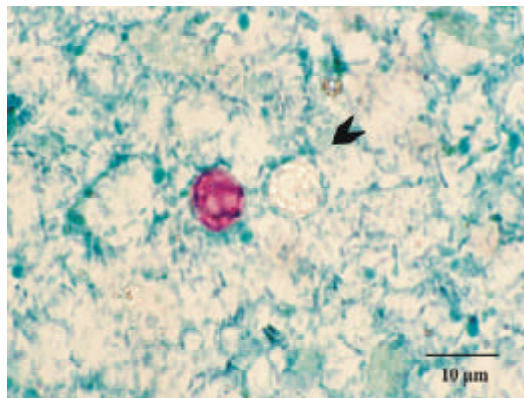
El examen físico del paciente resultó normal y los análisis coprológicos para bacterias y huevos de helmintos resultaron negativos así como las tinciones de Giemsa y Negro de Clorazol para protozoos.

El examen en fresco reveló numerosas estructuras redondeadas de 8-10 mm de tamaño, que emitían autofluorescencia de color azul utilizando el filtro de 360 nm. (Figura 1) compatibles con ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*. Con la tinción de Kinyoun®, los ooquistes adquirieron una coloración rosa de intensidad variable, aunque la mayoría mostraban una tinción parcial o ausente (Figura 2). No obstante, mediante la técnica de safranina modificada para *Cyclospora sp*, se observó que la mayoría de los ooquistes se teñían uniformemente del color rojo-anaranjado característico descrito previamente (Figura 3).

Figura 1.
Autofluorescencia
de los ooquistes con filtro
de 360 nm



Figura 2.
Tinción de Kinyoun para
ácido alcohol resistentes.
Flecha: Ooquiste
de Cyclospora sin teñir



La confirmación de estos resultados se realizó mediante la aplicación del test de esporulación en presencia de dicromato potásico al 2,5% junto con controles positivos de *Cyclospora cayetanensis* (Figura 4). Transcurridos 15 días, el 50% de los ooquistes presentes en la muestra del paciente mostraban dos esporoquistes en su interior. Este mismo resultado se observó en el control positivo con *Cyclospora cayetanensis*.

Discusión

Cyclospora cayetanensis es un parásito intestinal de reciente implicación humana³⁰. Su presencia se ha asociado en muchos casos con viajes o brotes producidos como consecuencia de la ingestión de ciertos alimentos procedentes de áreas donde *Cyclospora* se ha descrito como endémica³¹. Este parásito, aunque se ha citado en muchos países con una prevalencia aparentemente baja, es endémico en regiones con climas cálidos y tropicales entre los que se encuentran Guatemala⁷, Perú²¹ o Nepal³². Nuestro paciente, un individuo inmunocompetente de 29 años con diarrea de un mes de evolución refería antecedentes de viaje a Indonesia. Este caso no es único, ya que *Cyclospora cayetanensis* ha sido descrita como causante de diarrea del viajero en individuos procedentes de esta región geográfica. En este sentido, investigando causas de diarrea en pacientes con SIDA, en un estudio realizado en Tailandia, se ha observado la presencia de *Cyclospora cayetanensis* en el 2,2%²⁵. Por otro lado, se ha descrito el caso de un matrimonio procedente de Indonesia, residente en Amsterdam, que manifestaba un proceso diarreico en cuyas heces se aislaron ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*¹³. En Holanda, se han estudiado 28 casos de infección por *Cyclospora cayetanensis* de los cuales, al menos la mitad, tenían antecedentes de viaje a Indonesia¹² y en un estudio realizado en Java investigando la presencia de este coccidio asociado a diarrea tanto en residentes extranjeros como en nativos se ha encontrado que *Cyclospora cayetanensis* es el principal protozoo causante de diarrea en residentes extranjeros sobre todo durante la estación húmeda y por el contrario, el parásito rara vez causa enfermedad en la población indígena¹⁸.

En España, los datos sobre la presencia de este parásito son todavía escasos, se estima que se encuentran entre el 2-4%, la mayoría asociados a diarreas del viajero¹⁹, aunque existe el caso de un paciente, residente en España, que no refiere antecedentes de viajes³³. Estos datos parecen indicar que *Cyclospora cayetanensis* es un parásito inusual aunque presen-

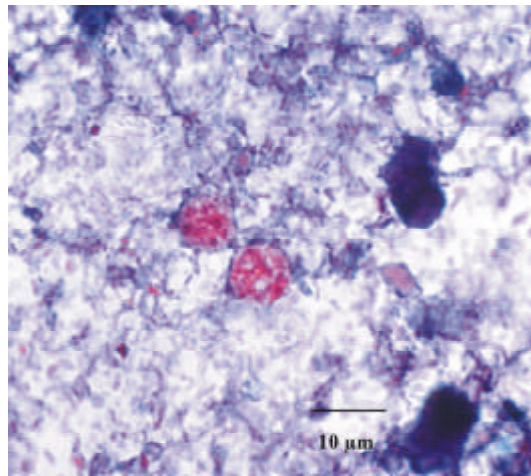


Figura 3. Ooquistes teñidos con la Tinción de Safranina modificada para *Cyclospora sp*

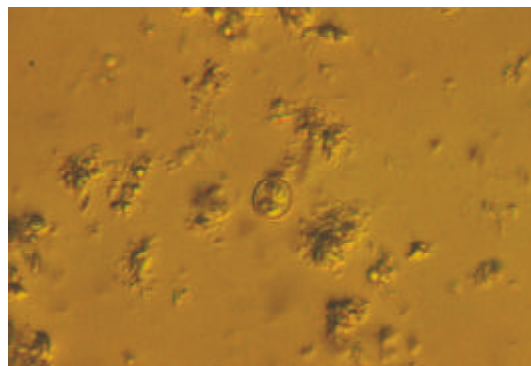


Figura 4. Test de esporulación. Ooquiste mostrando dos esporoquistes en su interior

te en nuestro país, y su determinación no se encuentra incluida en los protocolos rutinarios de estudio parasitológico de heces y como consecuencia de ello, su búsqueda no se realiza a menos que sea específicamente requerida. El uso en parasitología clínica de las técnicas ácido-alcohol resistentes ha facilitado la detección de lo que se denominó en un principio como "*Cryptosporidium grandes*"³⁴ o estructuras parecidas a *Cryptosporidium muris*³. Al paciente objeto de nuestro estudio se le aplicaron una combinación de los diferentes métodos de diagnóstico actualmente propuestos³⁵.

El organismo presentaba un diámetro de 8-10 μm que emitía autofluorescencia de color azul utilizando el filtro de 360 nm. Esta característica, descrita anteriormente³⁴, contrasta especialmente con los ooquistes de *Cryptosporidium* cuya autofluorescencia es tan baja que no tiene ningún valor diagnóstico³⁵. Las características morfotintoriales de estos parásitos son variables y la aplicación del método de Kinyoun[®] para ácido-alcohol resistentes, la técnica más utilizada para la identificación de coccidios en

muestras fecales (sobre todo en la determinación de *Cryptosporidium*), mostró una variabilidad que oscilaba desde la ausencia de tinción o ligeramente rosado hasta un intenso color rosa³⁶. La aplicación de la técnica de tinción de Safranina modificada⁶ permitió la observación de estos organismos de un color característico entre rojo a anaranjado. Esta técnica, basada en una modificación de métodos de tinción descritos previamente para la detección rápida de ooquistes de *Cryptosporidium* en muestras de heces^{37,38}, permite la tinción uniforme de los ooquistes de *Cyclospora* favoreciendo su identificación. Actualmente, este sistema se considera más adecuado que las técnicas ácido alcohol resistentes para la identificación específica del parásito objeto de nuestro estudio⁶.

Ortega, *et al.* (1993) ponen a punto un método de esporulación y exquistación que permite la identificación clara de los ooquistes de *Cyclospora cayetanensis*. Así, a partir de ooquistes concentrados y mantenidos en un 2,5% de dicromato potásico los incuban a 4°C, 25°C, 32°C y 37°C observando su esporulación a partir del día 5 en los cultivos que fueron mantenidos a 25 y 32°C. La esporulación completa, mediante la observación de los esporozoitos dentro de los esporoquistes se produce entre los días 7 y 13. No observa esporulación en aquellos cultivos mantenidos a 4 y 37°C. La exquistación con tripsina y taurocolato sódico permite la liberación de los esporozoitos en un tiempo de exposición de aproximadamente 40 minutos. En nuestra muestra se realizó únicamente el test de esporulación completándose este al cabo de 15 días donde el 50% de los ooquistes habían desarrollado dos esporoquistes en su interior.

De todo lo anterior se desprende que a pesar de ser aparentemente un parásito poco usual en nuestro país, tal y como se ha sugerido¹⁹ su diagnóstico debería considerarse en aquellos casos de coccidiosis con diarreas prolongadas, especialmente en viajeros. No debemos olvidar que el estudio *Cyclospora* no está contemplado en los métodos de diagnóstico rutinarios por lo que su presencia puede estar siendo subestimada tanto en nuestro país como en otras regiones del globo.

Bibliografía

1. Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *BioRev* 1998;73:203-66.
2. Ashford RW. Occurrence of an undescribed coccidian in man in Papua New Guinea. *Ann Trop Med Parasitol* 1979;73:497-500.
3. Ortega YR, Sterling CR, Gilman RH, Cama VA, Diaz F. *Cyclospora* species. A new protozoan pathogen of humans. *N Engl J Med* 1993;328:1308-12.
4. Bendall RP, Lucas S, Moody A, Towey G, Chiodini PL. Diarrhoea associated with cyanobacterium-like bodies: a new coccidian enteritis of man. *Lancet* 1993;341:590-2.
5. Di Gliullo AB, Cribari MS, Bava AJ, Cicconetti JS, Collazos R. *Cyclospora cayetanensis* in sputum and stool samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000;42:115-7.
6. Visvesvara GS, Moura H, Kovacs-Nace E, Wallace S, Eberhard ML. Uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified Safranin technique with microwave heating. *J Clin Microbiol* 1997;35:730-3.
7. Bern C, Hernández B, López MB, *et al.* Epidemiologic studies of *Cyclospora cayetanensis* in Guatemala. *Emerg Infect Dis* 1999;5:766-74.
8. Bern C, Ortega Y, Checkley W, *et al.* Epidemiologic differences between cyclosporiasis and cryptosporidiosis in Peruvian children. *Emerg Infect Dis* 2002;8:581-5.
9. Eberhard ML, Da Siva AJ, Lilley BG, Pieniaszek NJ. Morfologic and molecular characterization of new *Cyclospora* species from ethiopian monkeys: *C. cercopitheci* sp.n., *C. colobosi* sp. n and *C. papionis* sp. n. *Emerg Infect Dis* 1999;5:651-8.
10. Eberhard ML, Ortega YR, Hanes DE, *et al.* Attempts to establish experimental *Cyclospora cayetanensis* infection in laboratory animals. *J Parasitol* 2000;86:577-82.
11. López AS, Bendik JM, Alliance J, *et al.* Epidemiology of *Cyclospora cayetanensis* and other intestinal parasites in a community in Haiti. *J Clin Microbiol* 2003;41:2047-54.
12. Van Gool T, Dankeret J. Emerging protozoal infections in The Netherlands: *Cyclospora*, *Dientamoeba* and *microspora* infections. *Ned Tijdschr Geneesk* 1996;20:155-60.
13. Lammers HA, van Gool T, Eeftinck Schattenkerk JK. 2 patients with diarrhea caused by *Cyclospora cayetanensis* following a trip to the tropics. *Ned Tijdschr Geneesk* 1996;140:890-2.
14. Crowley B, Path C, Moloney C, Keane CT. *Cyclospora* species-a cause of diarrhoea among Irish travellers to Asia. *Ir Med J* 1996;89:110-2.
15. Clarke SC, McIntyre M. The incidence of *Cyclospora cayetanensis* in stool samples submitted to a district general hospital. *Epidemiol Infect* 1996;117:189-93.
16. Petry F, Hofstatter J, Shulz BK, Dietrich G, Jung M, Schirmacher P. *Cyclospora cayetanensis*: first imported infections in Germany. *Infection* 1997;25:167-70.
17. Jelinek T, Lotze M, Eichenlaub S, Loscher T, Nothdurft HD. Prevalence of infection with *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* among international travellers. *Gut* 1997;41:801-4.

18. Fryauff DJ, Krippner R, Prodjodipuro P, et al. *Cyclospora cayetanensis* among expatriate and indigenous populations of West Java, Indonesia. *Emerg Infect Dis* 1999;5:584-8.
19. Gascón J, Alvarez M, Valls ME, Bordas JM, Jimenez de Anta MT, Corachan M. Cyclosporiasis: estudio clínico epidemiológico en viajeros con *Cyclospora cayetanensis* importada. *Med Clin* 2001;116:461-4.
20. Hoge CW, Echeverria P, Rajah R, et al. Prevalence of *Cyclospora* species and other enteric pathogens among children less than 5 years of age in Nepal. *J Clin Microbiol* 1995;33:3058-60.
21. Madico G, McDonald J, Gilman RH, Sterling CR. Epidemiology and treatment of *Cyclospora cayetanensis* infection in Peruvian children. *Clin Infect Dis* 1997;24:977-81.
22. Herwaldt BL, Ackers ML. *Cyclospora* Working Group. An outbreak in 1996 of cyclosporiasis associated with imported raspberries. *N Engl J Med* 1997;336:1548-56.
23. Cáceres VM, Ball RT, Somerfeldt SA, et al. A foodborne outbreak of cyclosporiasis caused by imported raspberries. *J Farm Pract* 1998;47:231-4.
24. Ho AY, López AS, Eberhart MG, et al. Outbreak of cyclosporiasis associated with imported raspberries, Philadelphia, Pennsylvania. *Emerg Infect Dis* 2002;8:783-8.
25. Manatsathit S, Tansupasawasdikul S, Wanachinawin D, et al. Causes of chronic diarrhea in patients with AIDS in Thailand: a prospective clinical and microbiological study. *J Gastroenterol* 1996;31:533-7.
26. el Naga IF, Negm AY, Awadalla HN. Preliminary identification of an intestinal coccidian parasite in man. *J Egypt Soc Parasitol* 1998;28:807-14.
27. Mosimann M, Nguyen XM, Furrer H. Excessive watery diarrhea and pronounced fatigue due to *Cyclospora cayetanensis* infection in an HIV infected traveler returning from the tropics. *Schweiz Med Wochenschr* 1999;21:1158-61.
28. Santana AM, Nuñez FA, Pérez J, Barrero M, Velazquez B. Emergence of a new pathogen: *Cyclospora cayetanensis* in patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev Cubana Med Trop* 2000;52:66-9.
29. Berlin OGW, Contreas CN, Sowerby TM. Detection of *Isospora* in the stools of AIDS patients using a new rapid autofluorescence technique. *AIDS* 1996;10:442-3.
30. Ortega YR, Sterling CR, Gilman RH, Cama VA, Diaz F. *Cyclospora cayetanensis*: a new protozoan pathogen of humans. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47:210.
31. Herwaldt BL. *Cyclospora* cayetanensis: a review, focusing on the outbreaks of cyclosporiasis in the 1990s. *Clin Infect Dis* 2000;31:1040-57.
32. Shlim DR, Cohen MT, Eaton M, Rajah R, Long EG, Ungar BLP. An alga-like organism associated with outbreak of prolonged diarrhea among foreigners in Nepal. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45:383-9.
33. Ibáñez R, Álvarez D, Gonzalo A, Sánchez-Zaballos I, Hernández JM. Diarrea prolongada en adulto inmunocompetente. *Enf Infecc Microbiol Clin* 1999;17:529-30.
34. Long EG, Ebrahimzadeh A, White EH, Swisher B, Callaway CS. Alga associated with diarrhea in patients with acquired immunodeficiency syndrome and in travels. *J Clin Microbiol* 1990;28:1101-4.
35. Eberhard ML, Pieniazek NJ, Arrowood MJ. Laboratory diagnosis of *Cyclospora* infections. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:792-7.
36. García LS, Bruckner DA. Diagnostic medical parasitology, 2nd ed. *American Society for Microbiology*. Washington DC, 1993.
37. Baxby D, Blundell N, Hart CA. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. *J Hyg Cambridge* 1984;92:317-733.
38. Hafiz S, Spencer RC, Lee M, Gooch H, Duerden BI. Use of microwaves for acid and alcohol fast staining. *J Clin Pathol* 1985;38:1073-6.