



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
ISSN: 0325-2957
actabioq@fbpba.org.ar
Federación Bioquímica de la Provincia de
Buenos Aires
Argentina

Del Coco, Valeria Fernanda; Córdoba, María Alejandra; Basualdo, Juan
Comparación de tres técnicas de concentración de heces para recuperar ooquistes de
Cryptosporidium
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 42, núm. 3, julio-septiembre, 2008, pp. 333-337
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53510975004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org



Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Comparación de tres técnicas de concentración de heces para recuperar ooquistes de *Cryptosporidium*

Comparison of three stool concentration techniques for recovering Cryptosporidium oocysts

► Valeria Fernanda Del Coco^{1*,**}, María Alejandra Córdoba^{2*,**}, Juan Basualdo^{3*}

1. Médico

2. Doctora en Ciencias de la Salud

3. Doctor en Medicina

* Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina.

** Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Calle 526 e/10 y 11, 1900 La Plata, Argentina.

Resumen

Cryptosporidium es un parásito causante de cryptosporidiosis. Su estadio infeccioso, el ooquiste, se elimina con las heces del hospedador, representando los terneros la principal fuente de infección humana. El objetivo de este trabajo fue comparar tres métodos de concentración de heces para recuperar ooquistes de *Cryptosporidium*. Fueron estudiados un total de 166 terneros. Una única muestra de materia fecal fresca fue analizada por los métodos de Telemann modificado, agua éter, y Tris Tween 80. La identificación de ooquistes fue realizada mediante coloración de Kinyoun modificada. El número de ooquistes concentrados por cada técnica fue cuantificado en 20 campos a 1000X. Del total de muestras analizadas, 22/166 fueron positivas para *Cryptosporidium*. El número medio de ooquistes recuperados por cada técnica fue: Telemann modificada (124,2±159,5), agua éter (153,0±156,3), tris Tween 80 (92,2±98,3). ANOVA mostró que no existen diferencias significativas entre métodos. De acuerdo con los resultados obtenidos, las tres técnicas pueden ser empleadas para concentrar ooquistes de *Cryptosporidium*. Si bien los tres métodos presentaron igual sensibilidad y especificidad, la técnica de agua éter demostró ser sencilla, de bajo costo, y efectiva para recuperar ooquistes, particularmente si se requiere conservar la viabilidad de los mismos.

Palabras clave: *Cryptosporidium* * diagnóstico parasitológico * técnicas de concentración de materia fecal

Summary

Cryptosporidium is a parasite which causes cryptosporidiosis. Its infectious stage, the oocyst, is eliminated with the host feces, calves being the main source of human infection. The aim of the present work was to compare three methods of feces concentration to recover *Cryptosporidium* oocysts. A total of 166 calves were studied. An only sample of fresh feces was analyzed using the following methods: modified Telemann, water ether, and Tris Tween 80. The identification of oocysts was carried out by modified staining

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

Kinyoun technique. The number of concentrated oocysts per technique was quantified in 20 fields at 1000X. From a total of 166 analyzed samples, 22 were Cryptosporidium positive. The average number of recovered oocysts per technique was: modified Telemann (124.2 ± 159.5), water ether (153.0 ± 156.3), Tris Tween 80 (92.2 ± 98.3). ANOVA demonstrated that there are no significant differences between these methods. According to the results obtained, the three techniques may be used to concentrate Cryptosporidium oocysts. Even if there are no differences in sensibility and specificity between these methods, the water ether technique proved to be simple, low-cost, and effective to recover oocysts, particularly if the oocysts condition is to be kept.

Key words: *Cryptosporidium* * parasitological diagnostic * stool concentration techniques

Introducción

Cryptosporidium spp. es un parásito protozoo, coccidio entérico, causante de cryptosporidiosis en más de 150 especies de mamíferos. El hombre y el ganado vacuno constituyen los principales reservorios de la infección (1).

El ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. se desarrolla en las células del epitelio gastrointestinal y culmina con la producción de ooquistes, los cuales se eliminan con las heces del hospedador y permiten la diseminación, supervivencia ambiental y preservación de la capacidad infectiva del parásito (2). El agua contaminada con ooquistes provenientes de materia fecal humana y/o animal representa la principal fuente de infección para el hombre (3) (4). Más de 45 brotes de cryptosporidiosis transmitida a través de agua de consumo han sido reportados a nivel mundial (5). La única medida profiláctica es evitar la ingestión de ooquistes, ya que éstos son resistentes a los tratamientos convencionales de potabilización (6).

La infección por *Cryptosporidium* spp. produce diarrea aguda, normalmente autolimitada, en individuos inmunocompetentes (7). En presencia de inmunodeficiencia primaria o secundaria, la diarrea producida por *Cryptosporidium* spp. puede ser persistente y desencadenar deshidratación grave con riesgo de muerte. Las personas afectadas por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) son particularmente susceptibles a formas graves de cryptosporidiosis, sobre todo cuando el recuento plasmático de linfocitos CD4+ es menor a 200 células/mm³ (3).

El diagnóstico de cryptosporidiosis intestinal se efectúa mediante búsqueda e identificación de ooquistes en materia fecal (8). La liberación intermitente de ooquistes, característica de las infecciones intestinales producidas por protozoos, puede dificultar el diagnóstico de esta parasitosis sobre todo en presencia de formas asintomáticas de la infección (9). Distintos métodos de flotación y sedimentación son utilizados para concentrar ooquistes en materia fecal (10). Diversos

autores consideran que los métodos de sedimentación logran recuperar mayor cantidad de ooquistes respecto a los métodos de flotación. Bukhari *et al.* (11) demostraron que la técnica de agua éter recuperó mayor cantidad de ooquistes en comparación con la flotación de azúcar y de sulfato de zinc. Resultados similares han sido reportados por Casemore *et al.* (12) y Weber *et al.* (13), utilizando como métodos de sedimentación las técnicas de formol-éter y formol-acetato de etilo.

El objetivo de este trabajo fue comparar tres métodos de concentración por sedimentación para recuperar ooquistes de *Cryptosporidium* en materia fecal fresca.

Materiales y Métodos

PERÍODO Y ÁREA DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo durante el año 2006 en un tambo lechero de la localidad de General Mansilla, partido de Magdalena, provincia de Buenos Aires.

TOMA Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Fueron estudiados un total de 166 terneros menores de 30 días de edad. De cada uno de estos, una única muestra de materia fecal fue obtenida por tacto rectal utilizando guantes de látex estériles, y recolectada en recipiente plástico individual. Las muestras fueron remitidas al laboratorio y conservadas en frío a 4 °C hasta su análisis. Las muestras obtenidas fueron clasificadas de acuerdo con sus características macroscópicas en heces firmes y diarreicas siguiendo los criterios descriptos por McAllister *et al.* (14).

Cada muestra obtenida fue analizada por los siguientes métodos:

Telemann modificado (15). Una parte de materia fecal fue homogeneizada con dos partes de formol sal, filtrada con doble gasa, y colocada en tubo de centrifuga, adicionándosele 2 mL de éter. El tubo fue agita-

do y centrifugado a 350 x *g* durante 3 min. El sobrenadante fue descartado.

Agua éter (11). Una parte de materia fecal fue homogeneizada con dos partes de agua destilada. La dilución obtenida fue agitada en un "vortex" durante 20 s filtrada con doble gasa y recolectada en un tubo de centrifuga, adicionándosele 2 mL de éter. El tubo fue agitado y centrifugado a 250 x *g* durante 5 min. El sobrenadante fue descartado.

Tris Tween 80 (16). Cuatro mililitros de materia fecal fueron incorporados a un tubo de centrifuga que contenía 16 mL de solución compuesta por 50 mM de tris y 0,5 v/v de Tween 80. La dilución fue agitada 1 min y filtrada con doble gasa, recolectada y centrifugada durante 10 min a 250 x *g*. El sobrenadante fue descartado. Posteriormente, 10 mL de agua destilada fueron adicionados al tubo y centrifugado a 250 x *g* durante 5 min. El sobrenadante obtenido fue descartado. Diez mililitros de agua destilada fueron agregados y la operación fue repetida.

La identificación de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. recuperados por cada técnica fue realizada mediante coloración de Kinyoun modificada (12). Las muestras consideradas positivas para *Cryptosporidium* spp. fueron aquellas en las cuales los ooquistes visualizados presentaron las propiedades ópticas, estructuras internas, tamaño y forma descritas por Arrowood (17). El número de ooquistes concentrados por cada técnica fue estimado semicuantitativamente de acuerdo con el promedio de ooquistes por campo en un total de 20 campos observados a 1000X, según criterio adaptado de Castro-Hermida, *et al.* (18): I (<1 ooquiste); II (≥ 1 , <6 ooquistes); III (≥ 6 , <10 ooquistes); IV (≥ 10 ooquistes).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se empleó análisis de varianza (ANOVA); para corregir el error de significación se empleó el test de Tukey. Se usó el programa SPSS, versión 11.5.

Para cada método se determinó sensibilidad diagnóstica (SD), especificidad (E), valor predictivo del resultado positivo (VPRP) y valor predictivo del resultado negativo (VRPN), valor global de la prueba (VGP), razón de verosimilitud positiva (RVP) y razón de verosimilitud negativa (RVN). Como prueba de referencia se consideró a la técnica de Telemann modificada (15).

Resultados

Del total de muestras analizadas, el 13,25% (22/166) fueron positivas para *Cryptosporidium* spp. por los tres métodos de sedimentación empleados. To-

das las muestras que resultaron positivas utilizando una técnica de concentración determinada, también lo fueron para las dos restantes. Al correlacionar presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. y características macroscópicas de la materia fecal, la totalidad de las heces formes resultaron negativas. Todas las muestras positivas para *Cryptosporidium* spp. fueron diarreas. El promedio total de ooquistes recuperados por cada técnica se detalla en la Tabla I. ANOVA mostró que no existen diferencias significativas entre los métodos utilizados para la recuperación de ooquistes ($p=0,38$). En la Figura 1 se detalla la distribución porcentual de muestras según número de ooquistes cuantificados por cada técnica empleada.

Los resultados de SD, E, VPRP, VRPN, VGP, RVN y RVP, para un nivel de confianza del 95%, se detallan en la Tabla II.

Discusión y Conclusiones

La aplicación de técnicas de concentración de materia fecal resulta efectiva en el diagnóstico de cryptosporidiosis intestinal, ya que aumenta la sensibilidad de la observación microscópica, sobre todo cuando la excreción de ooquistes es escasa o intermitente (5). Los métodos de sedimentación son los más implementados en el diagnóstico parasitológico de rutina, siendo la técnica de Telemann modificada el

Tabla I. Recuento de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. según método empleado para su recuperación en heces de terneros

Método	\bar{x}	DE
Telemann modificado	124,2	$\pm 159,5$
Agua éter	153,0	$\pm 156,3$
Tris-Tween 80	92,2	$\pm 98,3$
DE: Desvío estándar		

Tabla II. Comparación de métodos de concentración de heces de terneros para recuperar ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

	Agua éter	Tris tween 80
SD	100%	100%
E	100%	100%
VPRP	100%	100%
VRPN	100%	100%
VGP	100%	100%
RVP	1	1
RVN	0	0

SD: sensibilidad diagnóstica, E: especificidad, VPRP: valor predictivo del resultado positivo, VRPN: valor predictivo del resultado negativo, VGP: valor global de la prueba, RVP: razón de verosimilitud positiva, RVN: razón de verosimilitud negativa.

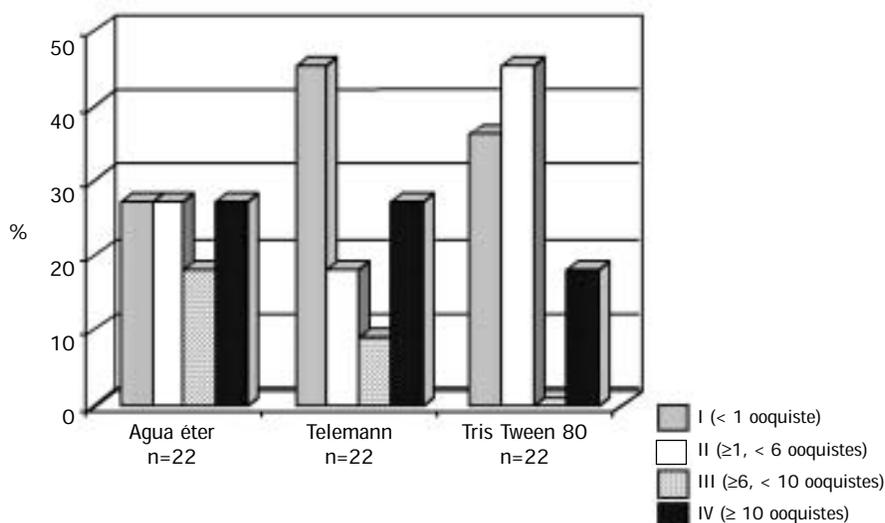


Figura 1. Distribución porcentual de muestras de heces de terneros según número de ooquistes de *Cryptosporidium spp.* cuantificados por cada técnica empleada.

método de elección (15). Sin embargo, en el presente trabajo se ha demostrado que no existen diferencias significativas en la recuperación de ooquistes mediante el empleo de esta técnica en comparación con los otros métodos estudiados. De acuerdo con los resultados expuestos, se puede afirmar que los tres métodos de concentración estudiados tienen igual sensibilidad y especificidad diagnóstica. Estos resultados son discordantes con los obtenidos por Kuczynska *et al.* (16) quienes mediante la utilización de Tris Tween 80, lograron mejorar la recuperación de ooquistes de *Cryptosporidium spp.*, sin resultar efectiva la utilización de agua destilada como solución dispersante. Según los resultados obtenidos en el presente estudio, la utilización de agua destilada en la técnica de agua éter resultó efectiva, obteniéndose el mayor promedio de ooquistes recuperados. Estos resultados son similares a los descritos por Bukhari *et al.* (11).

En relación con la visualización microscópica de las muestras procesadas por las tres técnicas, Tris Tween 80 resultó la más efectiva debido a la menor cantidad de detritus presentes. Sin embargo, al relacionar el porcentaje de muestras según criterio de cuantificación de ooquistes, la mayor proporción de las muestras procesadas por esta técnica reveló entre < 1, < 6 ooquistes/campo. Las técnicas de Telemann modificada y agua éter recuperaron el mayor porcentaje de muestras con más de 10 ooquistes/campo. En base a los resultados alcanzados, la técnica de Tris Tween 80 permite obtener muestras más limpias, pero tiene la desventaja de disminuir el número de oo-

quistes recuperados, situación que se ve reflejada en el elevado número de muestras con bajas concentraciones de ooquistes. Esto estaría vinculado con los sucesivos lavados a los que se ve sometida la muestra durante su procesamiento. Por lo tanto, esta técnica resulta poco efectiva si se requiere concentrar un elevado número de ooquistes para realizar modelos de infectividad.

En cuanto a la practicidad en la ejecución de los métodos evaluados, las técnicas de Telemann modificada y agua éter resultaron las más sencillas, siendo además esta última la más conveniente desde el punto de vista económico.

En ensayos de infectividad y en estudios epidemiológicos que requieran evaluar la viabilidad de los ooquistes recuperados, es importante considerar que la técnica empleada no altere los mismos. Se ha demostrado que la solución de formol utilizada en la técnica de Telemann modificada altera la viabilidad de los ooquistes de *Cryptosporidium spp.* (19). A tal efecto, puede ser empleada la técnica de agua éter.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que las tres técnicas pueden ser utilizadas para concentrar ooquistes de *Cryptosporidium spp.* Si bien todos los métodos de concentración empleados demostraron tener igual sensibilidad y especificidad, la técnica de agua éter demostró ser sencilla, de bajo costo, y efectiva para recuperar ooquistes de *Cryptosporidium spp.*, particularmente si se requiere conservar la viabilidad de los ooquistes con fines epidemiológicos o experimentales.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (Resolución n° 673/06) y la Fundación Alberto J. Roemmers.

Los autores agradecen muy especialmente al Dr. Miguel Rizzo, profesional de apoyo de la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires, por su desinteresada colaboración en el análisis estadístico.

CORRESPONDENCIA

PROF. DR. JUAN BASUALDO

Cátedra de Microbiología y Parasitología

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de La Plata

60 y 120.

1900 LA PLATA. Provincia de Buenos Aires, Argentina

Referencias bibliográficas

1. Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* 2004; 126(1-2): 37-56.
2. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1305-22.
3. Xiao L, Morgan UM, Fayer R, Thompson RC, Lal AA. *Cryptosporidium* systematics and implications for public health. *Parasitol Today* 2000; 16(7): 287-92.
4. Franzen C, Müller A. Cryptosporidia and Microsporidia waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34: 245-62.
5. Cacciò SM, Pozio E. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006; 4 (3): 429-43.
6. Rochelle P, Marshall MM, Mead JR, Johnson AM, Kovich DG, Rosen JS, *et al.* Comparison of *in vitro* cell culture and a mouse assay for measuring infectivity of *Cryptosporidium parvum*. *Appl Env Microbiol* 2002; 68 (8): 3809-17.
7. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect* 2002; 4 (10): 1047-58.
8. Petry F. Laboratory diagnosis of *Cryptosporidium parvum* infection. In: Petry F, editor: *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis*. Contri Microbiol Basel, Karger 2000; 6: 33-49.
9. Chappell CL, Okhuysen PC, Sterling CR, DuPont HL. *Cryptosporidium parvum*: intensity of infection and oocyst excretion patterns in healthy volunteers. *J Infect Dis* 1996;173 (1): 232-6.
10. Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. *Clin Lab Med* 1991; 11 (4): 873-97.
11. Bukhari Z, Smith HV. Effect of three concentration techniques on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from bovine feces. *J Clin Microbiol* 1995; 33 (10): 2592-5.
12. Casemore DP, Armstrong M, Sands RL. Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *J Clin Pathol* 1985 ;38 (12): 1337-41.
13. Weber R, Bryan RT, Juranek DD. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *J Clin Microbiol* 1992; 30 (11): 2869-73.
14. McAllister TA, Olson ME, Fletch A, Wetzstein M, Entz T. Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia. *Can Vet J* 2005; 46 (1): 47-55.
15. Feldman R, Guardis M. Diagnóstico coproparasitológico. La Plata: Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires; 1990.
16. Kuczynska E, Shelton DR. Method for detection and enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocysts in feces, manures, and soils. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65 (7): 2820-6.
17. Arrowood MJ. Diagnosis. In: Fayer R, editor. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Boca Raton FL: CRC Press Inc.; 1997. p. 43-64.
18. Castro-Hermida JA, Gonzalez-Losada YA, Mezo-Mendez M, Ares-Mazas E. A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. *Vet Parasitol* 2002; 106 (1): 11-7.
19. Fayer R, Speer CA, Dubey JP. The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer R, editor. *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*. Boca Raton FL: CRC Press Inc.; 1997. p. 1-64.

Aceptado para su publicación el 17 de junio de 2008