
Método rápido para la observación de *Cryptosporidium* en heces

MIRIAN ASTUDILLO, GRACIELA BARONA

Entre agosto de 1990 y diciembre de 1991 se examinaron 120 muestras de materia fecal de niños o adultos que consultaron por diarrea, sugestiva de ser causada por *Cryptosporidium* spp. En todos los casos se realizó la coloración con Lugol-Nígrósina, que proponemos, y se hizo la confirmación con la de Ziehl Neelsen modificada, pese a su limitación de teñir con el mismo patrón de coloración el *Cryptosporidium* y estructuras diferentes a él. En 20 (16.6%) muestras (12 de niños y 8 de adultos) se identificaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp y todas se confirmaron como positivas por la coloración de Ziehl Neelsen modificada. Dado que no siempre es fácil la observación de parásitos de poca prevalencia sugerimos esta coloración como ensayo de rutina porque ayuda a distinguir los ooquistes de *Cryptosporidium* y mejora la observación de todos los protozoarios.

PALABRA CLAVE

CRYPTOSPORIDIUM

INTRODUCCION

Cryptosporidium spp es una coccidia catalogada como agente etiológico de diversas

enfermedades entre las cuales se encuentran la respiratoria (1) y la hepatobiliar e intestinal; causa diarreas cuyo curso depende del estado inmune del paciente: son agudas y autolimitadas en animales y en humanos inmunocompetentes (2) de cualquier edad (3-18) y de curso crónico en pacientes inmunosuprimidos.

Para establecer el diagnóstico de cryptosporidiosis a partir de muestras clínicas o preservadas existen diversas técnicas (19-22) entre ellas las histológicas, las tintoriales y las serológicas. Entre las técnicas tintoriales se cuentan las siguientes:

- a) Fresco con lugol Dantoni
- b) Campo oscuro
- c) Truant auramina rodamina
- d) Ziehl-Neelsen en frío modificado
- e) Naranja de acridina
- f) Coloración con fluoresceína o biotina

Las técnicas serológicas incluyen el ensayo inmunoenzimático para detectar antígeno y la aglutinación con partículas de látex.

El propósito del presente artículo es proponer una alternativa para el diagnóstico rápido de cryptosporidiosis a través de la observación con objetivo de gran

MIRIAN ASTUDILLO, Magíster en Microbiología, Departamento de Microbiología, Universidad del Valle. GRACIELA BARONA, Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Departamento de Microbiología, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

aumento en microscopio compuesto, coloreando las heces con Lugol y Nigrosina. Este método se puede estandarizar como un procedimiento de rutina en el diagnóstico coprológico.

MATERIALES Y METODOS

Entre agosto de 1990 y diciembre de 1991 se observaron 120 muestras de materia fecal de pacientes con diarrea, de diversa procedencia, así: 70 niños menores de 12 meses que consultaron por diarrea de más de 3 días de duración al Hospital Infantil Club Noel de Cali; 30 adultos VIH positivos, con diarrea, que acudieron a la Sección de Epidemiología de la Clínica Rafael Uribe del ISS-Valle y 20 adultos que consultaron al Hospital Evaristo García, de Cali, y que fueron remitidos al Laboratorio Clínico del mismo hospital con diagnóstico presuntivo de cryptosporidiosis.

En el Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle se llevaron a cabo los análisis de la siguiente manera: con las muestras se hicieron dos montajes en portaobjetos; para el primero se preparó una suspensión de heces en solución salina fisiológica de tal forma que al colocar debajo un papel impreso difícilmente se distinga la impresión; se añadieron una gota de Lugol (Iodine Sigma 3380 y yoduro de potasio Merck 5043) y una de Nigrosina (Sigma 4754 preparada en formol, Merck 4003); luego se mezcló con un aplicador y por último se colocó un cubreobjetos; se observó de inmediato con objetivo de inmersión buscando los ooquistes incoloros, refráctiles, ovals o esféricos, con 5-6 micrómetros de diámetro y que contienen 4 esporozoitos. No captan el color oscuro de la Nigrosina.

En el segundo portaobjetos se realizó un extendido que, luego de secar, se fijó y coloreó con la técnica de Ziehl-Neelsen (ZN), para observar con objetivo de inmersión y buscar ooquistes rojos, con una depresión central blanquecina y escasos gránulos en su interior.

Preparación de la nigrosina: se mezclaron 10 gramos de Nigrosina y 100 ml de formol al 10%; la mezcla se disolvió en bañomaria hirviendo durante 30 minutos, teniendo cuidado de reponer el formol evaporado; después se pasó a través de papel de filtro doble Whatman N° 1.

Preparación del lugol Dantoni: se disolvieron 5 gramos de yodo y 10 de yoduro de potasio en 100 ml de

agua destilada; esta solución se empleó hasta por tres semanas, diluida al 1:5 (21).

RESULTADOS

Veinte de las 120 muestras analizadas (16.6%) resultaron positivas tanto con Lugol-Nigrosina como con ZN modificado. Las restantes fueron negativas por las dos técnicas.

Doce de las muestras positivas fueron de pacientes del Club Noel; 4 de los del ISS y 4 de los del Hospital Evaristo García. Se observaron 0-3 ooquistes por campo de alto poder con la coloración de Lugol y Nigrosina y 0-4 con la de ZN. Al observar con objetivo de inmersión las preparaciones coloreadas con Lugol y Nigrosina los ooquistes se distinguen porque son incoloros, ovals o esféricos, con 5-6 micrómetros de diámetro y 4 esporozoitos; revelan una estructura externa de doble pared; no captan el color de la Nigrosina sino que se observan refráctiles (Figura N° 1).

DISCUSION

En cuanto al diagnóstico diferencial, las levaduras tienen un patrón de coloración variado: unas veces se tiñen completamente (Figura N° 2), otras no toman la coloración (Figura N° 3) o se observan vacuoladas o encapsuladas. La presencia de gemación ayuda a distinguirlas (Figura N° 4).

Según la literatura los ooquistes se pueden observar en el coprológico con solución salina y lugol pero no es fácil identificarlos con exactitud cuando son muy escasos (21); por lo tanto el diagnóstico de rutina se basa en la observación de extendidos coloreados con la técnica de ZN modificado o con algún otro método según las facilidades del laboratorio, pero no con lugol ya que sin suficiente experiencia se dificulta mucho distinguirlas con pequeños aumentos.

Una limitación al utilizar el lugol es que al cabo de 15 minutos de contacto con él se colorean algunos ooquistes lo que lleva a confusión con levaduras si se toma como criterio que éstas pueden colorearse con dicho reactivo.

Por investigaciones anteriores, y debido a la propiedad que tienen los ooquistes de ser ácido-alcohol resistentes, se sabe que la técnica de ZN modificada es útil para diferenciar ooquistes de *Cryptosporidium*, aunque se pueden encontrar en algunos casos

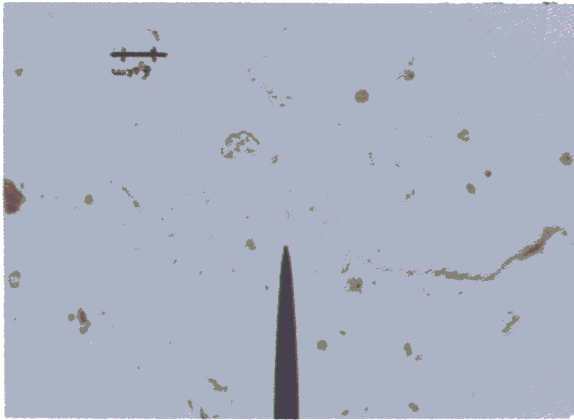


FIGURA N° 1
OOQUISTE DE *CRYPTOSPORIDIUM* EN UNA MUESTRA DE MATERIA FECAL (LUGOL-NIGROSINA 100X).

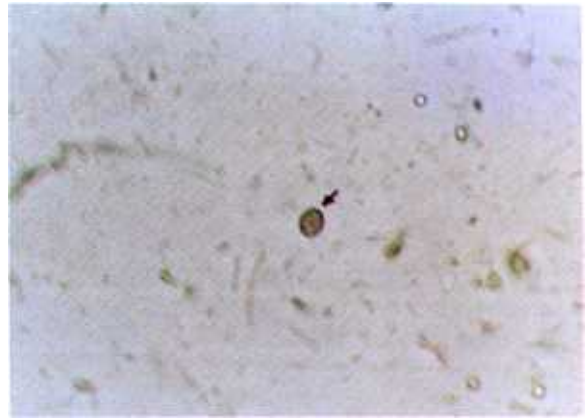


FIGURA N° 2
LEVADURA EN UNA MUESTRA DE MATERIA FECAL (LUGOL-NIGROSINA 100X). NOTESE LA TOMA DEL LUGOL.

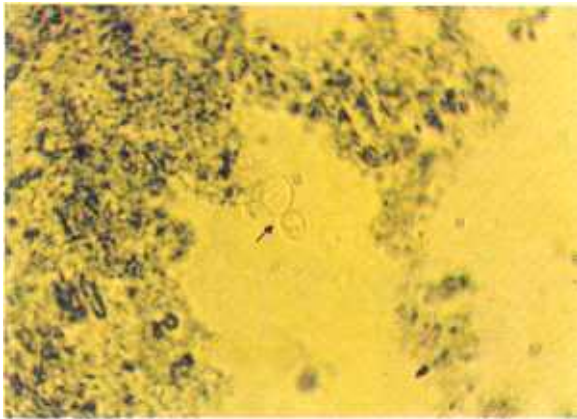


FIGURA N° 3
LEVADURA EN UNA MUESTRA DE MATERIA FECAL (LUGOL-NIGROSINA 100X). NOTESE QUE NO HUBO TOMA DEL LUGOL.

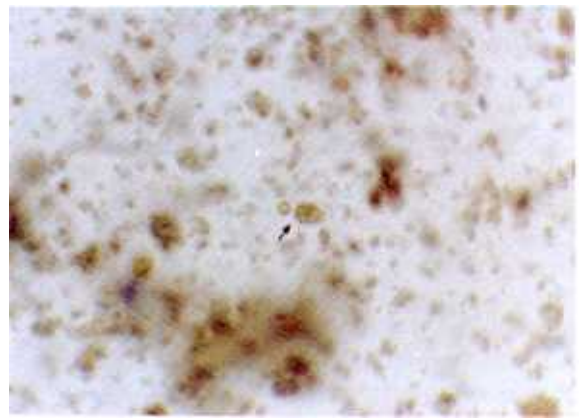


FIGURA N° 4
LEVADURA CON GEMACION EN UNA MUESTRA DE MATERIA FECAL (LUGOL-NIGROSINA 100X).

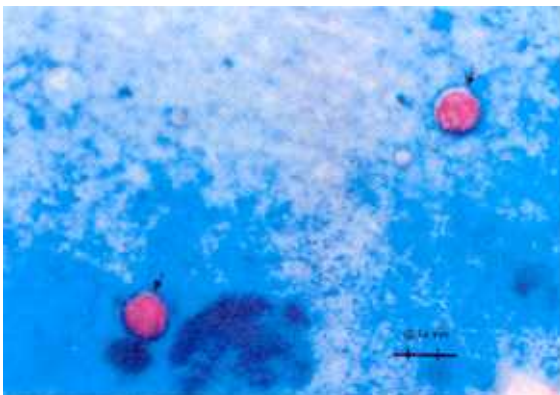


FIGURA N° 5
ESTRUCTURAS VEGETALES (ZIEHL-NEELSEN 100X).

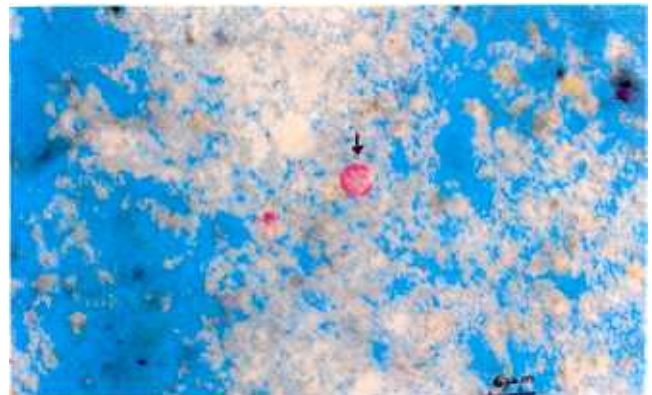


FIGURA N° 6
OOQUISTE DE *CRYPTOSPORIDIUM* (ZIEHL-NEELSEN 100X).

estructuras vegetales que se tiñen con el mismo patrón de coloración; sin embargo, éstas son más grandes y tienen contenido vacuolar (Figura N° 5); para el observador poco entrenado tales estructuras vegetales pueden diagnosticarse como ooquistes de *Cryptosporidium* con la coloración ZN pero no con Lugol y Nigrosina observando con objetivo de gran aumento y en campo claro; así se puede fácilmente establecer que la estructura observada no corresponde a un ooquiste de *Cryptosporidium*. A pesar de esto se utilizó la técnica de coloración ZN con la cual los ooquistes se colorean de rojo brillante con diferentes grados de intensidad y algunos contienen gránulos oscuros (Figura N° 6). Las levaduras en cambio se tiñen de color azul o rosa pálido.

Concluimos que la coloración con Lugol y Nigrosina es un procedimiento sencillo, no invasivo, de bajo costo y alto beneficio para observar los ooquistes de *Cryptosporidium*.

SUMMARY

RAPID METHOD FOR DETECTION OF *CRYPTOSPORIDIUM* IN STOOLS

We examined 120 stool specimens from patients with diarrheal disease, suspected of being infected with *Cryptosporidium*. Preliminary observation was made with a Lugol-Nigrosine stain and confirmation with modified Ziehl-Neelsen. Twenty specimens (12 from children and 8 from adults) (16.6%) were positive for *Cryptosporidium* oocysts and every one of them was confirmed with ZN stain. Since it may be difficult to detect low-prevalence parasites we suggest routine use of Lugol-Nigrosine which is useful for the detection of *Cryptosporidium* as well as of other protozoa.

BIBLIOGRAFIA

1. FORGACS P, TARSHIS A, PEARL MA, et al. Intestinal and bronchial *Cryptosporidium* in an immunodeficient homosexual man. *Ann Intern Med* 1983; 99: 793-794.

2. TZIPONI S. Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microb Reviews* 1983; 47: 84-96.
3. CASEMORE DP, SANDS RL, CURRY A. *Cryptosporidium* species: a new human pathogen. *J Clin Microbiol* 1985; 38: 1321-1336.
4. SCHULTZ MG. Emerging zoonoses. *New Engl J Med* 1983; 308: 1285-1286.
5. RAHMAN AS, SANYAL MH, AL AHMUD JC, et al. Cryptosporidiosis in calves and their handlers in Bangladesh. *Lancet* 1984; 28: 221.
6. HOLLEY HP, DOVER C. *Cryptosporidium*. A common cause of parasitic diarrhea in otherwise healthy individuals. *J Infect Dis* 1986; 153: 365-367.
7. DANTONIO RG, WINN RG, TAYLOR JP. A waterborne outbreak of *Cryptosporidium* in normal hosts. *Ann Intern Med* 1985; 103: 886-888.
8. BLAGBURN BL, CURRENT WL. Accidental infection of a researcher with human cryptosporidiosis. *J Infect Dis* 1983; 148: 772-773.
9. KOCH KL, PHILLIPS DS, AHER RC, CURRENT WL. Cryptosporidiosis in hospital personnel. Evidence for person to person transmission. *Ann Intern Med* 1985; 102: 593-596.
10. MEISSEL JL, PERERA DR, MEDRIGO C, RUBIN CE. Overwhelming water diarrhea associated with *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterol* 1976; 70: 1156-1160.
11. CURRENT WL, HAYNES TB. Complete development of *Cryptosporidium* in cell culture. *Science* 1984; 224: 603-605.
12. NIME FA, BUREK JD, PAGE DL, HALSCHEN MA, YARDLEY JH. Acute enterocolitis in a human being infected with a protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterol* 1976; 70: 592-598.
13. JOKIPPI AM, HEMILA M, JOKIPPI N. Estudio prospectivo sobre la adquisición de *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* y enfermedad gastrointestinal. *Lancet* (ed. esp) 1986; 8: 49-51.
14. GONZALEZ-CELI B, REYES A, CONDE CJ, JAIMES EC. Cryptosporidiosis. *Infectología* 1985; 5: 140-145.
15. CURRENT WL, REESE NC, ERNEST JV, et al. Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons: studies of an outbreak and experimental transmission. *New Engl J Med* 1983; 308: 1252-1257.
16. WOODMANSEE DB. An in vitro study of sporulation in *Cryptosporidium* species. *J Parasitol* 1986; 72: 348-349.
17. JOKIPPI L, JOKIPPI AMM. Timing of symptoms and oocyst excretion in human Cryptosporidiosis. *New Engl J Med* 1986; 315: 1643-1647.
18. GARCIA LS, BRUCKNER DA, BREWERTC, SHIMIZU RY. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 185-190.
19. VASQUEZ IH, RESTREPO M, BOTERO D. Cryptosporidiosis. *Biomédica* 1986; 6: 48-70.
20. FAUST EC, RUSSELL PF, JUNG RC. Parasitología clínica. Barcelona, Salvat, 1974.
21. MELVIN DM, HEALY G. Intestinal and urogenital protozoa. In: LENNETTE EH, BALOWS A, HAUSLER WJ, SHADOMY HJ. Manual of clinical microbiology. Washington: ASM, 1985: 647-648.
22. PEARL M, SOAVE R. Three step stool examination for *Cryptosporidium* in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J Infect Dis* 1983; 147: 824-828.