



Una Nueva Coloración Safranina Tricrómica para la Detección de *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, Especies de *Microsporidia* e *Isospora belli* en Materia Fecal

PATRICIA PONCE DE LEÓN,* PATRICIA FLAHERTY Y MARÍA ZDERO.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Departamento de Microbiología. Área Parasitología. Suipacha 531. 2000-Rosario, Argentina.

*Autor para la correspondencia: 1° de mayo 1836. 2000 - Rosario Argentina. Tel/Fax 0341-4820037

ABSTRACT. *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis* and *Microsporidia* are frequent pathogens in the immunodeficient host, which may cause multiple infections. The above mentioned parasites are found in feces by the application of different specific tintorial techniques. The objective of this work was the development of a stain for the simultaneous detection of these parasites, reducing costs as well as the time taken to make the diagnosis. The safranin-trichrome stain is simple, cheap and its results are similar to those of specific tints. All microorganisms are easy to detect and besides being perfectly distinguishable from fungi and faecal elements.

Key words: Safranin-Trichrome Stain, *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis* *Microsporidia*.

RESUMEN. *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis* y *Microsporidia* son patógenos frecuentes en el huésped inmunocomprometido que pueden incluso ocasionar infecciones múltiples. Se diagnostican en heces por la aplicación de distintas técnicas tintoriales específicas. El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de una tinción para la detección simultánea de estos parásitos, minimizando costos y reduciendo el tiempo empleado en el diagnóstico. La técnica safranina-tricrómica es sencilla, económica y de resultados comparables a las tinciones específicas. Todos los microorganismos son fáciles de visualizar y perfectamente distinguibles de hongos y elementos fecales.

Palabras clave: Tinción Safranina Tricrómica, *Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli*, *Cyclospora cayetanensis* *Microsporidia*.

INTRODUCCIÓN

La diarrea es la principal fuente de morbilidad y mortalidad mundial y es también una complicación común en la enfermedad HIV. Se estima que la diarrea ocurre en más del 80% de las personas con SIDA.³

Hay muchas causas probables que involucran bacterias, parásitos y virus. Entre los agentes parasitarios más frecuentes están los coccidios (*Cryptosporidium parvum*, *Isospora belli* y *Cyclospora cayetanensis*) y diferentes especies del genero *Microsporidia* (*Enterocytozoon* y *Encephalitozoon*).

C. parvum puede causar gastroenteritis severa, crónica y progresiva en los pacientes inmunocomprometidos, las diarreas son acusadas con importante pérdida de fluidos corporales e inclusive pueden provocar la muerte.^{6,7} Se han descrito también en el paciente inmunocomprometido infecciones del tracto respiratorio¹³ y vesícula biliar.¹⁴ En los países industrializados alrededor del 0.4% de la población presenta oocistos en heces en algún momento de su vida, y de aquellos que son internados por diarrea el 2-2.5% cursa una criptosporidiosis. Sin embargo la seroprevalencia es

mucho mayor y el 30-35% de la población de USA tiene anticuerpos anti *C. parvum*. En los países en vía de desarrollo la seroprevalencia es mucho mayor 60-70%.

En las naciones industrializadas, el 10 % de los pacientes SIDA padecen criptosporidiosis crónica y el 40 % de los pacientes SIDA en los países del tercer mundo.¹¹

Microsporidiosis es una enfermedad infecciosa emergente con un amplio espectro clínico de enfermedades que incluyen infección gastrointestinal, pulmonar, nasal, ocular, muscular, cerebral y sistémica.

Poco se conoce de la epidemiología pero el descubrimiento de infecciones autolimitantes con *E. bienewisi* y *E. intestinalis* en personas inmunocompetentes sugiere que la *Microsporidia* puede ser un patógeno humano común.

Tiene una amplia distribución geográfica y una alta prevalencia en pacientes HIV y causa enfermedad sólo en el huésped inmunocomprometido.^{10,23}

La *I. belli* ha sido conocida como un agente capaz de producir diarrea crónica en pacientes inmunocomprometidos; fue descrita en un comienzo, en pacientes con cáncer, especialmente hematológicos, o con terapias inmunosupresoras. En la actualidad ha adquirido gran importancia



en el SIDA considerándose en algunos países como la segunda o tercer causa de diarrea crónica en estos pacientes, y las prevalencias son variables según los distintos estudios y metodologías alcanzando cifras que van del 0.4 al 16%.²⁴

Los individuos infectados con *C. cayetanensis* pueden experimentar diarrea acuosa prolongada, dolor abdominal, pérdida de peso, anorexia, mialgia y ocasionalmente vómitos y/o fiebre. Con excepción de algunos brotes, la prevalencia de este coccidio, en la mayoría de las poblaciones es menor al 1%. En los pacientes inmunocompetentes, la infección puede cursar en forma asintomática. La mayor prevalencia de casos sintomáticos se presenta en niños, y adultos con SIDA donde la sintomatología es más intensa y grave.^{2,4,5,8,16,17,20,25}

Estos parásitos se detectan comúnmente por el uso de diferentes coloraciones (las especies de *Microsporidia* no son ácido-alcohol resistentes y *C. parvum* y *C. cayetanensis* no se colorean con tricrómica).

Estos agentes son frecuentes en el huésped inmunocomprometido y deben ser investigados de rutina, considerando además que en estos pacientes pueden haber infecciones múltiples. Para minimizar el costo del laboratorio y el tiempo para realizar la metodología diagnóstica específica para cada agente, se desarrolló una técnica de coloración ácido resistente tricrómica que combina carbofucsina con cromotropo.¹⁴

Sabiendo que los ooquistes de *C. cayetanensis* se colorean con safranina en un procedimiento fácil, rápido y confiable,²¹ el objetivo fue desarrollar una técnica basada en la combinación de safranina con una coloración tricrómica modificada para poder diagnosticar simultáneamente *C. parvum*, *C. cayetanensis*, *Microsporidia* e *I. belli* en materia fecal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes. Se trabajó con pacientes SIDA que concurrieron al Laboratorio de Parasitología del Hospital Provincial del Centenario (Rosario, Argentina).

Se seleccionaron los pacientes cuyas muestras fecales contenían ooquistes de *C. parvum*, ooquistes de *I. belli*, ooquistes de *C. cayetanensis* y esporos de especies de *Microsporidia*, así como también pacientes con muestras negativas para estos parásitos.

Las heces fueron recolectadas y conservadas en formol al 10%.

La criptosporidiosis fue previamente diagnosticada en estos pacientes por detección de los ooquistes con las técnicas de safranina¹ y de Zhiel Neelsen modificada;¹² la microsporidiosis por detección de los esporos con la técnica de Tricrómica modificada,²² la ciclosporidiasis por coloración de los ooquistes con Zhiel Neelsen⁹ y la isosporiasis por observación directa de los ooquistes entre cubre y portaobjetos en 100X y 400X aumentos.

Se procesaron 35 muestras fecales para los ensayos de

confiabilidad (12 con *C. parvum*, 5 con *Microsporidia*, 7 con *I. belli*, 1 con *C. cayetanensis* y 10 negativas).

Preparación de las muestras. Las heces se concentraron por el método de Ritchie¹⁸ y del sedimento resultante se hicieron 3 frotis por muestra que fueron fijadas en metanol por 5 min.

Como ningún paciente tenía infección múltiple se preparó una muestra adicional mezclando en partes iguales heces con *C. parvum*, *I. belli*, *C. cayetanensis* y *Microsporidia*, que fue procesada de igual manera.

Técnica de coloración: Safranina -Tricrómica (ST). Se ensayaron variantes en ambos pasos de la técnica (el de ácido-resistencia y el de coloración Tricrómica) y los mejores resultados se obtuvieron con el siguiente procedimiento: los frotis fijados en metanol fueron cubiertos con Safranina 1% (1 g de Safranina en 100 ml de agua destilada), calentado hasta desprendimiento de vapores 2 veces y se dejaron en contacto con la Safranina durante 15 min.

Se lavaron brevemente con agua de la canilla y se decoloraron durante 5-10 segundos con HCl (3 ml de HCl en 97 ml de metanol).

Se volvieron a lavar con agua de la canilla y se colocaron en estufa a 37°C durante 90 min en jarra de Koplín conteniendo el cromotropo (Cromotropo 2R 6 g; Fast green 0.15 g; ácido fosfotúngstico 0.7 g; 3 ml de ácido acético y 100 ml de agua destilada).

Los frotis se enjuagaron en alcohol ácido (0,45 ml de ácido acético y 99,55 ml de alcohol etílico 90%).

A continuación se hicieron dos pasajes por alcohol etílico 95%, el primero breve y el segundo de 5 min, se deshidrataron el alcohol absoluto 5 min y se colocaron en xilol 10 min.

Cuando los frotis estuvieron secos se examinaron en 1000X aumentos.

RESULTADOS

Características de tinción de *C. parvum*. Los ooquistes fueron fácilmente identificados por presentar la morfología característica. Se colorean de rosa brillante y el interior con la típica tinción no uniforme debida a la presencia de los esporozoítos.

Características de tinción de *C. Cayetanensis*. El 80% de los ooquistes de *C. cayetanensis* se tiñeron de rojo brillante. Se observó la membrana muy marcada tanto en los ooquistes teñidos como en los no coloreados.

Características de tinción de *Microsporidia*. En todas las muestras la pared de los esporos se coloreó intensamente de rojo o rosado. La banda interior diagonal u horizontal presentó un color más pálido.

Características de tinción de *I. Belli*. Los ooquistes se vieron elipsoides con la membrana definida y de color verdoso. Los esporoblastos internos se observaron de color rosado. Los ooquistes fueron visualizados también en 400X aumentos.

Tabla I. Detección de agentes parasitarios por la coloración ST y las tinciones diagnósticas específicas.

Agentes Parasitarios	ST	Safranina	ZN Modif.	ZN	Tricrómica	Observación directa
<i>C. parvum</i> (12)	12	12	12	0	0	0
<i>C. cayetanensis</i> (1)	1	0	0	1	0	0
<i>Microsporidia</i> (5)	5	0	0	0	5	0
<i>I. belli</i> (7)	7	0	0	0	0	7
Muestras negativas (10)	0	0	0	0	0	0

ST= Safranina Tricrómica; ZN= Zhiel Neelsen; ZN Modif.= Zhiel Neelsen modificada

La coloración de fondo verde permitió la fácil identificación de todos los agentes parasitarios y su distinción de hongos y elementos fecales.

Algunas muestras tenían cristales de Charcot-Leyden que se colorearon de rojo intenso.

Estudios de confiabilidad. Se comparó la nueva coloración ST con las tinciones de Safranina y Zhiel Neelsen modificada para *C. parvum* y Zhiel Neelsen para *C. cayetanensis*, Tricrómica modificada para especies de *Microsporidia* y con la observación directa en 100X y 400X para diagnóstico *I. belli*. Los resultados se presentan en la tabla I.

DISCUSIÓN

C. parvum, *C. cayetanensis*, *I. belli* y *Microsporidia* son agentes oportunistas que contribuyen frecuentemente en la enfermedad gastrointestinal de los pacientes inmunosuprimidos. El objetivo fue el desarrollo de una técnica de tinción barata, fácil, rápida y de resultados comparables con las tinciones específicas de diagnóstico.

Desde que se conoció la naturaleza ácido-resistente de *C. parvum*, las tinciones que utilizan esta propiedad son las de elección en el laboratorio clínico microbiológico y pueden realizarse por métodos de coloración fríos o calientes.⁷

Se ha reportado diferencia en el grosor de la pared del ooquiste que pueden verse reflejadas en diferencias tintoriales.⁷

El uso de técnicas con carbofucsina, como colorante primario, exige una cuidadosa decoloración para lograr el contraste adecuado, así como también una falla en este paso puede llevar a confusión entre las esporas bacterianas y *Microsporidia*.⁷

Se ha comunicado que la Safranina en determinadas condiciones tintoriales es capaz de colorear los ooquistes de *C. cayetanensis*.²¹

La Safranina fue elegida como colorante primario porque tiene menor poder de penetración que la carbofucsina y el paso de decoloración no es tan crítico.

La técnica original de Baxby¹ permitió una buena coloración de los ooquistes de *C. parvum* pero no de los ooquistes de *C. cayetanensis*, por lo tanto se probaron modificaciones en el tiempo de la safranina (5, 10 y 15 min) obteniendo los mejores resultados, después de calentar hasta desprendimiento de vapor, con un tiempo de contacto del frotis con la safranina de 15 min. Con esta modificación se logró una buena tinción color rojo brillante del 80% de los ooquistes de *C. cayetanensis*.

Los ooquistes no coloreados exhibieron una típica membrana bien delimitada.

Si bien la tinción Tricrómica falla en colorear *Cryptosporidium*⁷ y *C. cayetanensis*, es el método tintorial de elección para diagnóstico de *Microsporidia* en heces.^{10,23}

Se probaron también modificaciones del tiempo de contacto con el cromotropo (30, 60 y 90 min) en estufa a 37°C. Los dos primeros tiempos permitieron colorear los esporos de *Microsporidia*, aunque en algunas muestras débilmente; la tinción óptima se obtuvo con 90 min.

Se comprobó que el paso ácido resistente y la decoloración con HCl 3% en metanol, no afecta la posterior tinción tricrómica para *Microsporidia*.

Los ooquistes de *I. belli* son visualizados en la observación directa de heces debido a que tienen un gran tamaño (20-30 micras).²⁴ Pero muchas veces su observación puede dificultarse, pues se excretan en bajo número y su membrana es muy clara y exhibe poca o ninguna refringencia en 100X aumentos.

Con la tinción ST se logra la fácil visualización del ooquiste pues la membrana se colorea y delimita y los esporoblastos se tifen de rosado.

La implementación de esta técnica de coloración sencilla y económica permite la identificación simultánea de estos parásitos que son fácilmente visualizados sobre una coloración de fondo verde y perfectamente distinguibles de hongos y elementos fecales.

La aplicación de un único método de coloración no sólo abarata costos sino también reduce considerablemente el tiempo requerido para el diagnóstico.



AGRADECIMIENTO

A la Sra. Aurelia Robson por su asesoramiento en el inglés técnico.

BIBLIOGRAFIA

1. Baxby, D. y N. Blundell. 1983. Sensitive, rapid, simple methods for detecting *Cryptosporidium* in faeces. *Lancet*. 1147.
2. Berlin, O. G. W., S. M. Novak, R. K. Porschen, E. G. Long, G. N. Stelma, y F. W. Schaeffer III. 1994. Recovery of *Cyclospora* organisms from patients with prolonged diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 18:606-609.
3. Bowers Mark. June 1997, posting date. Diarrhea. BETA 6:1-14 [Online] <http://www.sfaf.org/treatment/beta/b33/b33diar.html> [27 July 1999, last date accessed].
4. Centers for disease control and prevention. 1996. Outbreaks of *Cyclospora cayatanensis* infection. United States, 1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 45:549-551.
5. Centers for disease control and prevention. 1996. Update: Outbreaks of *Cyclospora cayatanensis* infection. United States and Canada, 1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 45:611-612.
6. Culshaw, R., G. Bancroft, y V. Mc Donald. 1997. Gut intraepithelial lymphocytes induce immunity against *Cryptosporidium* infection through a mechanism involving gamma interferon production. *Infect. Immun.* 65:3074-3079.
7. Current, W. L., y L. S. Garcia. 1991. Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:325-358.
8. Díaz Carbonell, J. V., y V. M. Villar Amigo. 1997. *Cyclospora cayatanensis*: A new enteropathogenic parasite. *Gastroenterol. Hepatol.* 20:160-162. Eberhardt, M., N. J. Pieniazek, y M. J. Arrowood. 1997. Laboratory Diagnosis of *Cyclospora* infections. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 121:792-797.
9. Franzen, C., y A. Müller. 1999. Molecular Techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of *Microsporidia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:243-285.
10. Fayer, R., C. A. Speer, J. P. Dubey. January 1999, posting date. Basic biology of *Cryptosporidium*, P:1-8. In R. Fayer (ed.), *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*, 1st ed. [Online]. CRC Press, Boca Raton, <http://www.ksu.edu/parasitology/basicbio>.
11. García, L. S., D. A. Bruckner, T. C. Brewer, y R. Y. Shimizu. 1983. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 18:186-190.
12. Hojlyng, N., y B. N. Jensen. 1988. Respiratory Cryptosporidiosis in HIV positive patients. *Lancet* i:590-591 (letter).
13. Ignatius, R., M. Lehman, K. Miksits, T. Regnath, M. Arvand, E. Engelmann, U. Futh, H. Hahn, y J. Wagner. 1997. A new acid-fast trichrome stain for simultaneous detection of *Cryptosporidium parvum* and *Microsporidia* species in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 35:446-449.
14. López - Vélez, R., R. Tarazona, A. García Camacho, E. Gómez-Mampaso, A. Guerrero, V. Moreira, y R. Villanueva. 1995. Intestinal and extraintestinal cryptosporidiosis in AIDS patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14:677-681.
15. Ortega, Y. R., C. R. Sterling, R. H. Gilman, V. A. Cama, y F. Díaz. 1993. *Cyclospora* species - a new protozoan pathogen of humans. *N. Engl. J. Med.* 328:1308-1312.
16. Pape, J. W., R. I. Verdier, M. Boney, J. Boney, y W. D. Johnson. Jr. 1994. *Cyclospora* infection in adults infected with HIV. Clinical manifestations, treatment, and prophylaxis. *Ann. Intern. Med.* 121:654-657.
17. Ritchie, L. S. 1984. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull. U.S. Army. Med. Dept.* 8:326.
18. Rodríguez, J. C., y J. V. Serrano. 1997. Morphological, clinical and therapeutic characteristics of *Cyclospora cayatanensis*. *Bol. Chil. Parasitol.* 52:26-32.
19. Scave, R., y W. D. Johnson. Jr. 1995. *Cyclospora*: conquest of an emerging pathogen. *Lancet* 345:667-668.
20. Visvesvara, G. S., H. Moura, E. Kovacs-Nace, S. Wallace, y M. L. Eberhard. 1997. Uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating. *J. Clin. Microbiol.* 35:730-733.
21. Weber, R., R. Brian, R. Owen, M. Wilcox, L. Gorelkin, y G. Visvesvara. 1992. Improved light microsporidial detection of *Microsporidia* spores in stool and duodenal aspirates. *The New England J. Medicine* 326:161-166.
22. Weber, R., R. Brian, D. Schwartz, y R. Owen. 1994. Human microsporidial infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:426-461.
23. Weitz, J. C. 1999. Isosporosis, P. 142-145. In: A. Afias (ed.) *Parasitología médica* 4th ed. Téc. Mediterránea Ltda., Santiago.
24. Wurtz, R. 1994. *Cyclospora*: a newly identified intestinal pathogen of humans. *Clin. Infect. Dis.* 18:620-623.