
EVALUACIÓN DE MÉTODOS MOLECULARES Y MICROSCÓPICOS PARA LA DETECCIÓN DE *Cryptosporidium* spp. (APICOMPLEXA – CRYPTOSPORIDIIDAE)*

Ricardo José Ocampo Gallego¹
Luz Adriana Cardozo Duque¹
Germán Ariel López Garnert²
María Elena Álvarez³
Jorge Enrique Pérez³
Fredy Arvey Rivera Páez²

RESUMEN

Introducción. La criptosporidiosis es una enfermedad emergente causada por protozoarios del género *Cryptosporidium*, afecta un amplio rango de vertebrados incluyendo al hombre, su prevalencia oscila entre el 4-6% en centro y sur América y puede llegar a causar la muerte en pacientes inmunosuprimidos, por lo que es considerada un problema de salud pública en todo el mundo. Se hace necesario implementar y evaluar estrategias de detección y tipificación de las distintas especies de *Cryptosporidium*, para adoptar medidas de control y seguimiento.

Objetivo. Realizar una comparación de métodos microscópicos y moleculares para la detección y tipificación de las especies de *Cryptosporidium*, con el fin de utilizar aquel de mayor sensibilidad en la detección del parásito en muestras de agua.

Materiales y métodos. La detección y tipificación de *Cryptosporidium* spp., en muestras fecales y de agua, usando inicialmente un método de concentración tanto para las heces como para el agua (formol-éter y el método de

floculación inorgánica con carbonato de calcio); la identificación del parásito se realizó por la tinción de Ziehl-Neelsen y la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de regiones del ADN ribosomal, de genes que codifican para la proteína Hsp70 y del gen que codifica para la proteína de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium* (COWP). La tipificación se realizó por medio de digestión con las enzimas de restricción *SspI*, *VspI* y *RsaI*.

Resultados. La tinción de Ziehl-Neelsen, comprobó la presencia de *Cryptosporidium* spp., en 10 de las 168 muestras analizadas (humanos, terneros, perros y conejos), la tipificación por PCR, confirmaron 15 muestras positivas para *C. parvum* y una para *C. hominis*.

Conclusiones. Se demuestra la sensibilidad de la detección de *Cryptosporidium*, por PCR y su utilidad en el diagnóstico, al registrar la presencia de dos especies del parásito circulando en muestras del municipio de Manizales.

Palabras clave: *Cryptosporidium* spp., rADN, Hsp70, COWP, Ziehl-Neelsen.

* Trabajo financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados de la Universidad de Caldas.

¹ Biólogos, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, Manizales (Caldas, Colombia).

² Profesores Grupo de Investigación Genética, Biodiversidad y Fitomejoramiento (GEBIOME). Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, Manizales (Caldas, Colombia).

³ Profesores del Departamento de Ciencias Básicas para la Salud, Facultad de Ciencias para la Salud, Universidad de Caldas, Manizales (Caldas, Colombia).

Correspondencia: Calle 65 No. 26-10, Departamento de Ciencias Biológicas, Cuarto piso Edificio Orlando Sierra Hernández, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Tel.: 6-8781500 Ext. 12189 - 12194. E-mail: fredy.rivera@ucaldas.edu.co

EVALUATION OF MOLECULAR AND MICROSCOPIC METHODS FOR DETECTION OF *Cryptosporidium* spp. (APICOMPLEXA – CRYPTOSPORIDIIDAE)

ABSTRACT

Introduction. Cryptosporidiosis is an emerging disease caused by protozoa of the *Cryptosporidium* genus, which affects a wide range of vertebrates, including humans. Its prevalence ranges from 4%-6% in Central and South America and can even cause death in immunosuppressed patients. The reason why it is considered a public health problem worldwide is that it is necessary to implement and evaluate strategies for detection and typification of different *Cryptosporidium* species, to adopt control measures and monitoring.

Objective. To perform a comparison between microscopic and molecular methods for the detection and typification of *Cryptosporidium* species with the purpose of using the most sensitive method in the detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples.

Materials and methods. Detection and typification of *Cryptosporidium* spp. in feces and water samples were done initially using a concentration method for both feces and water (Formol-ether and inorganic flocculation method with Calcium carbonate); the parasite identification was carried out using the Ziehl-Neelsen staining and the Polymerase Chain Reaction PCR amplification of ribosomal ADN regions, of genes codified for Hsp70 protein and the gene that codifies for the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP). The typification was carried out by digestion with restriction enzymes *SspI*, *RsaI* and *VspI*.

Results. The Ziehl-Neelsen staining, confirmed the presence of *Cryptosporidium* spp., in 10 of the 168 samples tested (humans, calves, dogs and rabbits), the PCR typification, confirmed 15 positive samples for *C. parvum* and one for *C. hominis*.

Conclusion. The sensitivity of detection of *Cryptosporidium* by PCR and its utility in the diagnosis is shown, registering the presence of two species of the parasite circulating in samples taken in the municipality of Manizales.

Key words: *Cryptosporidium* spp., rDNA, Hsp70, COWP, Ziehl-Neelsen.

INTRODUCCIÓN

La criptosporidiosis es una enfermedad emergente causada por parásitos del género *Cryptosporidium*, el cual se reconoció por primera vez como causa de enfermedad en humanos en 1976, pero solo en 1982 tomó relevancia, cuando el número de casos detectados empezó a incrementarse rápidamente junto con el SIDA (1). A través de la historia se han reportado numerosas epidemias de criptosporidiosis, destacándose la presentada en la primavera de 1993 en Milwaukee, estado de Wisconsin, donde se estima que 400.000 personas se enfermaron, y algunos pacientes con SIDA fallecieron (1).

La enfermedad causa diarrea aguda que puede estar acompañada de dolor abdominal, náuseas, vómito, inapetencia, pérdida de peso, fiebre y problemas respiratorios (2). La materia fecal puede contener mucus pero la presencia de sangre y leucocitos es rara, debido a que se trata de una diarrea no inflamatoria (3). Las alteraciones morfológicas del epitelio intestinal de los individuos infectados incluyen atrofia vellosa, cambios mitocondriales y una actividad lisosomal aumentada en las células infectadas (4). La duración y severidad de los síntomas clínicos son variables (5) y dependen en gran parte de la edad y del estado inmunológico de la persona infectada (6), pero también de la virulencia de la cepa del parásito (3). En las

personas inmunocompetentes la enfermedad es asintomática o autolimitada, y puede persistir entre 7-10 días y algunas semanas (6). En individuos con deficiencias inmunitarias, la criptosporidiosis puede convertirse en una enfermedad crónica que se prolonga por meses o años y, en casos extremos como en los pacientes con SIDA, la enfermedad puede ser muy severa, y llegar a un 50% de mortalidad (4).

La transmisión de *Cryptosporidium* spp., puede producirse principalmente por contacto directo, por alimentos contaminados o por medio del agua en donde se encuentran ooquistes viables excretados por personas o animales infectados (7). La criptosporidiosis no puede ser diagnosticada solo por los síntomas, debido a que la sintomatología es similar a la presentada en otras enfermedades intestinales causadas por diferentes tipos de bacterias, virus o parásitos. Los métodos de detección e identificación para el género *Cryptosporidium* pueden agruparse en tres categorías:

Métodos clásicos. Normalmente, el diagnóstico se establece por métodos microscópicos convencionales, y se utilizan con frecuencia el método modificado de Ziehl-Neelsen y el de auramina-fenol en frotis fecales sin concentrar (8). Cuando en las muestras se espera un número bajo de ooquistes, la concentración de los ooquistes de las muestras fecales puede aumentar la sensibilidad de la detección.

Métodos inmunológicos. Han resultado útiles dos sistemas de detección inmunológica de ooquistes de *Cryptosporidium* los cuales se basan en la detección de antígenos (inmunofluorescencia directa y ELISA), para lo cual se han comercializado varios kits. Cada uno tiene un nivel similar de sensibilidad y puede emplearse tanto en muestras fecales concentradas como no concentradas, dependiendo del número probable de ooquistes en la muestra. Comparados con las tinciones convencionales, los kits son costosos, considerando que parecen tener un umbral similar de detección (8).

Métodos moleculares. Como alternativa al diagnóstico convencional se ha desarrollado una gran variedad de protocolos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ácidos nucleicos de *Cryptosporidium* spp. Los métodos moleculares son los más sensibles para detectar ooquistes en muestras ambientales, aunque la sensibilidad de los métodos publicados varía entre 1 y 10⁶ ooquistes (8).

Debido a que el agua es una de las fuentes más importantes para la adquisición de este protozooario, el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial junto con el Ministerio de la Protección Social publicaron la Resolución número 2115 de julio 22 de 2007 (9), la cual en su capítulo III indica que el valor aceptable de ooquistes de *Cryptosporidium* en el agua de consumo humano debe ser de cero, y por lo tanto se exige que las entidades prestadoras del servicio de agua, así como también los entes de control, adopten metodologías debidamente avaladas por el Instituto Nacional de Salud que permitan su detección en el agua de consumo humano; en el proceso de implementación de una metodología que permita la identificación de este parásito, la presente investigación pretende comparar diferentes alternativas metodológicas, microbiológicas y moleculares que permitan determinar cuál de estos métodos podría ser el más adecuado para la detección de los ooquistes de diferentes especies de *Cryptosporidium* en el agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diagnóstico parasitológico de *Cryptosporidium* spp.

La identificación microscópica de parásitos del género *Cryptosporidium*, se realizó a 168 muestras de materia fecal de cuatro hospederos: humanos (*Homo sapiens*), terneros lactantes (*Bos taurus*), perros (*Canis familiaris*) y conejos (*Oryctolagus cuniculus*). Las muestras se colectaron en frascos

Ricardo José Ocampo Gallego, Luz Adriana Cardozo Duque, Germán Ariel López Garnert, María Elena Álvarez, Jorge Enrique Pérez, Fredy Arvey Rivera Páez

coprológicos estériles y se rotularon con código para su posterior identificación. Cada una de las heces se depositó en nevera de icopor que contenía pilas refrigerantes, para evitar su descomposición antes de ser transportadas al Laboratorio de Genética de la Universidad de Caldas para su procesamiento. Cada muestra se concentró utilizando el método formol-éter (10).

Para definir la presencia o ausencia de los ooquistes de *Cryptosporidium* spp., mediante microscopía, 97 muestras se evaluaron y compararon por dos metodologías de tinción: tinción Ziehl-Neelsen (Heariksen & Pohlenz, 1981) la cual involucra el calentamiento de la fucsina fenicada hasta observar la emisión de vapores (11), y la tinción de Ziehl-Neelsen modificada (Casemore et al., 1984) en la cual la fucsina fenicada se agrega en frío (12). Ambas metodologías están fundamentadas en la demostración de las características de ácido-alcohol resistencia del parásito.

Las restantes 71 muestras, solo se evaluaron por el método de tinción de Ziehl-Neelsen, que presentó una mayor sensibilidad en la detección de *Cryptosporidium* spp.

Detección de ADN de *Cryptosporidium* spp. mediante PCR

La estandarización microscópica y molecular para la detección de *Cryptosporidium*, comprometió las primeras 97 muestras examinadas por microscopía y positivas por alguna de las dos metodologías de tinción, se les realizó la extracción de ADN, por el método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Gonçalves et al., 2008) (13), cada muestra se procesó individualmente en cámara de bioseguridad clase IIA. Para evitar interferencias en el diagnóstico individual, al iniciar cada jornada de trabajo, se realizó la extracción de una muestra control libre de parásitos, que permitía corroborar las condiciones del área de trabajo y la pureza de los reactivos. La cantidad y la calidad del ADN extraído, se determinó con la ayuda

de un espectrofotómetro Nano Vue (General Electric - serie 110482) a una absorbancia de 260/280 nanómetros.

Los análisis moleculares, correspondieron a la amplificación por PCR de la subunidad pequeña (SSU) 18S, subunidad grande (LSU) 26S y el gen 5.8S del ADN ribosomal (14), así como el gen Hsp 70 (proteína de choque térmico de 70 KDa) (15), y el gen COWP (proteína de la membrana externa de la pared del ooquiste) (16).

La utilización de 7 iniciadores (14, 15, 16), se complementó con el diseño de tres iniciadores diseñados con el programa Primer BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), sobre una secuencia completa del ADN ribosomal para el género *Cryptosporidium* (código de acceso, GenBank N° AF301594) (Tabla 1). La especificidad de cada uno de los cebadores se evaluó con la herramienta nucleótido-blast, sumado a que su especificidad, sensibilidad y reproducibilidad se han comprobado para *Cryptosporidium* por diferentes autores (14, 15, 16). Los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa al 0,6% coloreados con bromuro de etidio y en geles de poliacrilamida al 6% coloreados con nitrato de plata (17).

La identificación microscópica y detección de ADN de *Cryptosporidium* por PCR, así como la sensibilidad de cada uno de los iniciadores, se evaluó con las restantes 71 muestras de materia fecal humana y bovina. Por último, se realizó una prueba piloto para la detección de *Cryptosporidium* spp. en muestras de agua, en dos localidades de la ciudad de Manizales: 1) quebrada Toldafría (latitud norte, 05°01'15,0''; longitud oeste, 75°26'13,6''), 2) quebrada Olivares (latitud norte, 05°03'47,3''; longitud oeste, 75°29'06,6''). De cada una de las localidades se tomaron dos muestras de 20 litros de agua, según la metodología propuesta por el *Standard Methods* de la AWWA APHA WPCF (18). Las muestras se llevaron al Laboratorio de Genética de la Universidad de Caldas, una vez allí las muestras de agua se distribuyeron en

garrafrones plásticos estériles de 20 litros para facilitar su manipulación.

Las muestras se concentraron con el método de floculación con carbonato de calcio para la recuperación de las formas quísticas (19). Para cada muestra de agua de 20 litros se realizaron 10 pruebas por medio de tinción de Ziehl-Neelsen y por PCR con los iniciadores UC18, BCOWP-CRY, HSP4-HSP3, para la identificación y detección de *Cryptosporidium* spp.

RESULTADOS

La etapa de estandarización, correspondiente al análisis microscópico de 97 muestras de materia fecal para la identificación de *Cryptosporidium* spp. por medio de la tinción de Ziehl-Neelsen, permitió confirmar la presencia del parásito en cinco muestras. Los ooquistes presentaron una morfología de discos ovoides teñidos irregularmente de rojo, y un diámetro aproximado de 4 a 6 micrómetros (11). En las placas también fue posible observar la presencia de levaduras y bacterias ácido-alcohol resistentes, que eran morfológicamente distintas al *Cryptosporidium* y no originaron confusión. La evaluación de los métodos de tinción, comprobaron que la metodología Ziehl-Neelsen (11) era más sensible que Ziehl-Neelsen modificada (12) con el número de muestras procesadas en este estudio (Tabla 2).

El ADN obtenido mediante la extracción (13), fue de buena calidad. Esto se puede afirmar debido a que las muestras analizadas mediante espectrofotometría, presentaron un rango entre 1,6-2 a una relación de absorbancia de 260/280 nanómetros. La concentración del ADN osciló entre 205-300,5 ng/ μ l, pero es de tener en cuenta que este ADN no corresponde en su totalidad al

del parásito, debido a que de las muestras fecales se puede extraer ADN correspondiente a otros parásitos, bacterias, e incluso del huésped.

En las 5 muestras positivas por microscopía, se confirmó la presencia de *Cryptosporidium* spp. por medio de PCR, presentando los tamaños moleculares correspondientes a los reportados en la literatura para cada iniciador (Figura 1).

La tipificación de las 5 muestras positivas por microscopía y corroboradas por PCR, con los iniciadores que amplifican sobre el gen SSU del ADN ribosomal (18S-18SN), y el gen COWP (BCOWP-CRY), y su posterior digestión con las enzimas de restricción *SspI*, *VspI* y *RsaI* (PCR-RFLP), demostraron la presencia de *Cryptosporidium parvum* en 3 muestras bovinas y 1 humana, así como la presencia de *Cryptosporidium hominis* en 1 muestra humana (Tabla 3).

La evaluación de 71 muestras de materia fecal humana y bovina, para confrontar la sensibilidad de la tinción de Ziehl-Neelsen y la PCR utilizando el iniciador UC18 (iniciador que mostró la mayor sensibilidad), registró la presencia de 5 muestras positivas para *Cryptosporidium*, a través de la tinción por Ziehl-Neelsen (prevalencia 7,04%) y un total de 11 muestras positivas por PCR (prevalencia 15,49%). Es de anotar que todas las muestras positivas bajo la lectura al microscopio se reconfirmaron por PCR.

Las 11 muestras positivas por PCR, amplificando los genes COWP y la SSU del rADN, además de su posterior digestión con las enzimas de restricción *SspI*, *VspI* y *RsaI*, confirmaron la presencia de *Cryptosporidium parvum*. La prueba piloto para la detección de *Cryptosporidium* en las quebradas Toldafría y Olivares, resultó negativa en los dos sitios de muestreo.

Ricardo José Ocampo Gallego, Luz Adriana Cardozo Duque, Germán Ariel López Garnert, María Elena Álvarez, Jorge Enrique Pérez, Fredy Arvey Rivera Páez

Tabla 1. Iniciadores utilizados para evaluar *Cryptosporidium* spp.

iniciador	Secuencia 5'-3'	Locus	Producto obtenido (Pb)	Producto esperado (Pb)	Autor
CPB-DIAGF CPB-DIAGR	AAGCTCGTAGTTGGATTCTG TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG	rDNA	430	420-450	Johnson et al., 1995
18SF 18SR 18SNF 18SNR	TTCTAGAGCTAATACATGCG CCCATTTCCTTCGAAACAGGA GGAAGGGTGTATTATTAGATAAAG AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA	rDNA	850	826-864	Xiao et al., 2000
UC18F UC18R	AACACGGGAAAACCTCACCAG GTACAAAGGGCAGGGACGTA	rDNA	450	446	*
UC5.SF UC5.8R	TCTCATAACGATGAAGGACGC TGTAATAACTGCTATTTGCGTTGA	rDNA	100	100	*
UC26F UC26R	GCGAGTGAACAGGAAAAAAGC CGAGCTTCCACCAGACTTTC	rDNA	NA	867	*
HSPF3 HSPR3 HSPF4 HSPR4	GCTGSTGATACTCACTTGGGTGG CTCTGTCCATACCAGCATCC GGTGGTGGTACTTTTGAIGTATC GCCTGAACCTTTGGAATACG	Hsp70	330	325	Morgan et al., 2001
CRY-9 CRY-15 BCOWPF BCOWPR	GGACTGAAATACAGGCATTATCTTG GTAGATAATGGAAGAGATTGTG ACCGCTTCTCAACAACCATCTTGTCCTC CGCACCTGTTCCCACTCAATGTAAACCC	COWP	550	553	Spano et al., 1997

* Iniciadores diseñados con el programa Primer BLAST. NA: no amplificó.

Fuente: Autores.

Tabla 2. Detección de *Cryptosporidium* spp. por los dos métodos de tinción.

Huésped	Ziehl-Neelsen Modificada (Casemore et al., 1984)	Ziehl-Neelsen (Heariksen & Pohlenz, 1981)
Humano	2/50 (4%)	2/50 (4%)
Ternero	1/39 (2,56%)	3/39 (7,69%)
Perro	0/6 (0%)	0/6 (0%)
Conejo	0/2 (0%)	0/2 (0%)
TOTAL	3/97(2,91%)	5/97(4,85%)

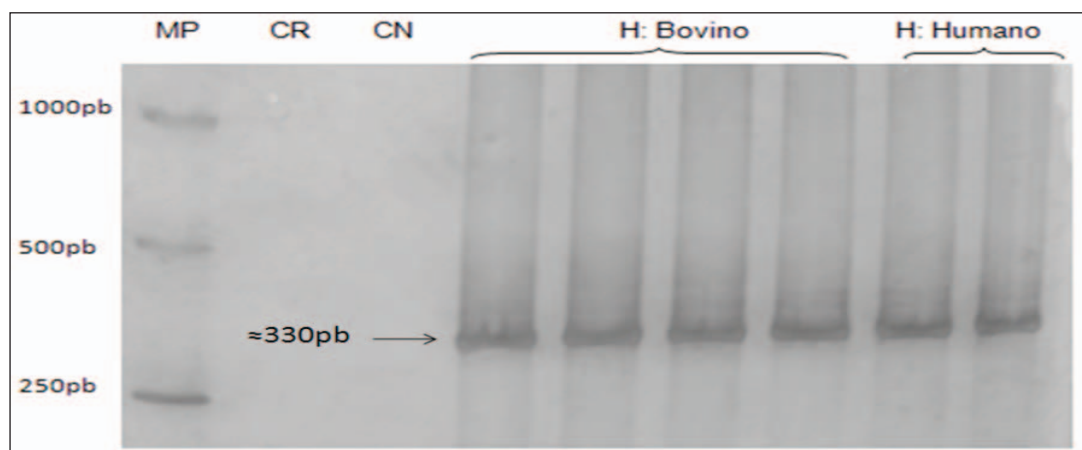
Fuente: Autores.

Tabla 3. PCR-RFLP utilizando los iniciadores que amplifican sobre la SSU del rRNA (18S-18SN) y el gen COWP (BCOWP-CRY).

Huésped	SSU del rRNA			COWP		Especie
	Producto PCR rDNA	Digestión SSPI *	Digestión VSPI *	Producto PCR COWP	Digestión RSAI*	
Bovino	848	449, 268, 108, 12, 11	625, 116, 104	550	410, 106, 34	<i>C. parvum</i>
Bovino	848	449, 268, 108, 12, 11	625, 116, 104	550	410, 106, 34	<i>C. parvum</i>
Bovino	848	449, 268, 108, 12, 11	625, 116, 104	550	410, 106, 34	<i>C. parvum</i>
Humano	848	449, 268, 111, 12, 11	561, 116, 104, 70	550	285, 125, 106, 34	<i>C. hominis</i>
Humano	848	449, 268, 108,12, 11	625, 116, 104	550	410, 106, 34	<i>C. parvum</i>

* Tamaños de las bandas visibles en geles de poliacrilamida al 4% en pb.

Fuente: Autores.



Fuente: Autores.

Figura 1. Amplificación del gen Hsp70 de *Cryptosporidium* spp., con los iniciadores HSP4-HSP3. Gel de poliacrilamida al 6%, coloreado con nitrato de plata. MP: Marcador de peso molecular (Easy ladder I). CR: Control de reacción. CN: Control negativo. H: Bovino (Huésped Bovino). H: Humano (Huésped Humano).

DISCUSIÓN

Tradicionalmente la técnica de referencia más utilizada en los laboratorios para la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. es la tinción de Ziehl-Neelsen, debido a su bajo costo y a la relativa sencillez. Sin embargo, a través del tiempo se han realizado varias modificaciones de este método de tinción.

Cuando se compararon los dos métodos de tinción, los mejores resultados obtenidos en la presente investigación, corresponden al método de tinción propuesto por Heariksen & Pohlenz en 1981, resultados similares han sido reportados en literatura (20, 21), llegando a la conclusión de que la coloración clásica de Ziehl-Neelsen requiere calentamiento para que el colorante (fucsina fenicada) atraviese la pared celular que contiene ceras. El suspender el calentamiento y enfriar con agua, provoca una nueva solidificación de los ácidos grasos de modo que el colorante ya no puede salir del organismo, además el calentamiento aumenta la energía cinética de las moléculas del colorante lo cual también facilita su entrada a la célula (21).

Aunque no existe un método recomendado para extraer el ADN de ooquistes de *Cryptosporidium*, y la sensibilidad de la mayoría de los métodos no se ha establecido por completo, el protocolo de extracción de ADN utilizado en el presente estudio (13), mostró ser eficaz para extraer ADN de buena calidad a partir de materia fecal. La sensibilidad de los iniciadores utilizados en la presente investigación, diseñados sobre el ADN ribosomal, el gen COWP y el gen Hsp70, mostraron tener niveles similares de sensibilidad para detectar parásitos del género *Cryptosporidium*. Esto se pudo presentar debido a que se utilizaron buenas cantidades de ADN en los ensayos por PCR, lo que no permitió que se observaran diferencias notables de sensibilidad en las muestras analizadas. Sin embargo, estos resultados contrastan con los reportes en la literatura (22, 23), donde los iniciadores diseñados sobre el rDNA (SSU rRNA), presentan

una mayor sensibilidad debido a que el genoma de *Cryptosporidium* spp. posee cinco copias del gen, mientras que otros genes como el COWP solo posee una copia en su genoma.

La sensibilidad de la detección para *Cryptosporidium* spp. por PCR, se confirma al encontrar 11 muestras positivas, de las 71 heces tenidas en cuenta para confrontar los resultados con la tinción de Ziehl-Neelsen (5 muestras positivas). Estos resultados se pueden explicar por el límite de detección de ambas pruebas. Se ha demostrado por estudios que se necesitan alrededor de 1×10^6 ooquistes de *Cryptosporidium* por gramo de heces sin concentrar, para tener un porcentaje de eficiencia en la detección del 100% utilizando el método de Ziehl-Neelsen, mientras que el límite de detección del mismo método, pero utilizando heces concentradas ya sea por formol-éter, percoll-sacarosa, sulfato de zinc, etc., es del orden de 1×10^4 y 5×10^4 ooquistes por gramo de heces (24). De otro lado (8, 25, 26) han demostrado que son necesarios de 1 a 200 ooquistes por gramo de heces concentradas para que puedan ser detectados por PCR, lo cual representa un aumento en la sensibilidad de varios órdenes de magnitud respecto a los métodos convencionales de coprodiagnóstico, como lo es la tinción de Ziehl-Neelsen.

A pesar de que los niveles de sensibilidad y especificidad de las técnicas microscópicas para la detección de *Cryptosporidium* spp. son bajas, estas técnicas siguen siendo utilizadas en países como Colombia por los especialistas de la salud (27, 28, 29), por lo tanto la implementación de variantes metodológicas que presenten niveles mayores de sensibilidad y especificidad como la PCR son bienvenidas.

El análisis molecular de 16 muestras de heces humanas y bovinas positivas para *Cryptosporidium* spp., pone de manifiesto dos especies del género *Cryptosporidium*, circulando en Manizales (Caldas), y confirma la presencia mayoritaria de *Cryptosporidium parvum* (15 muestras positivas), frente a un solo hallazgo

de *Cryptosporidium hominis*, en una muestra humana. Estos resultados son concordantes con los reportes previamente publicados (30, 31, 32), los cuales encontraron a *Cryptosporidium parvum* como el principal agente causal de criptosporidiosis en humanos y animales; sin embargo, hay que tener en cuenta que *C. hominis* junto con *C. parvum* se han considerado como los principales causantes de criptosporidiosis en el mundo, aunque otras especies como: *C. canis*, *C. felis*, *C. baileyi* y *C. meleagridis* también se han descrito como los causantes de diarrea en humanos; la diferenciación de las especies debe hacerse por métodos moleculares, como los anteriormente descritos, ya que las características morfológicas de los mismos no permiten distinguirlos (33).

A pesar de que no se detectó la presencia de *Cryptosporidium* en las muestras de agua, no se puede descartar del todo la ausencia del parásito en ninguno de los dos sitios de muestreo, debido a que el porcentaje de recuperación del método de floculación con carbonato de calcio es de aproximadamente el 70% y este se puede ver notablemente afectado por factores fisicoquímicos del agua como el pH, la temperatura, la turbidez y la cantidad de sólidos suspendidos que puedan llegar a estar presentes en el agua al momento de tomar la muestra, así

como también, la presencia de algas (33, 34); además, es necesario explorar otros métodos de separación de los ooquistes como es el uso de filtros de alto volumen (filtración en cartucho, filtración por membrana), los cuales pueden ser más eficaces en la obtención de los mismos en aguas previamente tratadas o no tratadas (33).

El bajo número de muestras de agua analizadas en este estudio, es determinante en los resultados obtenidos, ya que para la detección de los ooquistes en el agua se requiere el procesamiento de grandes volúmenes de agua (40 a 100 litros) así como de un gran número de muestras, para lograr una adecuada concentración de los microorganismos (25).

AGRADECIMIENTOS

A ASSBASALUD y a los propietarios de haciendas ganaderas del sector de Gallinazo (Manizales, Caldas), por su colaboración en la obtención de las muestras.

Conflictos de interés: los autores del presente artículo hacen constar que no tienen ningún tipo de vinculación laboral con los laboratorios que producen equipos y reactivos para la detección de *Cryptosporidium* spp.

REFERENCIAS

1. Avery B, Lemley A, Hornsby A. *Cryptosporidium*: Un Patógeno Transmitido por el Agua. Rev. University of Florida 2003; 54:11-17.
2. Tzipori S, Ward H. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. Microbes Infect 2002; 4:1047-1058.
3. Fahey T. Cryptosporidiosis. Prim Care Update Ob Gyns 2003; 10:75-80.
4. Bogitsh BJ, Cheng TC. Human Parasitology. 2 ed. San Diego: Academic Press; 1998. p. 33.
5. Fayer R. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet Parasitol 2004; 126:37-56.
6. Chen XM, Keithly JS, Paya CV, LaRusso NF. Cryptosporidiosis. N Engl J Med 2002; 346:1723-1731.
7. Rodríguez JC, Royo G. *Cryptosporidium* y criptosporidiosis. Bol Control Calidad SEIMC 2001; 13:31-35.
8. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres [Internet]. Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.09_cryptosporidiosis.pdf Consultado Marzo de 2009.
9. Resolución Número 2115 de 2007. Diario Oficial No. 46.679. Ministerio de Protección Social, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.
10. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Bull. U.S. Army med. 1948; 8:326.
11. Heariksen SA, Pohlenz JFL. Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Vet. Scand. 1981; 22:594.
12. Casemore DP, Armstrong M, Jackson B. Screening for *Cryptosporidium* in stools. Lancet 1984; 1:734-735.
13. Gonçalves EMN, Araújo RS, Orban M, Matté GR, Matté MH, Corbett CEP. Protocol for DNA extraction of *Cryptosporidium* spp. oocysts in fecal samples. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2008; 50:165-167.
14. Xiao L, Alderisio K, Limor J, Royer M, Lal AA. Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. Appl Environ Microbiol 2000; 66:5492-5498.
15. Morgan UM, Monis P, Xiao L, Limor J, Sulaiman I, Raidal S, et al. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* from birds. International journal for Parasitology 2001; 31:289-296.
16. Spano F, Putignani L, Mclauchlin J, Casemore DP, Crisanti A. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. FEMS Microbiol Lett. 1997; 150:209-217.
17. Sanguinetti CJ, Dias N, Simpson A. Rapid silver staining and recovery of PCR products separate on polyacrylamide gels. Biotechniques 1994; 17:914-921.
18. APHA-AWWA-WPCF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16 ed. Washington, USA; 1985.

19. Vesey G, Slade JS, Byrne M, Shepherd K, Fricker CR. A new method for the concentration of *Cryptosporidium* oocysts from water. J. Appl. Bacteriol. 1993; 75:82-86.
20. Alonso M, Corcuera M, Roldán M, Picazo A, Gómez F. Modificación de la técnica de Ziehl-Neelsen para la detección de micobacterias con la utilización de microondas. Técnicas en Patología 1996; 29:33-35.
21. Arrowoodt MJ, Sterling MM. Comparison of conventional staining methods and Monoclonal Antibody-Based methods for *Cryptosporidium* Oocyst Detection. J. Clin. Microbiol. 1989; 27:1490-1495.
22. Le Blancq SM, Khramtsov NV, Zamani F, Upton SJ, WU TW. Ribosomal RNA gene organization in *Cryptosporidium parvum*. Mol Biochem Parasitol 1997; 90:463-478.
23. Piper M, Bankier AT, Dear PH. A happy map of *Cryptosporidium parvum*. Genome Res. 1998; 8:1299-307.
24. Weber R, Bryan RT, Bishop HS, Walquist SP, Sullovan J, Juranek D. Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current methods. J. clin. Microbiol. 1991; 29:1323-1327.
25. Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, Misener L, Rose JB. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* in water samples. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61:3849-3855.
26. Webster KA, Smith HV, Giles M, Dawson L, Robertson LJ. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in faeces: comparison of conventional coproscopical methods and the polymerase chain reaction. Veterinary Parasitology 1996; 61:5-13.
27. Arango M, Rodríguez D, Prada N. Frecuencia de *Cryptosporidium* spp. en materia fecal de niños entre un mes y trece años en un hospital local colombiano. Colomb. Med. 2006; 37(2):121-125.
28. Rivera O, Vásquez LR. *Cryptosporidium* spp.: informe de un caso clínico en Popayán, Cauca. Rev Col Gastroenterol 2006; 21(3):125-129.
29. Rodríguez E, Manrique-Abril F, Pulido M, Ospina-Díaz J. Frecuencia de *Cryptosporidium* spp. en caninos de la ciudad de Tunja, Colombia. Rev. MVZ Córdoba 2009; 14(2):1697-1704.
30. Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: Transmission, detection and identification. Int J Parasitol 2000; 30:1305-1322.
31. Keshavarz A, Athari A, Haghghi A, Kazami B, Abadi A. Genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. Among children with diarrhea in Tehran and Qazvin provinces, Iran. Iranian J parasitol 2008; 3:30-36.
32. Trotz-Williams LA, Martin DS, Gatei W, Cama V, Peregrine AS, Martin SW, et al. Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. Parasitology research 2006; 99:346-352.
33. Carey CM, Lee H, Trevors JT. Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Water research 2004; 38:818-862.
34. Fayer R, Xiao L. *Cryptosporidium* y cryptosporidiosis. 2 ed. Taylor & Francis group editorial; 2008.