

**Comparación de tres técnicas de tinción para la identificación de
Cryptosporidium sp., a partir de muestras coprológicas obtenidas en una
población infantil de Calarcá Quindío**

Diana Milena Rubio - Guarín.¹, Fabiana María Lora - Suarez.² Jorge Enrique Gomez³

Resumen

Introducción: El *Cryptosporidium sp.* es considerado como un parasito intracelular obligado, causante de diarrea aguda autolimitada en pacientes inmunocomprometidos. Sus ooquistes son ácido alcohol resistentes, con un diámetro de 4 a 6 micrometros.

Objetivo: Comparar las técnicas de tinción, Ziehl-Neelsen, Giemsa y Safranina - azul de metileno utilizadas en muestras coprológicas, en el diagnostico de ooquistes de *Cryptosporidium sp.*

Materiales y métodos: Se estudiaron 70 muestras coprológicas de niños de 2 a 5 años de edad. Cada una de las muestras fueron sometidas a tinción por los

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

métodos de Zielh-Neelsen modificada, Giemsa y Safranina - azul de metileno. Se determino reproducibilidad de los métodos, además se evaluó la sensibilidad y especificidad.

Resultados: se encontró una sensibilidad de 100 %, 52.9 % , 88.8 % y una especificidad de 100%, 86.7%, 86.8%, para las tinciones Zielh-Neelsen modificada, Giemsa y Safranina - azul de metileno, respectivamente. El nivel de confiabilidad fue de 0.98 (excelente), 0.56 (buena) y 0.51 (buena) para cada una de las técnicas mencionadas.

Conclusión: se determino que la tinción más apropiada para el diagnostico rutinario de *Cryptosporidium* sp. es la de Zielh-Neelsen modificada, debido a su porcentaje de sensibilidad y especificidad, aunque no presenta diferencias significativas entre las otras pruebas.

Palabras Claves: Técnica de tinción para coccideos, *Cryptosporidium*, población infantil.

**Comparison of three staining techniques for identification of
Cryptosporidium sp. Coprological from samples obtained in a child
population of Quindío Calarcá**

Diana Milena Rubio - Guarín.¹, Fabiana María Lora - Suarez.² Jorge Enrique Gomez³

ABSTRACT

introduction: *Cryptosporidium sp.* is considered an obligate intracellular parasite that causes self-limiting acute diarrhea in immunocompromised patients. Its oocysts are acid-resistant, with a diameter of 4 to 6 micrometers.

Objective: To compare the staining techniques of, Ziehl-Neelsen, Giemsa and Safranin - methylene blue coprological samples were used in the diagnosis of *Cryptosporidium sp.*

Materials and methods: We studied 70 coprological samples of children between 5 yr- old. Each samples was subjected to staining by the Ziehl-Neelsen modified Giemsa and Safranin - methylene blue methods. We determined the methods reproducibility as well as their sensitivity and specificity.

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

Results: We found a sensitivity of 100%, 52.9%, 88.8% and a specificity of 100%, 86.7%, 86.8% for Ziehl-Neelsen staining, Giemsa and Safranin - methylene blue, respectively. The confidence level were 0.98 (excellent), 0.56 (good) and 0.51 (good) for each of the above techniques.

Conclusion: It was determined that the stain more suited for routine diagnosis of *Cryptosporidium* sp. is the modified Ziehl-Neelsen, due to its sensitivity and specificity rate, although no significant differences between the other tests.

Keywords: staining technique, *Cryptosporidium*, children.

Introducción

El *Cryptosporidium* sp. es un protozooario parásito, además un agente causal de enfermedades gastrointestinales en todo el mundo. ¹ Fue descrito como patógeno humano en 1976 ², en Colombia la prevalencia del parásito está entre 2.5% y 4% en personas con diarrea³, en estudios realizados en Bucaramanga y Santander se demostró prevalencia del parásito en 32.31 a 40% de los niños inmunocompetentes⁴ y en 42 % de niños con compromiso del sistema inmune por cáncer.⁵

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

En los niños con diarrea, *Cryptosporidium* sp. es la tercera o cuarta causa de diarrea infecciosa, generalmente después del rotavirus y de *Escherichia coli*.⁶ La frecuencia de *Cryptosporidium* sp en niños entre un mes y trece años, de un hospital Colombiano en un estudio realizado con 173 pacientes fue de 46.8 %, y su prevalencia fue de 46.8 %.⁷

En la actualidad hay múltiples métodos de laboratorio para determinar la presencia de coccidios, en especial para *Cristosporidium* sp. y *Cyclospora* sp, tales como técnicas de reacción en cadena polmerasa (PCR), inmunoaglutinación de partículas de látex, inmunofluorescencia directa y técnicas de inmunuensayo con enzimas. Si bien es cierto que se mejora la sensibilidad y especificidad a la hora de encontrar estos parásitos, también es cierto que se aumentan de forma dramática los costos. Actualmente se aceptan como pruebas oro las tinciones, ya que estas son de bajo costo, por ende más prácticas para cualquier laboratorio.^(8,9)

La forma inactiva de *Cryptosporidium*, llamada ooquiste es excretada en las heces fecales de las personas o animales infectados, este ooquiste tiene una pared resistente, permitiéndole sobrevivir a variedad de ambientes. ^(10, 11) El diagnostico de laboratorio se basa en la detección de los ooquistes en las heces frescas o preservadas, mediante métodos de concentración y coloración e inmunológicamente, determinando anticuerpos circulantes o captura de antígenos

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

parasitarios en heces. ⁽¹²⁾

El diagnóstico parasitológico diferencial debe plantearse con *Cyclospora* sp. , siendo este también productor de diarreas en inmunocompetentes y en inmunosuprimidos , caracterizándose igualmente por sus ooquistes semiácido alcohol resistentes. La diferenciación entre ambos se realiza básicamente por el tamaño, midiendo de 4 a 6 micras de diámetros los ooquistes de *Cryptosporidium* sp., mientras que los de *Cyclospora* sp. miden de 8 a 12 micras de diámetro.^(13,14)

El objetivo de este estudio fue comparar las tres técnicas de tinción más utilizadas tales como, Ziehl-Neelsen modificada, Giemsa y Safranina - azul de metileno en la identificación de *Cryptosporidium* sp, y determinar cuál de estas es la más indicada para usar en los exámenes rutinarios o en investigaciones posteriores, hallando la sensibilidad y especificidad de las técnicas comparadas. Además se diseñó un afiche a modo de información y se realizó una campaña de prevención de los coccidios entre la población estudiantil de la Escuela Vivencias Infantiles de Calarcá Quindío.

1. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero. Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

Materiales y métodos

Este trabajo es un estudio de tipo comparativo, en el cual se tuvieron en cuenta 70 muestras de materia fecal preservadas en frío congeladas a -20°C , de estudios poblacionales, donadas por el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío, teniendo como muestra de referencia para el control positivo para *cryptosporidium* las muestras preservadas en formol salino, donadas por el Doctor Fidel Ángel Núñez del Instituto Pedro Koury de Cuba.

Las 70 muestras fueron sometidas a la técnica de concentración de Ritchie, posterior a esto se les aplicó tres técnicas de tinción, tales como Ziehl-Neelsen modificada, Giemsa, y Safranina – azul de metileno, (ver anexos) las placas coloreadas se observaron en toda su extensión con el objetivo de 100x.

La sensibilidad y especificidad de las técnicas comparadas, se determinó con una tabla 2 X 2, en la que se tuvieron en cuenta las 70 muestras, contando las muestras positivas para la prueba de oro, (la cual se realiza con lugol, observando las muestras con microscopía y micrometría) y para cada una de las técnicas de tinción, además se tuvieron en cuenta los resultados positivos para la prueba de oro y negativos para cada una de las técnicas de tinción, los positivos para cada una de las técnicas de tinción y negativos para la prueba de oro, también los negativos para la prueba de oro y para cada una de las tinciones.

1. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

Para analizar la reproducibilidad o fiabilidad de las técnicas, se realizaron las 10 diluciones seriadas. Tomando de la muestra control , (muestra positiva donada por el instituto Pedro Koury de Cuba) 10 μ l llevando la dilución a 100 μ l, a la cual se le realizo el conteo de los ooquistes presentes en la cámara de Neubauer , para inocular cada dilución en 10 muestras negativas, tomando como muestras negativas los coprologicos en los cuales no se encontraron ooquistes con las técnicas utilizadas en el estudio.

Luego de ser inoculadas la muestras son sometidas a cada una las técnicas comparadas y a la prueba de oro, (examen directo –lugol), realizándose este proceso nuevamente tres veces con las mismas cantidades inoculadas y en las mismas 10 muestras negativas. Se determinó el grado de concordancia de estas, a través de Índice de Kappa.

Se realizó una campaña de sensibilización de la importancia de una buena higiene en nuestras tareas cotidianas, se les habló a los niños de los grados tercero, cuarto y quinto de la escuela Vivencias de Calarcá Quindío, sobre los Coccidios y otros tipos de parásitos.

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

Resultados

Para realizar todo el análisis comparativo entre las tres técnicas de coloración, se establecieron dos categorías de muestras positivas y negativas, respecto a la ausencia y presencia de ooquistes, sin importar el número de ooquistes visualizados, implementando como criterio diagnóstico la micrometría, para obtener la medida de los ooquistes, los cuales tienen un diámetro de 4 a 6 micras tomando como positivos los ooquistes que estén entre este rango de diámetro. La tabla 1 resume el número de positivos y negativos para los ooquistes de *Cryptosporidium*, de las 70 muestras analizadas, con las técnicas de tinción Ziehl-Neelsen modificada, Giemsa, y Safranina – azul de metileno y la prueba de oro. Cada una de las 70 muestras fue sometida a técnica de concentración de Ritchie, para tomar el pellet del resultado y realizar los montajes para las tinciones.

En la tabla 2 se puede observar el número de ooquistes encontrados de *Cryptosporidium*, que se inocularon en la muestra de materia fecal negativa, donde las muestras fueron sometidas con las tres técnicas de tinciones respectivas y la prueba de oro.

1. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero. Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

Tabla 1. Resultados de las técnicas Zielh- Neelsen modificada, Giemsa, y Safranina – azul de metileno, y lugol en 70 muestras de materia fecal.

TECNICA	Número de muestras totales analizadas	Número de ooquistes total en positivos	Número de muestras positivas para <i>Cryptosporidium</i>	Número de muestras negativas para <i>Cryptosporidium</i>
Zielh-Neelsen Modificada	70	42	16	54
Giemsa	70	27	14	56
Safranina-azul de metileno	70	21	9	61
Lugol	70	42	16	54

Tabla. 2 se resume el conteo de positivos y negativos con respecto a la prueba de oro en las tablas dos por dos para evaluar sensibilidad y especificidad. (cada técnica se compara con la prueba de oro, observación con micrometría y lugol.)

Tabla 2 X2 para Zielh – Neelsen modificada.		Tabla 2 x 2 para Giemsa		Tabla 2 x 2 para Safranina - Azul de metileno.	
16	0	9	7	8	8
0	54	8	46	1	53
	muestras positivas para la prueba de oro y la técnica				
	muestras positivas para la prueba de oro y negativos para la técnica				
	muestras negativas para la prueba de oro y positivas para la técnica				
	muestras negativas para la prueba de oro y la técnica				

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

Tabla 3. Resultado del conteo de ooquistes inoculados en controles negativos con las técnicas Ziehl- Neelsen modificada, Giemsa, y Safranina – azul de metileno y la prueba de oro.

DILUCIONES SERIADAS (número de ooquistes)	NUMERO DE OOQUISTES CON ZNm	NUMERO DE OOQUISTES CON GIM	NUMERO DE OOQUISTES CON S-A	NUMERO DE OOQUISTE CON LUGOL
1 (15)	3	0	0	3
2(14)	4	1	2	4
3(13)	3	0	1	3
4(12)	3	0	0	3
5(11)	2	0	1	2
6(10)	3	1	1	3
7(9)	1	0	0	1
8(8)	1	0	1	1
9(7)	1	0	0	1
10(6)	0	0	0	0
TOTAL	21	2	6	21

ZNm: Ziehl-Neelsen modificada; GIM: Giemsa; S-A: Safranina – Azul de metileno.(cada una de las técnicas se apoya con la micrometría.

En la tabla 3 se debe tener en cuenta que el conteo de lo ooquiste en la cámara neubawer se realiza solo con 10 µl de la muestra que se tienen como control positivo, en la cual se realizó un conteo total de 80 ooquistes, a partir de estos 10 µl se realizaron las 10 diluciones y se estimo el número esperado en cada una. De estas diluciones se realizó el montaje con 3 µl, por esto el número de ooquistes esperado es el que se muestras en la primera columna de la tabla.

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

Tabla 4. Resultado del conteo de ooquistes de *Cryptosporidium* en la prueba de reproducibilidad.

diluciones	GIM			Zn-m			S-A			Lugol		
	1	2	3	2	4	8	10	4	3	1	4	8
1	2	3	2	4	8	10	4	3	1	4	8	10
2	1	3	2	4	7	9	4	1	1	4	7	9
3	0	2	0	3	5	6	2	0	1	3	5	6
4	0	0	1	1	4	4	0	1	1	1	4	4
5	0	0	0	1	2	3	1	1	0	1	2	3
6	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	3	8	5	15	27	33	11	6	4	15	27	33

ZNm: Zielh-Neelsen modificada; GIM: Giemsa; S-A: Safranina – Azul de metileno. (cada una de las técnicas se apoya con la micrometría.

Con el análisis de los datos de la tabla 1 se encontró una sensibilidad de 100 % , 52.9 % , 88.8 % y una especificidad de 100 % , 86.7 % , 86.8 % , para las tinciones Zielh-Neelsen modificada, Giemsa y Safranina - azul de metileno, respectivamente. En la tabla 2 y 3 se analizan la fiabilidad de cada una de las técnicas, El nivel de confiabilidad fue de 0.98 (excelente), 0.45 (moderada) 0.56 (buena) para cada un de las técnicas mencionadas.

Con los niños de los grados tercero, cuarto y quinto de la Escuela Vivencias Infantiles, se desarrollaron diferentes actividades, como el trabajo con guías educativas, donde los niños expresan su conocimiento sobre los tema de la charla, donde se manejo la importancia de la higiene en nuestra vida cotidiana y un poco sobre el mundo de los parásitos.

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

Discusión

Dentro de los llamados patógenos intestinales emergentes se destaca un grupo de protozoarios parásitos intracelulares conocidos como coccidios intestinales donde se incluyen *Cristosporidium sp.* , *Isospora sp.* y *Cyclospora sp.*, que causan, respectivamente, criptosporidiosis, isosporiosis y ciclosporiosis.¹⁵

La identificación de quistes, ooquistes o trofozoítos de protozoarios enteroparasitos puede necesitar en circunstancias determinadas coloraciones especiales. La hematoxilina férrica de Heindenhein ha sido el método tradicionalmente empleado en nuestro medio, pero su laboriosidad, prolongado tiempo de procesamiento y manejo artesanal de alguna de sus fases (decoloración), han hecho desaconsejable su empleo en los actuales esquemas diagnósticos de rutina.^(.16)

En este estudio, se tuvieron en cuenta coloraciones diferenciales tales como. Zielh- Neelsen modificada, Giemsa, y Safranina – azul de metileno, que en su mayoría se les ha evaluado su sensibilidad y especificidad, para el diagnóstico de otro coccidio denominado *Cyclospora sp.* , como este presenta características similares al *Cryptosporidium sp.* en cuanto a forma y composición del ooquiste; las técnicas de tinción mencionadas se evaluaron esta vez, para el diagnóstico de

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

Cryptosporidium, ya que son pocos los estudios que evalúen sensibilidad y especificidad de estas tinciones para este microorganismo.

En los resultados obtenidos en estudios realizados para *Cyclospora*, en la comparación de dos técnicas de tinción, se encontró que para Zielh- Neelsen modificada, presentaba una sensibilidad de 95% y una especificidad de 98.8 % , mientras que con Safranina modificada una sensibilidad de 90 %, y una especificidad del 100 %, indicando un elevado alto grado de concordancia. ¹⁷ . Según los resultados de la sensibilidad y especificidad de las tinciones comparadas, en este estudio, en el caso de *Cryptosporidium*, las técnicas no presentan diferencias significativas, lo que apunta a que el uso de las tres tinciones pueden resultar útiles como herramientas diagnósticas ,siendo la tinción de Zielh- Neelsen modificada, la más sensible y específica.

Las dificultades y lo laborioso del diagnóstico, del coprológico de *Cryptosporidium*, ha propiciado el desarrollo de estuches comerciales basados en la capturas de antígenos fecales, pero existen muchos factores que afectan la calidad del estuche, al utilizar este estuche en diagnóstico y prevalencia de *Cryptosporidium* sp., encontraron una especificidad de 90.7% y una sensibilidad de 57.1 %, ¹⁸ . La sensibilidad en este estudio para la técnica de tinción de Zielh – Neelsen fue de 100% y la especificidad de 100 % en el diagnóstico coprológico.

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

En los últimos años se han realizado estudios de protocolos diagnósticos de protozoos, pero estos han apuntado a la parte molecular, por esto cabe recordar que estos tipos de estudios deben de seguir, ya que no todos laboratorios tienen la disponibilidad de equipos, para la realización de nuevos tipos de diagnósticos. Por esto las investigaciones deben apuntar también a formas fáciles y prácticas para mejorar los diagnósticos, siendo en este caso las tinciones, para obtener datos de una forma práctica, a la hora de realizar estudios poblacionales de este tipo de microorganismos en zonas lejanas o en laboratorios sencillos.

En los diferentes estudios de prevalencia de *Cryptosporidium sp.*, han evaluado la sensibilidad y especificidad de técnicas utilizadas, como la técnica de ELISA para su diagnóstico, encontrando así un 93.5% de sensibilidad y un 97% de especificidad.^(19,20) En los estudios poblacionales de coccidios, han utilizado como herramienta diagnóstica las técnicas de tinción de Zielh- Neelsen y la de safranina, pero no se ha evaluado su sensibilidad y especificidad para coccidios como el *Cryptosporidium*.^(21,22)

Se puede concluir que con base a los resultados obtenidos en este estudio, es posible proponer como técnica recomendada por su sensibilidad y especificidad la coloración diferencial de Zielh-Neelsen modificada, como herramienta diagnóstica de *Cryptosporidium sp.*, esto puede ser por la afinidad de los colorantes a la pared de los ooquistes, y el uso del alcohol ácido. se recomienda realizar estudios más

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

extensos, aumentando el número de muestras coprológica, donde se evaluó la sensibilidad y especificidad, en busca de mejorarla.

Recomendaciones

Las técnicas de tinción son muy prácticas como herramientas diagnósticas de *Cryptosporidium* y otros protozoos, por esto se recomienda realizar estudios para evaluarlas, aumentando el número de muestras, además que tengan también el objetivo de mejorarlas, según la necesidad de los laboratorios.

1. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

ANEXO 1.

TÉCNICA DE RITCHIE MODIFICADA

- Cuando la materia fecal es dura, agregue solución isotónica y mezcle hasta que quede líquida, en cantidad aproximada de 10 ml.
- Pasar por una gasa doble y húmeda, aproximadamente 10 ml de la materia fecal líquida a un tubo de centrifuga de 15 ml.
- Centrifugue a 1500 rpm – 2000 rpm por 2 minutos. Se decanta el sobrenadante.
- Diluir el sedimento en solución salina, centrifugar como se indico anteriormente y decantar.
- Agregar al sedimento aproximadamente 10 ml de formol al 10 %, mezclar bien y dejar reposar por 5 minutos.
- Agregue 3 ml de éter, tapar el tubo y mezclar fuertemente durante 30 segundos. Destapar cuidadosamente.
- Centrifugar a 1500 rpm por 2 minutos. Se forman 4 capas distribuidas así: un sedimento pequeño que contiene los huevos, quistes, etc.; una capa de formol; un anillo con restos materia fecal y el éter en la superficie.
- Con un palillo se afloja de las paredes del tubo el anillo con reto de materia fecal y cuidadosamente se decanta las tres capas superiores.
- Se mezcla el sedimento con las pequeñas cantidades de líquido que baja por las paredes de tubo y hacer preparaciones en fresco y con lugol.

ANEXO 2

TINCIÓN ZIEHL – NEELSEN MODIFICADA

- La muestra de materia fecal se extiende en el porta objeto en un área aproximada de 1 ½ cm de diámetro.
- La coloración se hace con carbol-fucsina concentrada (fucsina básica 1g: 10 ml de etanol al 5 %: 90 ml) con este colorante se deja 20 minutos
- Se lava con agua de grifo durante 2 minutos.
- Se decolora con alcohol ácido, por 10 minutos o hasta que decolore.
- El colorante de contraste es azul de metileno durante 5 minutos.
- Finalmente se lava con agua corriente durante 1 minuto y se deja secar a temperatura ambiente.

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

ANEXO 3

TINCIÓN DE SAFRANINA- AZUL DE METILENO

- La muestra de materia fecal se extiende en el porta objeto en un área aproximada de 1 ½ cm de diámetro.
- Se hace la coloración con azul de metileno por 10 minutos.
- Se lava con agua de grifo
- Se hace a coloración contraste con safranina.
- Se lava a chorro.

ANEXO 4

COLORACION DE GIEMSA

- Se hace un extendido de materia fecal.
- Se fija con metanol, se voltea la placa hasta que seque
- Se aplica colorante giemsa por 10 minutos
- Se aclara con agua

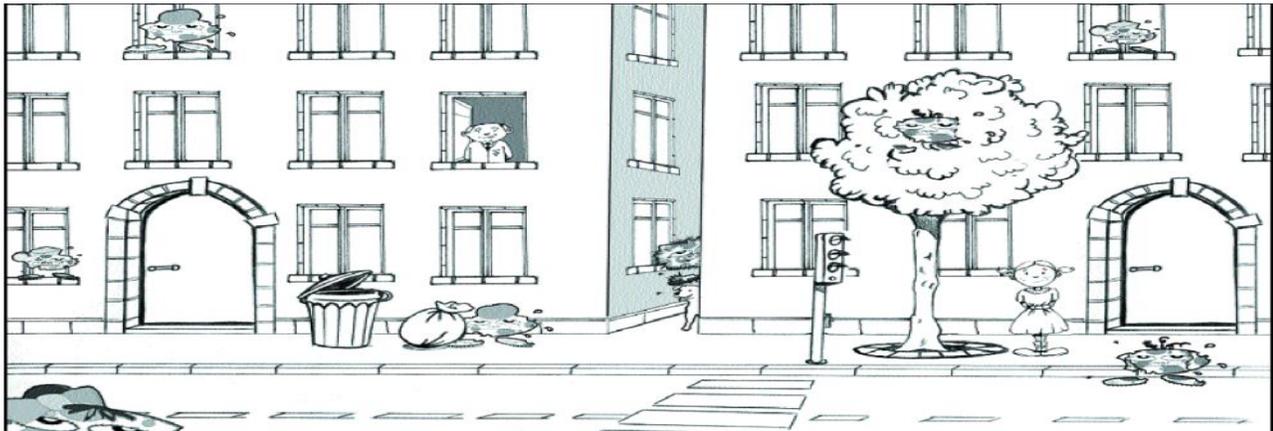
1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

GUIA 1. Actividad práctica.
APLIQUEMOS LO QUE APRENDIMOS

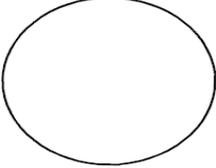
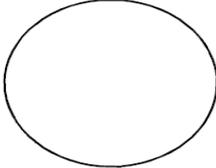
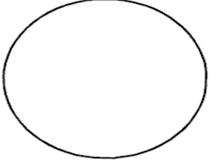
1. Observa el tamaño de un microbio al compararlo con el tamaño de una hormiga



2. En este dibujo se han escondido una gran cantidad de pequeños microbios, intenta encontrarlos y coloréalos.



3. ¡No tengas miedo! No todos los microbios son malos, pueden servir para hacer:

	Queso		Yogures		Medicinas
4. 5. 6. 7. 8.		Dibuja un queso		Dibuja una medicina	
			Dibuja un yogur		

9. Hay varios tipos de higiene, une cada higiene con el objeto que le corresponda.

	●	● Higiene corporal	=	
	●	● Higiene alimenticia	=	
	●	● Higiene doméstica	=	
	●	● Higiene y animales	=	

1. Faci
 Colomb
 Armeni
 Univers
 .Univer

Referencias

1. Velasco C., García J., Criptosporidiosis en pediatría: etología, epidemiología cinética de la infección y clínica. 2002. Revista médica vol. 16 pg. 20 – 29.
2. Águila A, et al. Entero parasitismo y desnutrición en niños de un comedor infantil, Huanta (Ayacucho-Perú) 1992. Parasitología al día 16: 98-105.
3. Botero D., Restrepo M., otros protozoos intestinales. Parasitosis humana. 1998. Corporación para investigaciones biológicas tercera edición pg. 69 – 72.
4. Velasco C., et al . Prevalence of criptosporidiosis in children youger than 13 years. 2002. J Pediatri gastroenterol. Vol 35 pg. 4 – 37.
5. Carreño M., Velasco C., Rueda E., Prevalencia de *cryptosporidium sp.* en niños menores de 13 años con afecciones oncológicas. 2005. Revista colombiana Médica. Vol. 36 N 2 pg. 6 – 9.
6. Kuhls T., criptosporidiosis during childhood.2000 Semin pediatric infect dis. Vol. 2 Pg. 213 – 219.
7. Arango M., Rodríguez D., Prado N., Frecuencia de *Cryptosporidium sp.* en materia fecal de niños entre un mes y trece años en un hospital local Colombiano. 2006. Vol. 37 N°2, (abril- junio).
8. Rivera O, Vásquez R., *Cryptosporidium Sp*: informe de un caso clínico en Popayán, Cauca. Revista Colombiana de gastroenterología.2006 Vol. 21 n° 3. Pg. 23-26.

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

9. Rodríguez J, Rayo G, Cristosporidium y Criptosporidiasis. Servicio de microbiología. Hospital general Universitario de Elche . 2004. Universidad Miguel Hernández. Control de calidad.
10. Avery B., Lemley A., Hornsby A., Cryptosporidium. Un patógeno transmitido por el agua. 2000. Departamento de Soil and Water Science, Servicio de Extensión Cooperativa de la Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de la Florida. (UF/IUFAS).
11. Solarte Y., Peña M., Madera C., Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. 2006. Revista Colombia Médica Vol. 37 n° 1(Enero – Marzo).
12. Barrios E., Delgado V, Araque W, Chig M, Martinez L, Materán G, López Y, Peralta J., *Cryptosporidium*: diagnóstico y prevalencia en niños sanos del estado Carabobo, Venezuela. 2004. Salud online. Vol 8 N°! 2 pg. 45 – 52. Colombia.
13. Galván A, Herrera V, Jaramillo Z, rodriguez S, Delgado M, Coloración de Zielh-Neelsen y Safranina modificada para el diagnostico de *Cyclospora cayetanensis*. 2008. Rev. Salud pública. vol. 10 (3) 488- 493.
14. Vásquez O., et al . Infección por *Cyclospora cayetanensis*. Diagnostico de laboratorio. 2000. Revista Latinoamérica de Microbiología. Vol. 42 Pg. 45 – 52.
15. CHACIN L, *Cryptosporidium*: Filogenia y taxonomía. *Invest. clín*, mar.,2007 vol.48, no.1, p.1-4. ISSN 0535-5133.

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.

16. Peralta M., y Ayala J., Algunas consideraciones sobre la prevalencia actual de *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, coccidios, microsporidiosis y mixosporidiosis. Barranquilla Colombia. Revista Salud Uninorte . 2008.vol. 24 n° 2 Pg. 294- 302
17. Cuellar N.,. Tesis prevalencia de infecciones intestinales causadas por Coccidios: *Cryptosporidium* sp, *Cyclospora cayetanensis* e *isospora belli*. 1997. Universidad de San Carlos Guatemala , Facultad de ciencias Químicas y farmacia. Guatemala.
18. Carreño M, Velasco C, Rueda E,. Prevalencia de *Cryptosporidium* en niños de 13 años con afecciones oncológicas. Revista Colombia médica.2005. Vol 36 N° 2. Universidad del Valle. Cali, Colombia.
19. Huiza A., Espinosa Y., Rojas R., *et al.* Detección de coccidios en niños asintomáticos mediante esporulación de muestras fecales. *An. Fac. med.* 2004, vol.65, no.4 pg 239-242.
20. Tuli L, Singh DK, Gulati AK, Sundar S, Mohapatra TM. Una evaluación de la utilidad de multiatributo de diferentes métodos para la detección de protozoos entérico que causan diarrea en pacientes con SIDA. 2010 *Microbiol.* vol 15;10:11.
21. Salvatella R., Balleste R., Purme A., Rodríguez G., Eirale C., Calegarl L., *Cyclospora cayetanensis* en Uruguay. Agente de diarrea del viajero adquirido en el exterior. Revista medica de Uruguay.2002 Vol. 18 pg. 175-1
22. Mahdi N, Ali N. *Cryptosporidium* y otros parásitos intestinales en pacientes con diarrea crónica. *Salud Med J.* 2004 Sep;25(9):1204-7.

1 .Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia. 2. Facultad de Educación, programa de Licenciatura en Biología y educación Ambiental, Universidad del Quindío, Armenia Colombia, Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. 3. Presidente de la Asociación Colombiana de infectología del eje cafetero .Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.