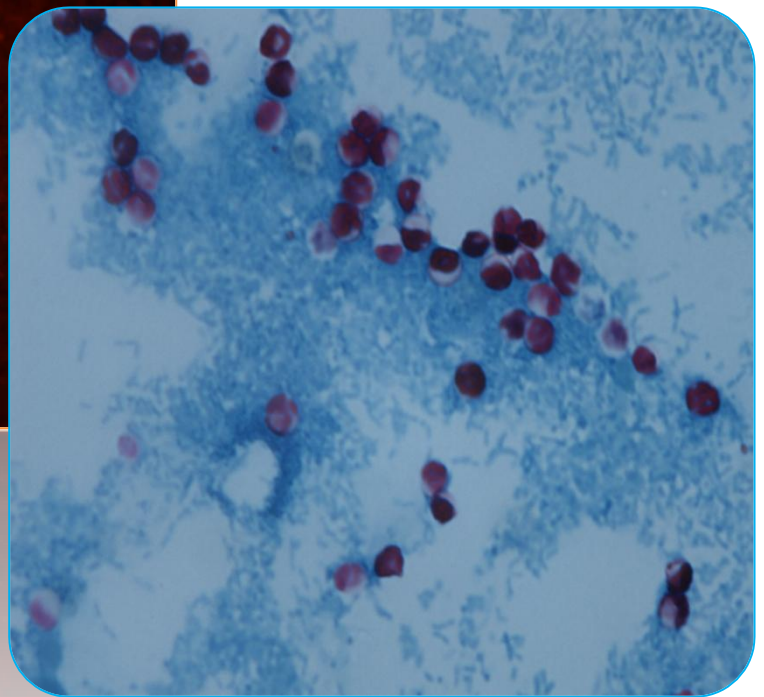
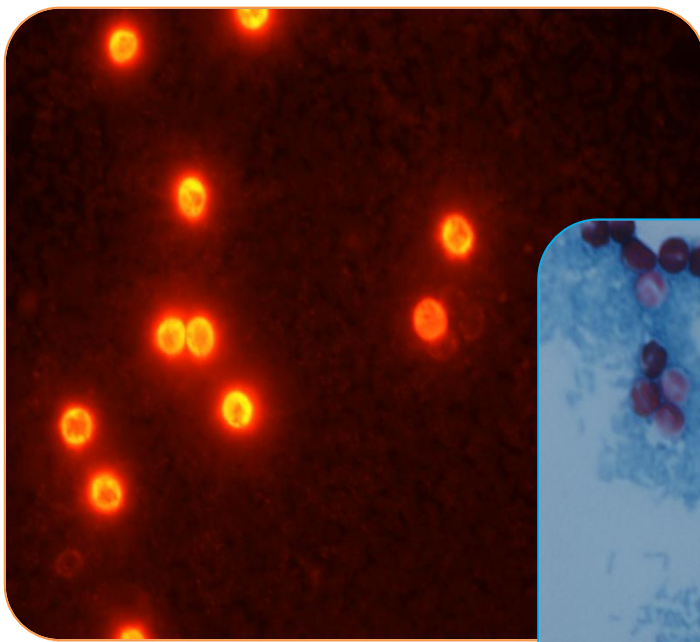


# Comparación de la aplicabilidad de técnicas clásicas y moleculares para el diagnóstico de la cryptosporidiosis en la práctica de un laboratorio clínico.



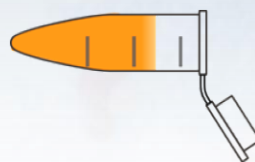
## AUTORA:

- Tania Pastor Bonel

## DIRECTORA:

- Dra. Pilar Goñi Cepero  
Profesora ayudante- Doctor de  
Parasitología

Departamento de Microbiología,  
Medicina Preventiva y Salud  
Pública



## **AGRADECIMIENTOS**

Nuestro agradecimiento al Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza y al Servicio de Microbiología Clínica del Complejo Asistencial Universitario de León-Sacyl por haber cedido las muestras y por su diagnóstico previo.

Agradecemos a la empresa Operon, SL., Zaragoza, España, por el donativo desinteresado de los test de diagnóstico de Inmunocromatografía.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto UZ2013-FIS-02, de la Universidad de Zaragoza.

Quisiera agradecer al equipo del laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina por la ayuda proporcionada y el apoyo recibido por su parte. A Pilar por su ayuda, tiempo y optimismo durante todo este tiempo.

A Matheus, mi compañero de TFG, con el que he compartido mucho tiempo y bromas, sin su ayuda y apoyo el trabajo de laboratorio hubiera resultado más arduo y complicado.

A mi familia por la paciencia y apoyo moral cuando el trabajo se hace cuesta arriba.

## **RESUMEN**

La cryptosporidiosis en humanos se caracteriza normalmente por síntomas gastrointestinales agudos de diarrea acuosa acompañada de dolores cólicos abdominales, vómitos, febrícula y pérdida de apetito. Estos síntomas indican que el patógeno principalmente afecta al intestino delgado, causando malabsorción e inflamación. El objetivo de este trabajo es la comparación de los métodos de diagnóstico para *Cryptosporidium* spp en muestras de heces, que se encuentran disponibles en la actualidad para su posible utilización en la rutina de un laboratorio de Parasitología.

Se han analizado un total de 74 muestras, 23 muestras previamente diagnosticadas por microscopía como positivas para *Cryptosporidium* spp., 32 muestras previamente diagnosticadas como positivas para *Giardia duodenalis* y 19 muestras diagnosticadas como negativas para tanto para *Cryptosporidium* como para *Giardia duodenalis*. A todas ellas se les aplicaron las siguientes técnicas de análisis: inmunocromatografía, PCR para los genes *SSU* y *gp60* y LAMP-PCR, esta última recientemente descrita, La comparación se llevó a cabo tomando microscopía como técnica "gold standard" y calculando la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) y el índice de concordancia Kappa.

Se ha obtenido una buena concordancia de la inmunocromatografía (0,871) con microscopía y mejor concordancia de la PCR-*SSU* (0,906) que de PCR-*gp60* (0,548), siendo la peor la obtenida para la LAMP-PCR (0,097). Estos resultados se interpretan por la necesidad de tratamiento previo de las muestras para las técnicas moleculares, lo que supone además, un aumento del coste respecto a microscopía e inmunocromatografía.

Considerando como factores fundamentales sus características de sensibilidad, especificidad, VPN, VPP, coste y concordancia con microscopía, el orden de aplicabilidad de las técnicas estudiadas, sobre muestras de heces frescas, en un laboratorio clínico de rutina de Parasitología, es el siguiente: microscopía > inmunocromatografía > PCR (*SSU*, *gp60*) > PCR- LAMP.

## **SUMMARY**

Human cryptosporidiosis is expressed by acute gastrointestinal symptoms like diarrhoea and abdominal cramps, vomits, fever and lost of weight. These symptoms reveal that this pathogen affects the small bowel mainly, causing absorption disorders and inflammation.

The aim of this work is the comparison among the available diagnosis methods for *Cryptosporidium* spp.in faeces and their applicability in a routine laboratory.

Seventy-four samples have been analyzed, 23 of them were positive for *Cryptosporidium* spp. by microscopy, 32 of them were positive for *Giardia duodenalis* and 19 samples were negative for both, *Cryptosporidium* and *Giardia duodenalis*. All of the samples were subjected to the following diagnosis techniques: immunochromatography, PCR for SSU and *gp60* genes and LAMP-PCR whose applicability has been recently described. Microscopy was the “gold standard” technique and for the comparison sensibility, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and consistency Kappa index were calculated

Good consistency of immunocormatography and microscopy has been found (0,871), PCR-SSU (0,906) consistency is better than PCR-*gp60* (0,548), and the worst one is the consistency between LAMP-PCR and microscopy (0,097). These results are explained by the need of previous treatment of the samples, but this implies an increase in costs. Considering sensibility, specificity, PPV, NPV, costs and consistency of the different techniques and microscopy as a reference, the order of applicability of the diagnosis techniques in fresh faeces samples, in a routine laboratory of Parasitology is: microscopy > inmunochromatography > PCR (SSU, *gp60*) > PCR-LAMP.

**PALABRAS CLAVE:** *Cryptosporidium*, cyptosporidiosis, diagnóstico, inmunocromatografía, PCR, LAMP-PCR

**KEY WORDS:** *Cryptosporidium*, cryptosporidiasis, diagnosis, immunochromatography, PCR, LAMP-PCR

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
a. Breve historia.....	1
b. Epidemiología.....	2
i. Fuentes de infección y mecanismos de transmisión	
ii. Individuos susceptibles	
iii. Biología y ciclo de <i>Cryptosporidium</i>	
c. Taxonomía .....	5
d. Sintomatología.....	7
e. Diagnóstico.....	7
i. Biopsia y muestra de heces	
ii. Inmunoanálisis	
iii. Técnicas moleculares	
iv. LAMP-PCR	
f. Tratamiento.....	13
2. OBJETIVOS DE ESTUDIO.....	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
a. Procedencia de las muestras	
b. Técnica de concentración	
c. Preparación de ooquistes para microscopía	
d. Microscopía	
e. Extracción de ADN genómico de <i>Cryptosporidium</i> spp.	
f. Purificación de ooquistes mediante gradiente de sacarosa	
g. PCR-RFLP	
h. Digestión	
i. Análisis de heces mediante inmunocromatografía	
j. LAMP-PCR	
k. Prueba de sensibilidad	
l. Análisis de resultados	
4. RESULTADOS.....	24
5. DISCUSIÓN.....	30
6. CONCLUSIONES .....	35
7. BIBLIOGRAFÍA.....	37

## 1. INTRODUCCIÓN

### a. BREVE HISTORIA

Jackson Clark fue el que en 1895 observó por primera vez *Cryptosporidium* en el epitelio gástrico de ratón y los definió como "conglomerados de esporas". Sin embargo, los identificó como *Eimeria falciforme* no reconociéndolo como nuevo género.

El género *Cryptosporidium* fue establecido por Ernest Edward Tyzzer en 1910, quien tres años antes, en 1907, descubrió este protozoo en las glándulas gástricas de un ratón de laboratorio asintomático y describió su ciclo y dentro de él, tanto su reproducción sexual como asexual (Tyzzer 1907, Fayer et al. 2007). Tyzzer lo identificó como un nuevo parásito de taxonomía incierta, denominándolo *Cryptosporidium muris* (Fayer et al. 2007). *Cryptosporidium* significa "esporas ocultas" haciendo referencia a que, a diferencia de otros coccidios conocidos, los esporozoítos se encontraban directamente en el ooquiste (Tyzzer 1910).

En 1912, Tyzzer descubrió una nueva especie, *C. parvum*, que se desarrollaba únicamente en el intestino delgado en los experimentos realizados con ratones de laboratorio. Además, comprobó que los ooquistes de esta nueva especie eran de menor tamaño que los de *C. muris* (Tyzzer 1912, Fayer et al. 2007).

En 1951 se describió diarrea por *C. meleagridis* en pavos y en 1971 se publicaron las primeras infecciones clínicas en mamíferos y cobayas (Slavin et al. 1955; Panciera et al. 1971; Vetterling et al. 1971). Por ello, originariamente se pensó que *Cryptosporidium* era un parásito exclusivamente de interés veterinario, ya que se consideraba patógeno de animales causando zoonosis.

Los dos primeros casos de cryptosporidiosis en humanos fueron reportados en 1976 (Nime et al. 1976; Meisel et al. 1976); se trataba de pacientes que habían adquirido la enfermedad debido al contacto con animales infectados. El tercer caso en humanos se dio en un niño de 9 años con hipogammaglobulinemia congénita y con contacto frecuente con animales de granja y animales domésticos. El cuarto caso fue reportado en 1970 y afectó a un hombre de 52 años con déficit de IgA e inmunodeprimido tras un trasplante renal y sin contacto conocido con animales. Por tanto, los primeros casos en humanos se diagnosticaron en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida que asociaban neoplasias y otras infecciones de agentes oportunistas, entre ellos *Cryptosporidium*.

Posteriormente y hacia 1985, se comunicó un brote de diarrea entre niños inmunocomprometidos en una guardería en Philadelphia. Pero fue tras el brote ocurrido en Milwaukee, en 1993, cuando *Cryptosporidium* fue reconocido como un riesgo para la salud pública. Debido a un fallo en los sistemas de filtración de las potabilizadoras de agua de la ciudad, los ooquistes del *Cryptosporidium* llegaron al consumo humano produciendo cuadros diarreicos en unas 400.000 personas, de las cuales unas 100 murieron. (Mac Kenzie et al. 1995).

El caso de Milwaukee fue el primer gran brote mundial de cryptosporidiosis. El segundo gran brote data de 2010. Tuvo lugar en la ciudad sueca de Östersund, viéndose afectados unos 27000 habitantes debido al consumo de agua mal tratada. El agente causal detectado fue *C. homnis* IbA10G2. Ha habido nuevos brotes

posteriormente (cuatro meses más tarde en la ciudad de Skelleftea al Norte de Östersund) pero éste fue el mayor brote de cryptosporidiosis descrito en Europa hasta la fecha (Wildestrom et al. 2014).

## **b. EPIDEMIOLOGÍA**

### **i. Fuentes de infección y mecanismos de transmisión**

Tanto el hombre como diversas especies de animales pueden actuar como reservorio y como fuente de infección de *Cryptosporidium*. Entre las especies animales, las de mayor importancia se encuentran los animales de granja (sobre todo ganado ovino y bovino) ya que sus ooquistes son infecciosos para los seres humanos y la prevalencia de cryptosporidiosis en muchas especies animales es elevada.

También se ha hablado de los animales de compañía como fuente probable de infección, especialmente para pacientes inmunodeprimidos, encontrándose, por ejemplo, una prevalencia de cryptosporidiosis del 7% en perros en Zaragoza (Causapé et al. 1996).

La dosis infectiva media de *C. parvum* es muy baja (de 1-10 ooquistes). Pero además, un individuo infectado puede producir enormes cantidades de ooquistes, que son infecciosos ya al ser eliminados en las heces y pueden permanecer viables durante meses o años en una amplia variedad de condiciones ambientales (Robertson et al. 1992).

La infección se produce bien por transmisión indirecta a través de la ingesta de ooquistes con comida o agua contaminadas, o por contacto directo con personas o animales infectados o con superficies contaminadas. A pesar de ser los mecanismos de transmisión más estudiados, también se ha hablado de la posible transmisión respiratoria del parásito en niños inmunocompetentes en un estudio realizado en Uganda (William Checkley et al. 2015).

### **ii. Individuos susceptibles**

Como en muchas otras infecciones, los grupos de personas más susceptibles son los niños y los inmunodeprimidos (la mayoría pacientes VIH +). En el caso de los niños, probablemente sea por estar más expuestos debido a sus hábitos de gatear, llevarse todo a la boca, no lavarse las manos... y por no haberse inmunizado anteriormente, ya que la inmunización previa por una infección anterior eleva la dosis infectiva y disminuye la intensidad de la infección.

Con respecto a las dos especies que más afectan al ser humano, ambas tienen mayor prevalencia en personas jóvenes, siendo la población afectada por *C. parvum* más joven que la de *C. hominis*; pero *C. hominis* presenta dos picos de mayor prevalencia, en menores de un año y en personas adultas (Chalmers 2009). También se han observado diferencias temporales y geográficas en cuanto a la prevalencia de las diferentes especies, concretamente entre *C. parvum* y *C. hominis*. (Chalmers et al. 2009). Sin embargo, en un estudio realizado por Chalmers et al., en 2009, en la población de Inglaterra y Wales, no se encontraron diferencias significativas entre la

prevalencia de las diferentes especies en personas inmunocompetentes e inmunodeprimidas.

También es preciso comentar que un inóculo suficientemente elevado podría hacer susceptible de infección al resto de la población, como se dio, por ejemplo, en el brote de Milwaukee en 1993 donde el 25% de la población se vio afectada por *Cryptosporidium* (MacKenzie et al. 1995).

Al igual que en el resto de Europa, en España *C. parvum* y *C. hominis* subtipo IbA10G2R2, son las especies más identificadas como agentes causales de cryptosporidiosis. Por ejemplo, en un estudio realizado en dos hospitales de Barcelona entre los años 2004 y 2009, fueron detectados 161 casos de cryptosporidiosis, habiendo sido producidos el 88.4% de los casos por *C. hominis* (el 90% correspondieron al subtipo IbA10G2) y el 10.1% por *C. parvum* (Segura et al. 2015).

A pesar de ello, hay diferentes estudios donde se recogen otras especies y subtipos de *Cryptosporidium* identificados en España. Así, por ejemplo, en el verano del 2012 fue identificado en Navarra el subtipo IaA18R3 de *C. hominis*. En 2013 fueron estudiados en Granada, un grupo de siete niños que acudían a la misma guardería. En cinco de ellos se detectó un nuevo subtipo de *C. hominis*, IaA11R2, constituyendo el primer brote de Europa causado por este subtipo (Goñi et al., 2015).

Especies no tan frecuentes han sido identificadas en diferentes regiones de España, en dos estudios realizados en León y Zaragoza entre el año 2010 y 2011. El caso de León, se trata de un niño de 6 años que, aunque vive en medio urbano había pasado unos días en el medio rural en contacto con animales de granja (una oveja), acude por dolor abdominal y tras el estudio, se identifica *C. ubiquitum* (Cieloszyk et al. 2012).

El estudio de Zaragoza recoge el caso de un hombre de 46 años de edad, VIH + procedente de área rural que acude por diarrea, pérdida de peso y mal estar general de un mes de evolución. En el estudio de una muestra de heces se detectó *C. felis* constituyendo el primer caso autóctono de España causado esta especie (Cieloszyk et al., 2012).

### iii. Biología y ciclo de *Cryptosporidium*

Se trata de un protozoo, cuyo genoma consta de ocho cromosomas de entre 1 y 1,5 millones de pares de bases, con un tamaño total de unos 10 millones, y de una molécula extracromosómica de ADN de bajo peso molecular.

*Cryptosporidium parvum* y *hominis* tienen su hábitat en el tracto gastrointestinal (principalmente intestino delgado) de un solo hospedador (ciclo monoxeno) con estadios de desarrollo asexuales y sexuales. En algunas especies de animales y en humanos severamente inmunocomprometidos se han visto formas extraintestinales.

El ooquiste (4,5 x 5 µm) consta de una pared trilaminar que protege y mantiene la viabilidad de cuatro esporozoítos en forma de banana (con el extremo anterior ligeramente puntiagudo y el posterior redondeado, un núcleo prominente en el tercio posterior del cuerpo) y un cuerpo residual. Estos esporozoítos se disponen paralelos



entre sí dentro del ooquiste, que constituye la forma infectiva (Fayer et al 1995). Los esporozoítos son liberados en el tracto gastrointestinal.

La presencia de dicha pared requiere un desenquistamiento que se ve favorecido por diversos factores como temperatura de 37°C, presencia de dióxido de carbono, pH ligeramente alcalino, condiciones reductoras, enzimas pancreáticos y sales biliares; pero además puede darse en ausencia de dichas condiciones explicando la colonización en localizaciones extraintestinales, como conjuntiva o tracto respiratorio, vesícula biliar, nódulos linfáticos, testículos, ovarios, útero y vagina (Fleta et al. 1995).

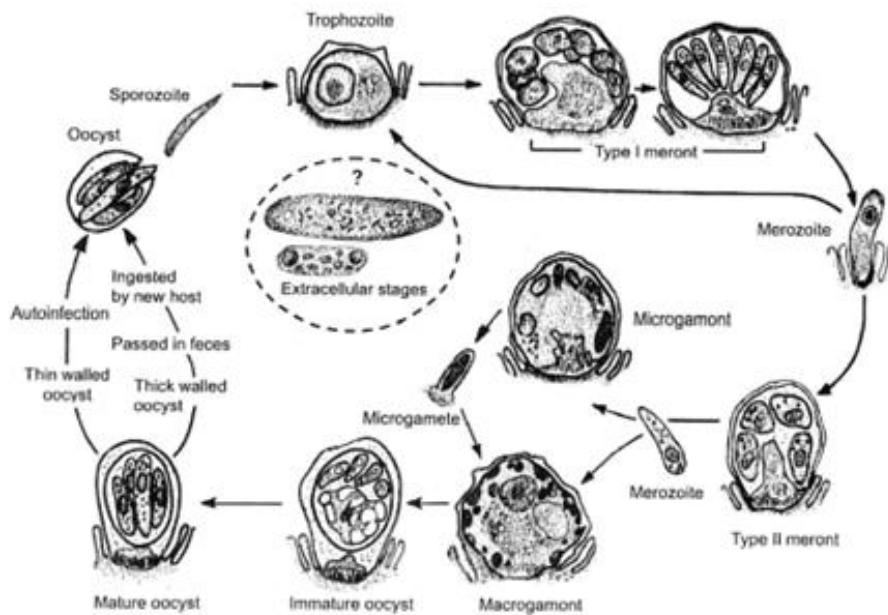


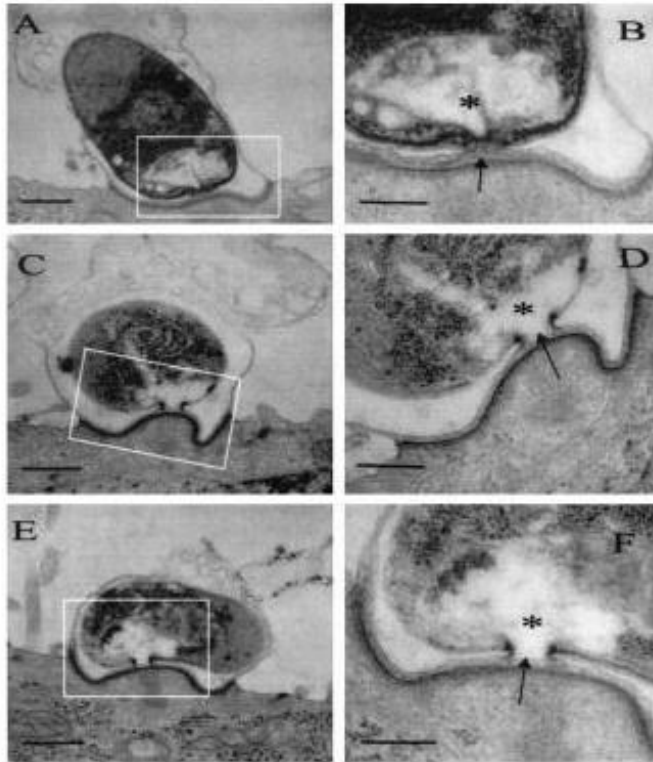
Figura 1. Representación del ciclo vital de *C. parvum*. Tomado de Fayer et al. 1997

Los esporozoítos libres se unen por su extremo anterior a las células epiteliales del íleon, principalmente. Los esporozoítos expresan un complejo glicoproteico llamado CSL (*Cryptosporidium* sporozoite ligand) que contiene un ligando involucrado en el acoplamiento al epitelio de las células intestinales durante el proceso de infección.

Los esporozoítos permanecen en el ápice de la célula hospedadora y se recubre con un pliegue de la membrana celular de la misma hasta quedar englobado por completo formándose la vacuola parasitófaga (Huang et al. 2004). La membrana de la vacuola se funde con la del ooquiste formándose una interfase hospedador-quiste, de tal manera que el quiste se encuentra intracelular pero extracitoplasmático. Seguidamente, tiene lugar un proceso de maduración y ambas estructuras quedan conectadas directamente actuando la célula hospedadora como organelo de nutrición para el parásito. Al mismo tiempo que todo esto ocurre, los esporozoítos adquieren forma esférica y se transforman en trofozoítos.

Figura 2. Detalle de la invasión del esporozoíto en la célula hospedadora.

Tomada de Huang *et al.* 2004



Éstos se reproducen asexualmente por merogonia (división de los núcleos de los trofozoítos) dando lugar a la formación de merontes tipo I, con ocho merozoítos en su interior que son liberados a la luz intestinal y, de nuevo, invaden otras células epiteliales repitiéndose el ciclo y generando nuevos merontes tipo I o merontes tipo II, con cuatro merozoítos en su interior. Éstos últimos son los responsables de las formas sexuales.

La reproducción sexual se da por gametogonia.

Algunos merozoítos tipo II entran en la célula y forman un macrogameto; otros, sufren fisión múltiple formando 16 microgametos no flagelados. Los microgametos penetran en el macrogameto dando lugar a un cigoto. El cigoto se reproduce asexualmente dando lugar a un ooquiste con cuatro esporozoítos en su interior. Los ooquistes se liberan por las heces.

Los ooquistes pueden ser de pared gruesa (la mayoría) o de pared fina, con membranas frágiles, de tal manera que pueden desenquistarse precozmente en el interior del intestino dando lugar a un nuevo ciclo.

### c. TAXONOMÍA

La taxonomía es importante para comprender la evolución, biología, patogénesis, recursos y transmisión de patógenos así como para enfocar los esfuerzos de identificación de dianas para el diagnóstico y tratamiento (Chalmers *et al.* 2013).

El género *Cryptosporidium* se clasifica en el phylum Apicomplexa (protozoo dotado de complejo apical), clase Sporozoa (con reproducción sexual y asexual y formación de ooquistes), subclase Coccidiasina (ciclo vital con merogonia, gametogonia y esporogonia), orden Eucoccidiorida (con esquizogonia), suborden Eimeriorina (macrogametogonia y microgametogonia independientes), familia Cryptosporidiidae (cuatro esporozoítos desnudos en el ooquiste) (Levine *et al.* 1985).

Clasificación	Nombre	Características biológicas
Imperio	eucariota	Células cuyo núcleo contiene la mayor parte de DNA envuelto en doble membrana y casi todas poseen mitocondrias.
Reino	Protozoo Goldfuss 1818	Predominantemente unicelular; muchas de ellas contienen mitocondrias, aparato de Golgi y peroxisomas.
Phylum	Apicomplexa Levine 1970	Organismos unicelulares caracterizados por poseer un complejo apical compuesto por conoide, anillo polar, rhoptrias, micronemas y microporos.
Clase	Coccidia Leuckart, 1879	Ooquistes generalmente contienen esporozoitos infectantes. Reproducción sexual y asexual.
Orden	Eucoccidiorida Leger and Duboscq 1910	Merogonia: infectan vertebrados e invertebrados
Familia	Cryptosporidiidae Leger 1922	Desarrollo intracelular y extracitoplasmático con un organelo alimenticio; ciclo homoxeno
Género	<i>Cryptosporidium</i> Tyzzer 1910	
Especies	<i>parvum, hominis, muris, ubiquitum, etc</i>	

Tabla 1. Taxonomía de *Cryptosporidium*. Tomada de Levine et al. 1985.

Como ya se ha comentado anteriormente, fue en 1910 cuando Tyzzer publicó una descripción más detallada estableciendo el género *Cryptosporidium* (Tyzzer 1907) y la especie *C. muris* (Tyzzer et al. 1910). En 1912 detecta en el intestino delgado del ratón un segundo miembro del género. A esta nueva especie le asigna el nombre de *C. parvum* (Tyzzer et al. 1912).

Tradicionalmente, la diarrea por *Cryptosporidium* en humanos se asociaba a *C. parvum* como único agente etiológico. Las variantes de *C. parvum* primero fueron clasificadas fenotípicamente como tipo H o humano y tipo C o de “ganado” (cattle). Posteriormente, gracias a los estudios genómicos, se dividieron en genotipo 1, al que

luego se asignó la categoría de especie *C. hominis*, y genotipo 2, con el tiempo, *C. parvum* propiamente dicho (Chalmers *et al.* 2009).

Actualmente son 26 las especies de *Cryptosporidium* conocidas (con amplia variedad hospedadores vertebrados), siendo para ocho de ellas el ser humano el principal hospedador. De éstas, *C. parvum* y *C. hominis* son los responsables de más del 90% de casos en humanos. A pesar de ello, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. suis*, *C. muris*, *C. andersoni*, *C. ubiquitum*, así como los genotipos de *C. parvum* de ciervo, conejo, mono y caballo han sido reconocidos como agentes etiológicos tanto de casos esporádicos como epidémicos de cryptosporidiosis en humanos (Tosini *et al.* 2010, Cieloszyk *et al.* 2012).

Un ejemplo de ello es *C. meleagridis*, originariamente descrito en pavos, y que en los últimos años se está convirtiendo en un patógeno emergente en humanos, ya que es el responsable del 1% de las infecciones por *Cryptosporidium* en Inglaterra y de casi el 10% en Perú donde su prevalencia supera la de *C. parvum* (Tosini *et al.* 2010).

#### **d. SINTOMATOLOGÍA**

La cryptosporidiosis en humanos se caracteriza normalmente por síntomas gastrointestinales agudos de diarrea acuosa acompañada de dolores cólicos abdominales, vómitos, febrícula y pérdida de apetito. Estos síntomas indican que el patógeno principalmente afecta al intestino delgado, causando malabsorción e inflamación. El periodo de incubación (3-12, usualmente 5-7 días) es dosis dependiente.

La severidad varía en dependencia del estado de salud del paciente. En inmunocompetentes, la cryptosporidiosis es un proceso autolimitado, los síntomas varían en severidad y la duración puede ser hasta de un mes en el cual en un tercio de casos se producen recaídas (Chalmers *et al.* 2013).

En niños malnutridos e inmunocomprometidos, la infección es particularmente seria ya que actualmente es intratable; causando gran morbilidad e incluso mortalidad en los pacientes con inmunodeficiencia severa (Gómez-Couseo 2006, Xiao *et al.* 2004).

Los que presentan más riesgos son aquellos con inmunodeficiencia de células T primarias o secundarias, la infección por VIH intratable, linfoma y leucemia (especialmente en niños).

En este grupo de pacientes, las complicaciones incluyen infección pancreato-biliar que conduce a colangitis esclerosante y cirrosis hepática, y cryptosporidiosis respiratoria. La detección precoz de la carga en pacientes de alto riesgo podría ayudar a limitar las secuelas (Chalmers *et al.* 2013).

#### **e. DIAGNÓSTICO**

##### **i. Biopsia y muestra de heces**

Los primeros diagnósticos se realizaban por biopsia de asas de intestino delgado y grueso y su posterior observación al microscopio, sin embargo, la biopsia tisular es un método invasivo que además puede no proporcionar muestra suficiente

para recuperar o identificar el microorganismo. Por ello, se comenzaron a buscar nuevos métodos de diagnóstico.

En 1980, se comienza a publicar el hallazgo de ooquistes en heces (Tzipori *et al.* 1980), con la ventaja de que el estudio de muestras de heces es un método no invasivo para el paciente y sobre todo, hay una mejor recuperación del microorganismo para su estudio.

No obstante, la eliminación de ooquistes puede ser intermitente o de muy baja intensidad en el caso de las infecciones subclínicas; por lo que para conseguir una sensibilidad adecuada, se recomienda examinar tres muestras de heces en pacientes inmunocompetentes y dos en pacientes VIH +, tomadas en días alternos (Clavel *et al.* 1995).

Las heces pueden recogerse con o sin conservantes (formalina al 10%) y los ooquistes permanecen en buenas condiciones durante meses o incluso años. Para la extracción de los mismos se suelen aplicar técnicas de concentración, bien por flotación (en solución de sacarosa o de sulfato de zinc) o por separación en fase orgánica y sedimentación (formol-acetato de etilo). Por otro lado, el pequeño tamaño de los ooquistes y su similitud con ciertas levaduras que pueden estar presentes en las heces, hace prácticamente imprescindible el empleo de métodos diferenciales o específicos de tinción y cierta experiencia del observador.

El método más utilizado de diagnóstico de laboratorio (Kinyoun acid-fast staining) supone la tinción con Ziehl-Neelsen modificado o con auramina-fenol, métodos bien acepados por el bajo coste de los reactivos, pero en contraposición se requieren una buena muestra y buenas habilidades visuales del microscopista (Checkley W. *et al.* 2015).

#### ii. Inmunoanálisis: inmunofluorescencia, enzimoanálisis e inmunocromatografía.

En aquellos pacientes sintomáticos, con gran número de ooquistes en las heces, muchos son los procedimientos que pueden emplearse para confirmar el diagnóstico. Paradójicamente, la infección por *Cryptosporidium* suele autolimitarse en los pacientes inmunocompetentes, disminuyendo considerablemente la cantidad de ooquistes en las heces. Debido a ello, se han desarrollado nuevas técnicas diagnósticas: la microscopía de inmunofluorescencia y los enzimoanálisis.

La microscopía de inmunofluorescencia emplea preparados comerciales de anticuerpos dirigidos contra antígenos de la pared del ooquiste marcado con isotiocianato de fluoresceína. Esta técnica aporta una mayor sensibilidad y especificidad en comparación con las técnicas de tinción acidorresistentes, siendo muy útil en aquellas muestras con escasa concentración de ooquistes. El mayor coste de las determinaciones y la necesidad de un microscopio específico para la observación de muestras fluorescentes son algunas de sus desventajas (Chalmers *et al.* 2009).

Los inmunoanálisis aportan la sensibilidad, carente en los anteriores, para confirmar la infección en los pacientes con un número bajo de patógenos. Este método

se basa en la detección de antígenos específicos de *Cryptosporidium*, empleando anticuerpos específicos que los detectan y los inmovilizan. A pesar de ello, su principal ventaja es que se prescinde del examen microscópico. El enzimoimmunoanálisis y la inmunocromatografía son algunas de las técnicas empleadas. Aunque se trate de técnicas muy empleadas en las últimas décadas, carecen de capacidad para discernir ooquistes de diferentes especies (Chalmers et al., 2009). Se han desarrollado kits para detección de varios patógenos al mismo tiempo, que buscan conseguir un mínimo coste de las determinaciones de rutina, aunque tienen como inconveniente que incluyen un número muy limitado de patógenos.

Con el tiempo se han ido desarrollando nuevos métodos. Así, en el 94 comenzó a emplearse la hemaglutinación (RPH), empleando anticuerpos monoclonales (Mab; Mab-C1) frente a antígenos de ooquistes de *Cryptosporidium*. Dicho método no aportaba mayor sensibilidad que los anteriores (93,9%) pero sí proporcionaba una mayor especificidad (98,2%). A pesar de ello, dicha técnica fue exitosa fundamentalmente para su empleo en aquellos casos en que las muestras hubieran sido almacenadas antes de ser estudiadas.

### iii. Técnicas moleculares

A pesar de lo útiles que han resultado los diferentes métodos para el diagnóstico de *Cryptosporidium*, ninguna de las técnicas anteriores era capaz de diferenciar especies de dicho patógeno. Debido a ello, se desarrollaron técnicas moleculares que permitieran identificarlas, además de ser capaces de detectar el protozoo en muestras con muy poca carga del parásito e incluso en portadores asintomáticos (Moman Ndao et al. 2009).

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) se basa en la amplificación específica de un fragmento de DNA que presente una gran variedad de polimorfismos propios de cada especie, entre dos segmentos conservados, con el objetivo de facilitar la identificación de la especie.

Muchos loci han sido empleados como diana para la PCR: un fragmento del gen que codifica la subunidad ribosomal pequeña (*18SRNA*) (Xiao et al., 1999; Sturbaum et al., 2001; Nichols et al., 2003), la glicoproteína GP60 de 60 kDa (*gp60*) (Abe et al., 2006), la proteína de pared del ooquiste (COWP, *Cryptosporidium* oocyst wall protein) (Spano et al., 1997; Amar et al., 2004) y la proteína de choque térmico de 70 kDa (*HSP70*) (Morgan et al., 2000).

La amplificación de un fragmento del DNA que codifica para la glicoproteína GP60, ha permitido diferenciar varios subtipos que se agrupan por familias de subtipos del parásito. Se han descrito nueve familias de subtipos de *C. hominis* (Ia- Ig), 14 de *C. parvum* (IIa-III), 7 familias de subtipos de *C. meleagridis* (IIIa- IIIf) y 6 de *C. fayeri* (IVa- IVf) (Goñi et al. 2015).

Dentro de cada familia, los subtipos se diferencian entre ellos por el número de repeticiones de trinucleótidos que codifican serina (TCA, TCG, TCT) (tabla 2) (Sulaiman et al. 2005).

Como inconvenientes, estas técnicas utilizan reactivos y equipamiento más costoso y son complejas de realizar e interpretar.

También, a pesar de la gran utilidad de ésta técnica, su sensibilidad y especificidad están limitadas por varios factores que incluyen la cantidad y calidad del DNA de las preparaciones. En la tabla 3 se refleja una comparativa de las técnicas mencionadas hasta el momento.

ESPECIE	FAMILIA	REPETICIÓN DE NUCLEÓTIDO DOMINANTE
<i>C. hominis</i>	Ia	TCA
	Ib	TCA, TCG, TCT
	Id	TCA, TCG
	Ie	TCA, TCG, TCT
	If	TCA, TCG
	Ig	TCA
<i>C. parvum</i>	IIa	TCA, TCG
	IIb	TCA
	IIc	TCA, TCG
	IId	TCA, TCG
	IIe	TCA, TCG
	IIf	TCA
	IIg	TCA
	IIh	TCA, TCG
	IIi	TCA
	IIk	TCA
	III	TCA

TABLA 2. Principales familias de subtipos GP60 y secuencias representativas (Xiao *et al.* 2010).

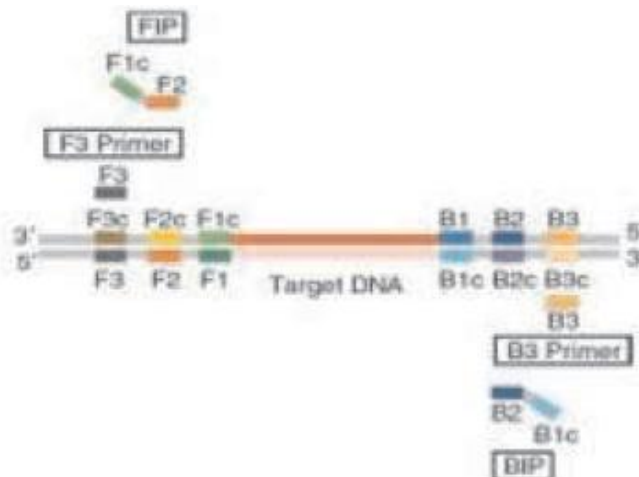
	Ventajas	Desventajas
Microscopía	Poca tecnología necesaria Ampliamente disponible	Sensibilidad baja (70-80%), requiere tinciones especiales y habilidades técnicas
Detección de antígenos	Buena sensibilidad Disponibilidad de kits comerciales	Costoso para países con pocos recursos
Amplificación de ácidos nucleicos	Sensibilidad excelente Puede determinar especie y subtipo y cuantificarlas	Elevado coste del instrumental Requiere habilidades técnicas de laboratorio
Serología	Útiles para propósitos de supervivencia y discriminación entre infección pasada, reciente o reinfección	Solo se emplea para la investigación en el laboratorio

Tabla 3. Métodos de diagnóstico de *Cryptosporidium*. Tomada de Checkley W. (2015).

iv. LAMP-PCR ( *María Isabel Arroyo et al. 2008*)

La técnica LAMP-PCR (loop-mediated isothermal amplification of DNA) está actualmente en desarrollo por su gran especificidad y sensibilidad, y por su menor sensibilidad a los contaminantes externos.

El método LAMP está basado en el principio de síntesis de ADN por desplazamiento de cadena, el cual es llevado a cabo por una polimerasa con alta actividad de desplazamiento de cadena, y un sistema de dos cebadores internos (FIP y BIP) y dos cebadores externos (F3 y B3) para reconocer un total de seis secuencias distintas en el ADN blanco.



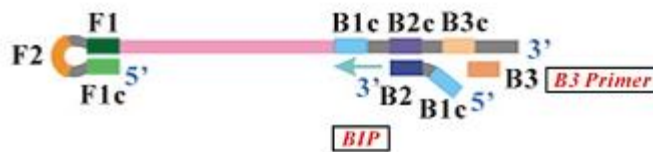


La muestra de ADN con las secuencias diana y los cebadores se desnatura con calor y se enfría inmediatamente después en hielo. La reacción LAMP se inicia con la adición de la ADN Polimerasa *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*). Se lleva a 65° C durante una hora.

El cebador interno FIP se une a F2c en el ADN blanco y comienza la síntesis de la hebra complementaria. Posteriormente, F3 se une a F3c e inicia la síntesis de ADN por desplazamiento de la hebra.



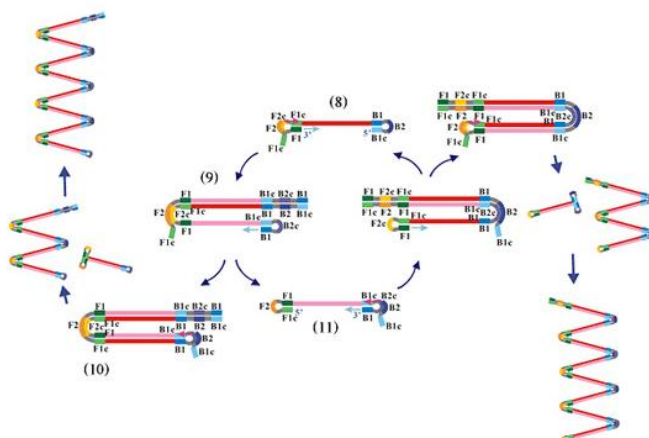
La cadena desplazada y por tanto liberada, forma un bucle en uno de sus extremos. Dicha cadena, sirve de molde para la síntesis de ADN por BIP y la síntesis por desplazamiento a partir de B3.



El resultado es la formación de ADN en doble asa. Se convierte en una forma de bucle. Servirá de inicio para los ciclos de LAMP.



Figura 1. RESUMEN DE LAMP-PCR



### Procedimiento:

Tras la extracción del ADN y amplificación del ácido nucleico se procede a su detección por visión directa o con turbidímetro en tiempo real.

La detección visual por turbidez es debida al pirofosfato de magnesio, un subproducto que se produce en proporción directa con la cantidad de productos amplificados.

Para la detección visual por fluorescencia el reactivo empleado es calceína con iones de  $Mg^{++}$ . Los iones pirofosfato producidos en la reacción se unirán con el  $Mg^{++}$  liberando la calceína que es la que posee fluorescencia. Si se ilumina con una lámpara UV se ve aumento de la fluorescencia.

### **f. TRATAMIENTO**

Hasta el momento no se ha establecido ningún tratamiento específico para tratar la cryptosporidiosis con plena eficacia.

Al ser un proceso autolimitado en pacientes inmunocompetentes, la única intervención terapéutica que se lleva a cabo es el tratamiento sintomático hasta que cesa el cuadro (unas 3 semanas). Por ejemplo, se emplean inhibidores de la motilidad intestinal que mejoran la absorción al aumentar el tiempo de permanencia de los nutrientes en el tracto gastrointestinal, así como medidas de soporte hidroelectrolítico en el caso de importantes pérdidas de líquidos por las heces (Nousbaum et al. 1991, Franignan y Soave 1993).

Son muchos los fármacos que se han estudiado y probado como posibles tratamientos sin obtener los resultados esperados. Algunos de estos son antibióticos como la eritromicina, espiramicina, azitromicina o claritromicina.

La paromomicina también se ha empleado en el tratamiento de la cryptosporidiosis y hasta el momento es uno de los fármacos con mejores resultados. Es un aminoglucósido con escasa absorción digestiva que no elimina la infección pero disminuye su intensidad y restablece la morfología y función intestinal (Goodgame 1996). Es menos efectivo cuanto más intensa es la diarrea.

El único fármaco aprobado por la FDA como tratamiento de la cryptosporidiosis es la nitazoxanida, con evidentes efectos beneficiosos en niños y adultos sin VIH.

En pacientes inmunocomprometidos (VIH +) con cryptosporidiosis, el tratamiento de elección son los fármacos antirretrovirales pudiéndose asociar nitazoxanida o paromomicina.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es la comparación de los métodos de diagnóstico para *Cryptosporidium* spp. en muestras de heces, que se encuentran más disponibles en la actualidad para su posible utilización en la rutina de un laboratorio de Parasitología de un Hospital o centro de análisis clínicos.

Este objetivo principal se traduce en los siguientes objetivos concretos:

1. Determinar la sensibilidad y especificidad de los siguientes métodos diagnósticos: microscopia, inmunocromatografía, PCR para los genes *SSU* y *gp60*, y LAMP PCR.
2. Comparar los métodos anteriormente citados, considerando la microscopia como técnica "gold standard".
3. Valorar la aplicabilidad de las técnicas anteriormente citadas en la rutina clínica de un Laboratorio de Parasitología teniendo en cuenta costes y utilidad de la misma.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### a. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS

Se han analizado un total de 74 muestras, procedentes del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza y del Servicio de Microbiología Clínica del Complejo Asistencial Universitario de León-Sacyl, con la siguiente distribución:

- 23 muestras previamente diagnosticadas como positivas para *Cryptosporidium* spp.
- 32 muestras previamente diagnosticadas como positivas para *Giardia duodenalis*.
- 19 muestras diagnosticadas como negativas para tanto para *Cryptosporidium* como para *Giardia duodenalis*.

Dichas muestras han sido aisladas durante los años 2007 a 2015 y mantenidas en refrigeración a 4°C hasta su uso.

#### b. CONCENTRACIÓN DE MUESTRAS

Una parte de las muestras fue añadida a un tubo de formalina-ácido acético (REAL SAF) siguiendo las instrucciones del fabricante. La suspensión se agitó vigorosamente con vórtex, dejándola posteriormente en reposo. Al cabo de media hora fueron filtradas y se les añadió acetato de etilo para emulsionar la grasa, agitando de nuevo vigorosamente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 500 x g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se conservó el sedimento para su análisis. Para finalizar, se tomó una gota del sedimento resultante, se extendió en un portaobjetos y se dejó secar para su posterior tinción.

#### c. PREPARACIÓN DE OOQUISTES PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Para la detección de ooquistes se empleó la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen modificada:

- a. Se tomó una gota de muestra del sedimento anteriormente obtenido y se colocó en un portaobjetos describiendo un círculo no muy grande y con cuidado de que quede una capa fina.
- b. Se dejó secar
- c. Se cubrió con metanol para fijarla y se dejó secar completamente (aproximadamente 10 minutos).
- d. Se puso un trozo de papel encima de cada portaobjetos con la muestra y se empapó con fucsina fenicada, dejándola actuar durante 20 minutos.
- e. Se retiró el papel, se lava el portaobjetos con agua y se decoloró con ácido sulfúrico (1 ó 2 minutos).

- f. Se volvió a lavar con agua y se cubrió con azul de metileno; tras un minuto, se lavó y se dejó secar colocando el portaobjetos verticalmente.

#### d. MICROSCOPIA

Las muestras teñidas se observaron al microscopio óptico y bajo luz verde (546nm) para la detección de ooquistes, que aparecen de color rojo debido a la fluorescencia de la fucsina utilizada para la tinción:

- a. En microscopía óptica los ooquistes se ven como estructuras redondeadas con doble membrana y teñidos de rojo por la fucsina.
- b. Por fluorescencia se pueden ver ooquistes que no se habían teñido o que se habían teñido parcialmente, y que por tanto no habían sido detectados por microscopía óptica.

#### e. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *Cryptosporidium* spp.

La extracción de ADN se llevó a cabo para todas las muestras objeto de estudio desde la muestra fresca.

Para la extracción de ADN se utilizó el kit de extracción ADN IBIAN® DNA Stool Kit o el NORGEN BIOTEC CORP DNA Isolation Kit. El protocolo de la extracción de ambos Kit se basa en lo siguiente:

- Para la extracción se emplearon unos 200-400 mg de muestra fresca. A la muestra se añadió 1,2 ml o 1,1 ml de la solución de lisis (Lysis Buffer), dependiendo del kit, y se mezcló con vórtex para que se rompieran los ooquistes dejando el ADN libre.
- La adición de 200 µl de solución bloqueante de pH 5 (Binding Buffer) neutraliza el pH muy básico en que se estaba trabajando en las fases previas. A continuación, la mezcla se depositó en una columna que dispone de una membrana en la que el ADN queda fijado.
- Para eliminar los restos celulares y obtener el ADN limpio en la membrana de la columna, se procedió al lavado con las soluciones Wash Buffer I y Wash Buffer II.
- En el paso final se utilizaron 100 µL de buffer de elución (Elution Buffer) para eluir el ADN. De este modo, puede ser almacenado hasta su utilización a -20°C durante periodos de tiempo más prolongados.

#### f. PURIFICACIÓN DE OOQUISTES MEDIANE GRADIENTE DE SACAROSA

- Diluir las muestras 1:12 (vol/vol), en agua destilada (filtrar si se considera oportuno).
- En hielo: en un tubo Falcón de 50 ml se introducen 10 ml de sacarosa 1 M y sobre esta se ponen 5 ml de la muestra diluida
- Centrifugar a 450 xg durante 5 minutos.

- Recuperar el sobrenadante y volverlo a suspender en 45-50 ml de agua destilada.
- Centrifugar a 450 xg durante 5 minutos.
- En hielo: resuspender el sedimento en 2,5 ml de agua destilada.
- Depositar sobre 10 ml de sacarosa 0,5 M.
- Centrifugar a 450 xg durante 5 minutos.
- Tomar con una pipeta Pasteur 1-1,5 ml del fondo y colocarlo en un tubo eppendorf.
- Centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos.
- Lavar con suero fisiológico o agua destilada estéril dos veces (resuspender el pellet en agua, centrifugar a 6000 rpm 10 min).

g. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA - RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISMS (PCR – RFLP)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método enzimático que permite amplificar *in vitro*, de forma exponencial, un fragmento específico de ADN que está localizado entre dos regiones de secuencia conocida, pudiéndose obtener numerosas copias del mismo.

Para llevar a cabo la reacción de PCR se necesita: ADN diana de doble cadena, dos oligonucleótidos o iniciadores específicos para el fragmento que se quiere amplificar, la enzima de polimerización (*Taq* polimerasa), la mezcla de los cuatro deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y un medio tamponado, con  $Mg^{2+}$  como ión fundamental, que proporcione las condiciones adecuadas de pH y fuerza iónica.

Para todas las muestras se procedió a realizar la técnica de PCR anidada que amplifica el gen de la subunidad 18 S del rRNA (SSU rRNA). En la primera PCR se utilizaron los cebadores:

Ssu1 (5´-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3´)

Ssu2 (5´- CCCTAATCCTTCGAAACAGGA-3´)

Y en la segunda PCR:

Ssu3 (5´-GGAAGGGTTGTATTTATTAAGATAAAG-3´)

Ssu4 (5´-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3´)

Se emplearon las mezclas de reacción que figuran en la tabla 4:

COMPONENTES DE LA MEZCLA	PCR1 ( $\mu$ l)	PCR2 ( $\mu$ l)
Tampón de reacción	2,5	5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1	1,5
SSU 1 (10 $\mu$ M)	2,5	-
SSU2 (10 $\mu$ M)	2,5	-
SSU3 (10 $\mu$ M)	-	5
SSU4 (10 $\mu$ M)	-	5
DNTPs (25Mm)	0,25	0,5
Taq DNA polimerasa	0,3	0,3
ADN/producto de 1ªPCR	5	3
H <sub>2</sub> O	11,25	30
VOLUMEN FINAL	25	50

Tabla 4. Mezcla para la reacción de PCR para el gen *SSU*

El proceso se lleva a cabo cíclicamente en un termociclador (MiniCycler™ MJ Research, Inc. USA y Applied Biosystems 2720 Thermal cycler), estando cada ciclo dividido temporalmente en tres fases térmicas:

- a. Desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos.
- b. Amplificación mediante 35 ciclos de:
  - 45 segundos a 94°C
  - 45 segundos a 55°C
  - 1 minuto a 72°C
- c. Extensión final a 72°C durante 7 minutos.



Figura 3. Termocicladores

Las muestras positivas de la segunda PCR fueron sometidas a digestión con las endonucleasas *SspI* y *VspI* con el objetivo de obtener un patrón de bandas que permita diferenciar especies de *Cryptosporidium*.

La mezcla empleada fue la siguiente:

Buffer	2 µl
Enzima	1 µl
ADN (producto de la 2ª PCR)	3 µl
H <sub>2</sub> O	14 µl
Volumen total	20 µl

Además del SSU 18, se ha llevado a cabo el análisis de la secuencia de un fragmento del gen *gp60*, que codifica la glicoproteína GP 60 de 60 KDa de la superficie de los esporozoítos de *Cryptosporidium* cuya función está asociada a la adhesión a la célula huésped, para determinar las familias y subtipos encontrados.

El análisis se llevó a cabo mediante PCR anidada, empleando 2 cebadores diferentes en cada una de ellas.

PCR 1	AL 3531	5' - ATAGTCT CCGCTGTATTC-3'
	AL 3535	5' - GGAAGGAACGATGTATCT-3'
PCR 2	AL 3532	5' - TCCGCTGTATTCTCAGCC-3'
	AL 3534	5' - GCAGAGGAACCAGCATC-3'

La mezcla empleada para ambas reacciones se expone en la tabla 5:

	PCR 1 (µL)	PCR 2 (µL)
H <sub>2</sub> O	14,6	18,6
Buffer	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,5	1,5
dNTPs (25mM)	0,2	0,2
AL3531	0,5	-



AL 3533	0,5	-
AL 3532	-	0,5
LX0029	-	0,5
Taq (5U)	0,2	0,2
ADN	5	1 (producto de PCR 1ª)
VOLUMEN TOTAL	20 (mix)+5 (ADN)= 25	24 (mix)+1(producto 1ª PCR) = 25

Tabla 5. Mezcla para la reacción de PCR-*gp60*

Las dos reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf de 200 µl para PCR en los mismos termocicladores con el siguiente programa:

- a. Desnaturalización inicial a 95º C durante 3 minutos
- b. Amplificación mediante 40 ciclos de:
  - 45 segundos a 95ºC
  - 45 segundos a 52ºC
  - 1 minuto a 72ºC
- c. Extensión final a 72º C durante 10 minutos.

Los productos de las segundas PCRs, tanto de SSU 18 como de *gp60* fueron visualizados mediante electroforesis.

### Detección de los productos de PCR. Electroforesis en geles de agarosa.

Consiste en la separación electroforética del ADN en un gel de agarosa. Se basa en la migración unidireccional de esta molécula a través de una matriz porosa cuando se aplica un campo eléctrico. La electroforesis se lleva a cabo con un tampón de pH 8. A este pH, el ADN tiene una carga negativa y migra desde el polo negativo (cátodo) al polo positivo (ánodo). La movilidad electroforética del ADN depende, sobre todo, de su tamaño y conformación, y se ve poco afectada por la composición de bases o por la secuencia.

La visualización de los fragmentos de ADN se consigue mediante la incorporación al gel de un colorante fluorescente, bromuro de etidio, que se intercala entre las dos cadenas de ADN. Este reactivo revela la presencia de una banda de ADN al ser iluminado con luz ultravioleta de longitud de onda corta

El gel fue preparado con agarosa (Agarosa tipo I estándar PB, Panreac), TBE X 0,5 (Tris 0,045M, ácido bórico 0,045M, EDTA 0,001M, pH 8) y bromuro de etidio 0,5 µg/ml.

La electroforesis se desarrolló a 97-100 V. el marcador utilizado fue DNA del Fago  $\lambda$  (Promega 502  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) digerido con *Pst*I (Advanced Biotechnologies 10 U/ $\mu\text{l}$ ).

El marcador y las muestras fueron cargadas con un tampón con colorante en relación: 5  $\mu\text{l}$ : 2  $\mu\text{l}$ , respectivamente.

La visualización de los fragmentos de ADN se llevó a cabo con un transiluminador Viber Lourmet y la captura de las fotos con un capturador de imágenes de la misma casa comercial.

#### h. ANALISIS DE HECES MEDIANTE INMUNOCROMATOGRAFÍA

De las muestras catalogadas como positivas para *Cryptosporidium* en la técnica de PCR, se llevó a cabo la técnica de inmunocromatografía, un método más sencillo, con el objetivo de comparar sensibilidad y especificidad entre los diferentes métodos diagnósticos.

Se toma una pequeña cantidad de la muestra y se coloca en 1 ml de buffer de disociación. Se mezcla bien en el vórtex y del resultado se toma 125  $\mu\text{l}$  y se deposita en otro tubo de ensayo. Se introduce la tira de test y se espera unos minutos a que la muestra ascienda por capilaridad a través de la tira reactiva. A continuación se leen los resultados: se verá una banda de color azul en todas las tiras ya que corresponde al control positivo, y debajo de la banda azul, si la muestra es positiva para *Cryptosporidium* se dibujará otra banda granate, si es negativa no aparecerán más bandas.

#### i. LAMP PCR

Para llevar a cabo la LAMP-PCR fueron necesarias tres parejas de “primers” o cebadores diferentes, que reconocen diferentes regiones del genoma del parásito.

Se realizaron dos mezclas diferentes, una de ellos con calceína y  $\text{MnCl}_2$  y la otra, sin estos componentes (tabla 6).

	MIX A ( $\mu\text{l}/\text{muestra}$ )	MIX B ( $\mu\text{l}/\text{muestra}$ )
Buffer	4.5	4.5
Betaina (5M)	8	8
dNTPs (25 mM)	3.8	3.8
$\text{MnCl}_2$ (25 Mm)	1	-
Calceina (320 $\mu\text{M}$ )	4	-
$\text{H}_2\text{O}$	3.7	8.7
Volumen final	25	25

Tabla 6: Mix para la realización de LAMP-PCR, sin los primers.

Por otro lado, se prepararon dos mezclas con los primers; una de ellas incluía FIP, BIP, F3, B3, y la otra además de los “primers” anteriores, contenía también LPS y LPF (tabla 7).

	MIX 1 (μL por muestra)	MIX 2 (μL por muestra)
<b>FIP</b>	2	2
<b>BIP</b>	2	2
<b>F3</b>	0.5	0.5
<b>B3</b>	0.5	0.5
<b>LPB</b>	-	2
<b>LPF</b>	-	2
<b>Bsm</b>	1	1
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4.5	0.5

Tabla 7: Mix de los primers para la realización de la LAMP-PCR.

Se ensayó con las cuatro combinaciones posibles (A-1, A-2, B-1, B-2). Se comprobó que con el mix A no se obtenían mejores ni más claros resultados, por tanto se continuó el estudio 2 μl de muestra con ooquistes. Así obtuvimos cuatro diluciones además de la muestra original, que se colocaron en tubos eppendorf. Se les realizó PCR para SSU, *gp 60*, LAMP B-1 y LAMP B-2

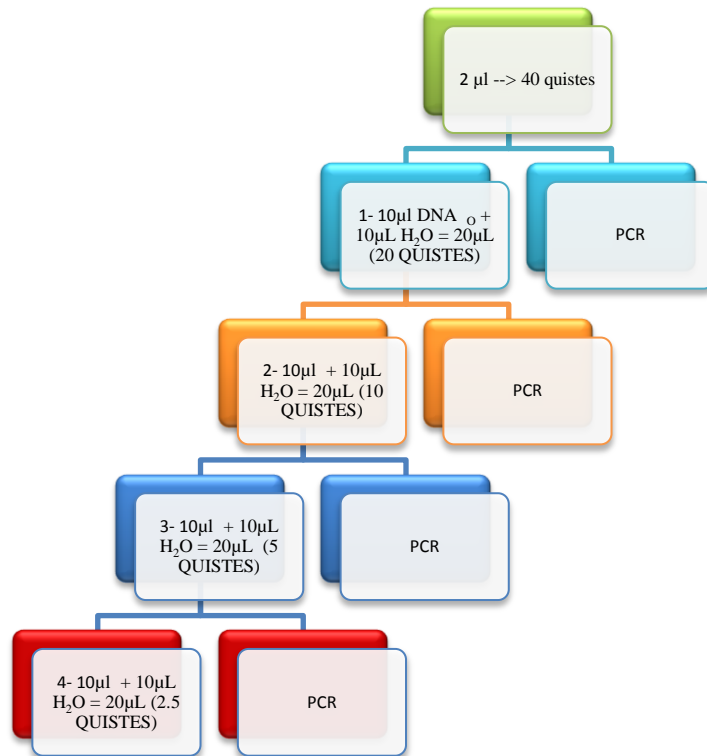


Figura 3: Proceso de dilución de la muestra para la prueba de sensibilidad

#### j. ANALISIS DE RESULTADOS

Para el análisis de resultados se creó una base de datos con el programa SPSS v 22.0 (Licencia Universidad de Zaragoza)

- Se analizaron los resultados aplicando técnicas estadísticas, determinando: VPP, VPN, Sensibilidad y especificidad, y la concordancia entre métodos (%)
- Los estadísticos se calculan de la siguiente manera: Sensibilidad:  $100\% \left[ \frac{a}{a+c} \right]$ ; especificidad:  $100\% \left[ \frac{d}{b+d} \right]$ ; VPP:  $100\% \left[ \frac{a}{a+b} \right]$ ; VPN  $100\% \left[ \frac{d}{c+d} \right]$ , donde **a** corresponde a las muestras positivas, **b** a los falsos positivos, **c** a los falsos negativos y **d** son las muestras negativas.
- Para el análisis de la concordancia empleamos el método de Kappa que determina la independencia de los métodos estudiados entre sí. El índice de Kappa obtenido se interpreta teniendo en cuenta el signo del valor obtenido y su mayor o menor proximidad a la unidad (Tabla 8)

Valores negativos	Concordancia pobre
0- 0,2	Concordancia muy leve
0,2- 0,4	Concordancia leve
0,4- 0,6	Concordancia moderada
0,6- 0,8	Concordancia substancial
0,8- 1	Concordancia casi perfecta

Tabla 8: Interpretación de la concordancia según los valores del índice Kappa

- El método de referencia a partir del cual se comparan el resto de técnicas diagnósticas es la microscopía, independientemente de que además también se comparen todas las técnicas entre sí.

#### **4. RESULTADOS**

Se parte de 74 muestras de heces, 23 de las cuales eran positivas para *Cryptosporidium* por microscopía. Estas muestras constituyen las consideradas como positivas reales. Del resto, 32 eran positivas por microscopía para *Giardia* y las demás negativas para ambas. Las muestras positivas para *Giardia*, se fueron tomadas por contener un parásito intestinal muy frecuente en nuestro medio y que por lo tanto podría interferir en los resultados.

Estos diagnósticos se tomaron como punto de partida y la **microscopía** como técnica “gold estándar” de referencia. Una vez aplicados todos los métodos diagnósticos elegidos para el trabajo, se compararon diferentes estadísticos para valorar la efectividad de los mismos.

Los estadísticos calculados de cada una de las técnicas (inmunocromatografía, PCR-SSU, PCR-GP60, PCR-LAMP) fueron: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Además de ello, se calculó el índice de concordancia (índice Kappa) entre microscopía y el resto de métodos diagnósticos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	S	E	VPP	VPN	Kappa	Error estándar	I.C. 95%	concordancia
Inmunocromatografía	87	98	95,24	94,34	0,871	0,063	0,748- 0,994	Muy buena
SSU	95,7	96,1	91,67	98	0,906	0,053	0,803- 1,010	Muy buena
GP60	65,2	88,2	71,43	84,91	0,548	0,109	0,334- 0,761	Moderada
LAMP	43,5	66,7	37,04	72,34	0,097	0,127	-0,152- 0,346	Pobre

Tabla 9. Comparación de valores con microscopía como “gold standard” microscopía (en %). S= sensibilidad, E= especificidad, VPP= valor predictivo positivo; VPN= valor predictivo negativo, I.C.= intervalo de confianza.

### Inmunocromatografía

Todas las muestras fueron sometidas a inmunocromatografía, una técnica rápida y sencilla de realizar. Al compararla con la microscopía se obtuvo una sensibilidad del 87%, especificidad del 98%, VPP de 95,24% y un VPN de 94,34%, con un índice de concordancia kappa de 0,871 (95% I.C. 0,748-0,994), lo que indica una concordancia muy buena entre ambas técnicas.

En la figura 7 se muestra un ejemplo de inmunocromatografía para *Cryptosporidium*. Se introduce la varilla de inmunocromatografía en el tubo de ensayo con la muestra diluida; la línea de validación garantiza el ascenso de la muestra por capilaridad hasta el final de la varilla y evita falsos negativos.

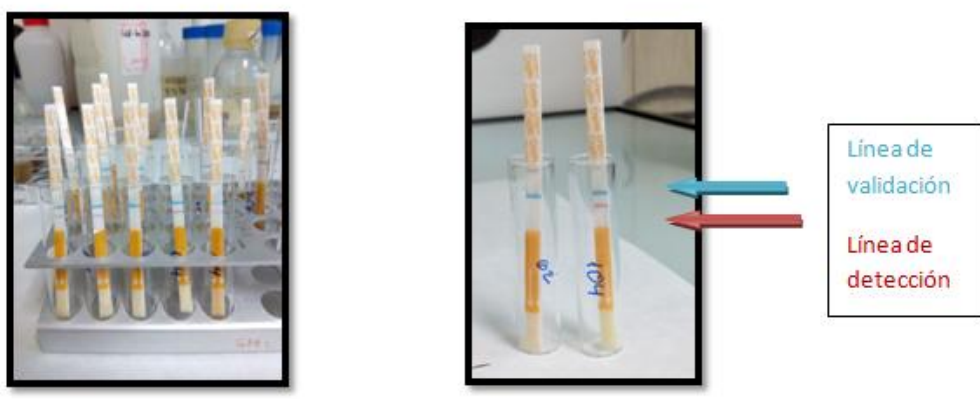


Figura 7. Inmunocromatografía para *Cryptosporidium*.

En la tabla 10 se exponen los valores obtenidos cuando se comparan las demás técnicas con esta, es decir cuando se toma inmunocromatografía como técnica de referencia, y en la tabla 11 la concordancia de inmunocromatografía con las otras técnicas estudiadas.

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Microscopía	87	98	95,24	94,34
SSU	87,5	100	100	94,34
GP60	61,9	84,9	61,9	84,91
LAMP	29,6	72,3	38,1	64,15

Tabla 10. Comparación de inmunocromatografía con las técnicas utilizadas en el estudio (en %). (VPP= valor predictivo positivo, VPN= valor predictivo negativo).

	Kappa	I.C.	Concordancia
Microscopía	0,871	0,748-0,994	Muy buena
SSU	0,904	0,798-1,010	Muy buena
GP60	0,468	0,237-0,699	Moderada
LAMP	0,021	-0,235-0,276	Pobre

Tabla 11. Comparación de concordancia de inmunocomatografía con las pruebas diagnósticas estudiadas. (I.C.= intervalo de confianza)

### PCR-SSU y gp60

Comparando los resultados de la PCR-SSU con microscopia podemos decir que tiene una sensibilidad del 95,7%, especificidad del 96,1%, VPP de 91,67% y un VPN 98%. De lo que se concluye que poseen una concordancia muy buena, de 0,906 (95% I.C. 0,803-1,010).

En contraste con estos resultados tenemos los obtenidos con la PCR-gp60, sensibilidad de 65,2%, especificidad de 88,2%, VPP de 71,43%, VPN de 84,91 %, lo que nos indica una concordancia moderada entre la microscopia y la PCR con gp60.

Resulta interesante comparar las dos PCR clásicas entre sí, dadas las diferencias en los resultados obtenidos (tabla 12).

			GP60		Total
			POSITIVO	NEGATIVO	
SSU	POSITIVO	Count	14	10	24
		% within SSU	58,3%	41,7%	100,0%
	NEGATIVO	Count	7	43	50
		% within SSU	14,0%	86,0%	100,0%
Total		Count	21	53	74
		% within SSU	28,4%	71,6%	100,0%

Tabla 12. Sensibilidad y especificidad de PCR-gp60 en relación con PCR-SSU

Como referencia se tomó PCR-SSU, ya que los resultados obtenidos en relación con la microscopía son mejores. Vemos que la sensibilidad de PCR-gp60 en relación PCR-SSU es del 58,3% y la especificidad del 86%. Los valores predictivos positivo y negativo son 66,67% y 81,13%. De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que la concordancia entre ambas es moderada con un índice kappa de 0,458 (95% I.C. 0,232-0,684).

En las siguientes tablas se recogen la comparativa entre PCR-SSU (tablas 13 y 14) y PCR-gp60 (tablas 15 y 16) con el resto de las técnicas:

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Microscopía	95,7	96,1	91,67	98
inmunocromatografía	100	94,3	87,5	100
GP60	66,7	81,1	58,33	86
LAMP	33,3	68,1	37,5	64

Tabla 13. Comparación PCR-SSU con el resto de técnicas (en %). (VPP= valor predictivo positivo, VPN= valor predictivo negativo).

	Kappa	I.C. 95%	Concordancia
Microscopía	0,906	0,803-1,010	Muy buena
inmunocromatografía	0,904	0,798-1,010	Muy buena
GP60	0,458	0,232-0,684	Moderada
LAMP	0,015	-0,236-0,265	Pobre

Tabla 14. Concordancia entre PCR-SSU y el resto de técnicas. (I.C.= intervalo de confianza).

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Microscopía	65,2	88,2	71,43	84,91
Inmunocromatografía	61,9	84,9	61,9	84,9
SSU	58,3	86	66,67	81,13
LAMP	33,3	74,5	42,86	66,04

Tabla 15. Comparación PCR-GP60 con el resto de técnicas (en %). (VPP= valor predictivo positivo, VPN= valor predictivo negativo).

	Kappa	I.C. 95%	Concordancia
Microscopía	0,548	0,334-0,761	Moderada
Inmunocromatografía	0,468	0,2370,699	Moderada
SSU	0,458	0,232-0,684	Moderada
LAMP	0,082	-0,171-0,335	Pobre

Tabla 16. Concordancia entre PCR-gp60 con el resto de técnicas. (I.C.= intervalo de confianza).

Si comparamos los resultados de la PCR clásica sin tener en cuenta el gen empleado, los resultados mejoran considerablemente alcanzando una sensibilidad del



100 % no solo con respecto a la microscopía, sino también con la inmunocromatografía y con las PCR clásicas realizadas individualmente.

	S	E	VPP	VPN
microscopía	100	84,3	74,19	100
IC	100	81,1	67,42	100
PCR-SSU18	100	86	77,42	100
PCR- <i>gp60</i>	100	58,1	67,42	100

Tabla 17. Comparación de los resultados obtenidos al combinar las PCR clásicas (S= sensibilidad, E= especificidad, VPP= valor predictivo positivo, VPN= valor predictivo negativo, IC= inmunocromatografía)

	Kappa	I.C.	Concordancia
Microscopía	0,770	0,619-0,920	Buena
IC	0,709	0,542-0,877	Buena
PCR-SSU18	0,799	0,658-0,91	Buena
PCR- <i>gp60</i>	0,709	0,542-0,877	Buena

Tabla 18. Concordancia de la PCR clásica (SSU18 y *gp 60*) con microscopía, inmunocromatografía (IC) y las PCR clásicas individualmente. (I.C. =intervalo de confianza)

### LAMP-PCR

Por último las muestras fueron sometidas a una nueva técnica de detección por PCR, la LAMP-PCR, que se ejecuta como una sola PCR, a priori, en menor tiempo. La tabla 17 muestra los resultados obtenidos:

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
Microscopía	43,5	66,7	37,04	72,34
Inmunocromatografía	38,1	64,2	29,63	72,34
SSU	37,5	64	33,33	68,09
GP60	42,9	66	33,33	74,47

Tabla 19. Comparación de LAMP con el resto de técnicas diagnósticas (en %)

	Kappa	I.C.	Concordancia
Microscopía	0,097	-0,152-0,343	POBRE
Inmunocromatografía	0,021	-0,235- 0,276	POBRE
SSU	0,015	-0,236-0,265	POBRE
GP60	0,082	-0,171-0,335	POBRE

Tabla 20. Concordancia de LAMP-PCR con el resto de técnicas. (I.C. = intervalo de confianza).

Dicha PCR se realizó siguiendo los protocolos descritos en la literatura, en un solo paso con 60 minutos de reacción, pasando seguidamente a 120 minutos para aumentar la sensibilidad de la técnica. Igualmente, en ningún caso se consiguió observar turbidez a simple vista, ni fluorescencia cuando se incluyó calceína, ni cuando se añadieron agentes intercalantes por lo que la visualización de resultados tuvo que realizarse necesariamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Diez de las 25 muestras positivas para *Cryptosporidium* resultaron positivas con PCR-LAMP. Algunas de ellas se muestran en las figuras 4 y 5.

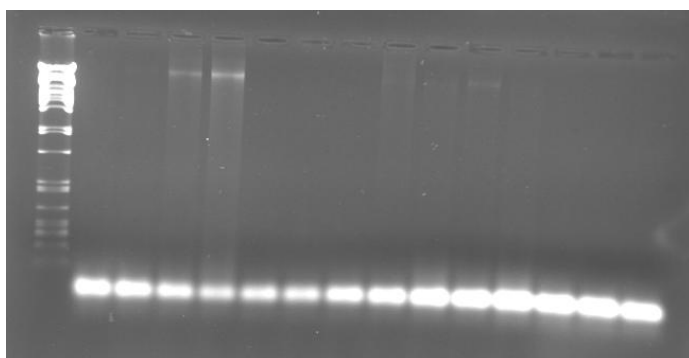


Figura 4. PCR-LAMP, muestras L, **61, 62, 99, 100, 102, 103, 104, 109, 114, 119, 135, 137, 138, 139.**

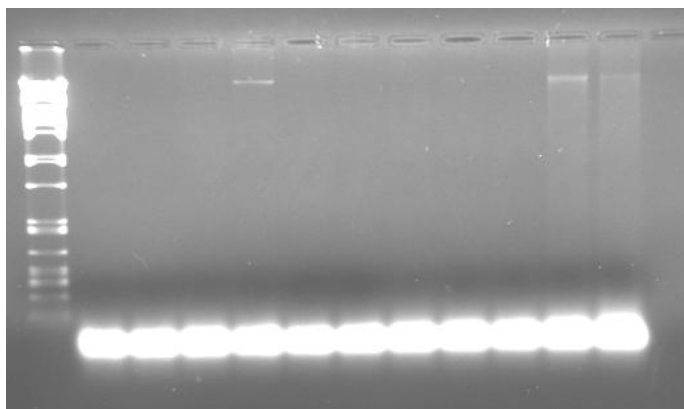


Figura 5. PCR-LAMP, muestras L, 141, 144, 152, **156, 162, 163, 165, 167, 170, 175, 177**

De las 32 muestras negativas para *Cryptosporidium* pero positivas para *Giardia lamblia*, 4 resultaron positivas para *Cryptosporidium* tras la realización de la PCR-LAMP y la electroforesis en el gel de agarosa.

De las 19 muestras negativas para ambos parásitos, 13 fueron positivas para *Cryptosporidium* tras realizar la PCR-LAMP.

Con los precios de mercado que se manejan en la Facultad, el precio por muestra de cada una de las técnicas es:

- La inmunocromatografía cuesta 12 euros por muestra
- La PCR (nested PCR) costaría 40 euros
- Caracterización de la especie 102euros
- la realización de la técnica de microscopía saldría a unos 60 euros la muestra de *Cryptosporidium*.
- LAMP- PCR: 38 euros la muestra si se resuelve por gel de agarosa.

Además, el tiempo necesario para su realización es muy variable entre las diferentes técnicas. Así, por ejemplo la microscopía es una técnica laboriosa que requiere la concentración de la muestra con la posterior tinción de la misma y dejar secar hasta el día siguiente. La técnica propiamente dicha, requiere tiempo indeterminado con el objeto de barrer bien el portaobjetos con la muestra y poder visualizar los ooquistes.

La inmunocromatografía en cambio, es una técnica rápida, pasados unos minutos de introducir la varilla de inmunocromatografía en el tubo con la muestra, se pueden leer los resultados.

Las PCR clásicas son laboriosas y requieren la inversión de tiempo en la extracción del DNA y la preparación de las muestras, el tiempo de la reacción en los termocicladores y la posterior técnica del gel de agarosa. La PCR propiamente dicha tarda unas 3 horas en el termociclador.

La LAMP PCR, en teoría, es más rápida que las PCR- clásicas, y en dos horas la PCR sería sacada del termociclador e interpretada directamente sin la inversión de tiempo en correr las muestras en gel de agarosa.

## **5. DISCUSIÓN**

El método de referencia tomado es la microscopía. Este método es el “gold estándar” en el diagnóstico de *Cryptosporidium* por la sencillez de su realización y su bajo coste a pesar de requerir una buena muestra y habilidades técnicas en el laboratorio. Con la introducción del nuevo microscopio con luz verde se ha mejorado considerablemente la capacidad de detección del parásito en las muestras de heces, La sensibilidad de dicha técnica alcanza el 70% de las muestras (Checkley et al. 2015).

En este trabajo se parte de 23 muestras positivas para *Cryptosporidium* por microscopía, y 51 muestras negativas para este parásito. También se seleccionaron 32 muestras positivas para *Giardia* por ser un patógeno muy frecuente en nuestro medio, con el mismo mecanismo de transmisión que *Cryptosporidium* por lo que aparecen con

frecuencia de forma simultánea, dando lugar a co-infecciones y por lo tanto, podría interferir en los resultados.

### **Inmunocromatografía**

La sensibilidad de esta técnica comparada con la de referencia es del 87%, lo que explica las 3 muestras obtenidas con resultados negativos para esta técnica, pero que eran muestras positivas en la microscopía. Con una especificidad del 98%, es una buena técnica para detectar pacientes asintomáticos. La tasa de falsos positivos es muy baja, en torno al 5% (100%-VPN), lo que podría justificar la muestra positiva para inmunocromatografía pero negativa en microscopía; aunque este hecho podría deberse también a que la microscopía no es infalible, ya que el caso en el que el parásito se encuentre en bajo número en la muestra, puede no ser detectado. Además, en el proceso de preparación de las muestras para su observación para microscopía puede haber errores que alteren los resultados; se pueden perder grandes cantidades del espécimen en la purificación de la muestra durante la extracción de ooquistes, en la tinción de las muestras ya sea por fallo en los reactivos, por baja calidad o cantidad de la muestra a estudio, o incluso en la observación de los ooquistes al microscopio ya que se requieren ciertas habilidades por parte del observador para distinguir por ejemplo los ooquistes del *Cryptosporidium* con ciertas levaduras u otros artefactos que pueden encontrarse en las heces (Checkley W. et al. 2015, Bouzid et al. 2013).

En conclusión con respecto a esta técnica, tiene una muy buena correlación con la microscopía (Kappa= 0,871; I.C. 95%), unos valores predictivos y especificidad muy buenos, pero como era de esperar, la sensibilidad de estos métodos es variable, entre el 70-100%, en nuestro caso es del 87%, y por tanto requeriría la confirmación de los resultados positivos (William Checkley et al 2015).

Estudios recientes, utilizan esta técnica para el cribado, como reciente estudio de un brote ocurrido en una guardería de Granada, en que se utilizan inmunocromatografía y microscopía con una buena correlación entre ambas técnicas, ya que de 82 muestras estudiadas, las siete que fueron positivas para *Cryptosporidium* por microscopía también lo fueron por inmunocromatografía (Goñi et al., 2015). No obstante, en un estudio anterior de valoración de la misma técnica utilizada en este estudio, se obtuvo una sensibilidad del 72.7% y un PPV también del 72.7%, por lo que se recomendaba su utilización para confirmación de diagnóstico o para cribados, dado que los resultados obtenidos invitaban a la confirmación de los casos positivos encontrados (Goñi et al, 2012). Esto indica que se trata de una técnica en continua evaluación y mejora. De hecho, uno de los avances es la posibilidad de la detección de múltiples parásitos con una sola inmunocromatografía, con el ahorro de costes y disminución de tiempo que ello conlleva.

Al ser una técnica barata (el coste aproximado de la realización de inmunocromatografía en una muestra sería de 12 euros mientras que el coste de la microscopía sería de unos 60 euros), que no requiere grandes destrezas en el laboratorio y rápida de realizar. Como inconvenientes en el diagnóstico de rutina hay

que señalar que el que se puedan analizar un máximo de 3 parásitos supone una limitación, ya que el examen parasitológico de heces requiere descartar muchas otras formas parasitarias que se puedan encontrar presentes. Por otra parte, es una técnica de reciente utilización que necesita probar su eficacia en múltiples trabajos, en comparación con microscopia y las técnicas de Biología Molecular, para eliminar también las barreras de la falta de experiencia. Sin embargo, como se ha comentado con anterioridad, supone una buena herramienta para descartar *Cryptosporidium* cuando hay dudas con otras técnicas y para trabajos en masa, con gran número de participantes, en que se postula como una técnica fiable para el screening.

En el caso de *Cryptosporidium* empleamos varillas de inmunocromatografía que únicamente detectaban dicho parásito.

### **PCR-SSU 18 y PCR gp60**

Como cabía esperar, la PCR con la subunidad 18SSU presenta una gran sensibilidad y especificidad, 95,7% y 96,1% respectivamente. No ocurre lo mismo con la PCR-gp60; en relación a la microscopía presenta una sensibilidad del 65,2% y especificidad del 88,2%. La correlación entre ambas es moderada (índice Kappa: 0,548, I.C. 95%).

Ocho muestras de las 23 positivas iniciales, obtuvieron resultados negativos en la PCR-gp 60 y solo 1 de las positivas dio resultado negativo en la PCR -18SSU. Esto se explica por la menor sensibilidad de la primera con respecto a la PCR -gp 60.

De las muestras negativas, PCR-18S detectó dos resultados positivos para *Cryptosporidium* y con PCR gp60 se detectaron 6 positivas. Las diferencias en los resultados explican la moderada correlación entre estas dos técnicas a pesar de tratarse ambas de técnicas moleculares. (Kappa= 0,458 ; 95% I.C. 0,232-0,684).

La combinación de las dos PCR clásicas nos daría el conjunto de muestras positivas con una alta sensibilidad ya que detectarían no solo las positivas al microscopio sino que además detectaría otras que en microscopía habían resultado negativas para *Cryptosporidium*. Por el contrario, esto supondría grandes costes además de la inversión de mucho tiempo en su realización.

Llama la atención los resultados obtenidos al comparar la PCR 18S con los obtenidos con inmunocromatografía (Ver tabla 8)

La sensibilidad y el valor predictivo negativo es del 100%, lo que quiere decir que ambas tienen la misma capacidad de detectar las muestras positivas; y sus resultados negativos se corresponden con muestras libres de *Cryptosporidium* con la misma seguridad para ambas pruebas.

Hay que señalar que en este trabajo, de forma preconcebida, no se ha llevado a cabo ningún pretratamiento de las muestras y que para mejorar los resultados de estas técnicas se requiere un proceso de purificación previo con el fin de eliminar los contaminantes de las mismas, por lo que muy probablemente este será el motivo de haber obtenido menor sensibilidad de la esperada para estas técnicas (Chalmers 2013, Mohammed et al 2008).

Ambas son técnicas caras ya que los termocicladores y resto de equipamiento necesario suponen un desembolso previo que no todos los laboratorios se pueden permitir. Además, el material requerido para la preparación y análisis de las muestras suponen un gasto elevado. El coste por nested PCR es de 40 euros. Cuando se realizan estudios epidemiológicos, la determinación de especie está valorada en 102 euros. El tiempo requerido también es importante. Primero se ha de extraer el DNA, después se realizan dos PCR consecutivas y por último se lleva a cabo la electroforesis en gel de agarosa. En algunos casos se lleva a cabo la digestión de la muestra con el fin de obtener un patrón en bandas y poder determinar la especie. Todo ello supone, en el mejor de los casos, dos días de trabajo, con lo que el informe de resultados se realizaría en un tercer día.

Por todo ello, no son técnicas aplicables en la rutina de un laboratorio clínico, ya que no pueden competir con la rapidez y economía de las dos técnicas anteriores.

A pesar de ello, son técnicas con una excelente sensibilidad y cada vez están siendo más usadas en estudios de laboratorio (Checkley et al 2015). Su principal utilidad son los estudios de epidemiología en los que las muestras se purifican y se liberan de inhibidores que puedan interferir en los resultados, y en los que no tiene tanta importancia la mayor inversión de tiempo. En ellos se detectan diferentes especies (con el empleo de la subunidad 18S) y subtipos (con *gp 60*) con lo que se pueden identificar brotes, mecanismos de transmisión, relacionar hospedadores con manifestaciones clínicas y así, ampliar y mejorar los conocimientos sobre *Cryptosporidium*. (Mohammed et al 2008, Checkley W. et al 2015, Tavares RG et al. 2011). En el laboratorio clínico tienen una gran utilidad para la caracterización en muestras con poco número de parásitos, no detectables por visión microscópica, pero con sintomatología continuada en el paciente. Estas técnicas se están aplicando en RT-PCR en laboratorios de análisis clínicos (laboratorios privados o centros de referencia) tanto para medicina humana como veterinaria.

## **LAMP-PCR**

Esta técnica es de reciente aparición y hasta la fecha son pocos los estudios y trabajos que hablan de ella, sobre todo en lo que respecta a la aplicación de la misma en la práctica diaria de un laboratorio.

A priori, cabría esperar una técnica con gran sensibilidad y especificidad debido al empleo de 6 primers con secuencias muy concretas. Por ello, también es muy selectiva ya que es capaz de distinguir diferentes subtipos. Del mismo modo, se esperaba una ejecución rápida ya que solo era necesaria la realización de una PCR y no dos como ocurre con las PCR-clásicas, debido al empleo de una única enzima y la realización de todas las reacciones a la misma temperatura (Tsugunori Notomiet al. 2015, Tavares RG et al. 2011). También supone, en teoría, una ventaja la posibilidad de apreciar los resultados a simple vista o mediante fluorescencia.

Sin embargo, los resultados obtenidos distan de lo esperable.

En principio la optimización de la LAMP ha requerido el aumento del tiempo de procesamiento a dos horas, en lugar de una, que era lo descrito. A ello hay que añadir el tiempo y dificultad de la preparación de los reactivos, que a nuestro entender y

observado de una forma cualitativa, requiere una gran concentración, aumentando en gran manera la posibilidad de cometer errores si se procesan gran cantidad de muestras de forma simultánea. Otro problema lo constituye la interpretación de los resultados tras la realización de la PCR. Según lo descrito, los resultados podrían interpretarse a través de visión directa ya que debería de apreciarse turbidez a simple vista, lo que facilitaría el método y ahorraría tiempo. Al aplicar la técnica y obtener los resultados, nos encontramos con la dificultad de no poder interpretarlo por visión directa, ni siquiera cuando se utilizó el DNA correspondiente a 2000 ooquistes, ya que no se apreció turbidez ninguna, por lo que fue necesario recurrir a la electroforesis en gel de agarosa para luego verlas en transiluminador de la misma forma que con las PCR clásicas. Todo ello supone un aumento de tiempo así como encarecimiento de la técnica (38 euros si se resuelve con gel de agarosa).

La concordancia con cualquiera de los métodos aplicados hasta la fecha es pobre.

Comparando con la técnica de referencia, tiene una sensibilidad del 43,5% lo que quiere decir que es capaz de diagnosticar *Cryptosporidium* en la mitad de casos que la microscopía. La especificidad sigue siendo baja, con un valor del 66,7 %. Los resultados muestran que 13 de las 24 muestras positivas dan un resultado negativo cuando se aplica la LAMP-PCR.

Es interesante comparar la sensibilidad y especificidad de las tres técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, las PCR clásicas y la LAMP-PCR. Esta última presenta los valores más bajos tanto de sensibilidad como de especificidad, siendo de las tres, la LAMP, el peor método de detección.

Hasta la fecha, la técnica de LAMP-PCR se ha aplicado para el análisis de *Cryptosporidium* en muestras de agua, tras una considerable concentración y extracción con métodos de separación inmunomagnética, lo que las convierte en muestras de DNA de alta calidad, muy concentradas y exentas de inhibidores e interferencias. Estas muestras difieren considerablemente de lo que es una muestra de heces, por lo que se necesitarán futuros estudios para la adecuación de la técnica a las muestras clínicas con garantía de éxito. En general, las técnicas moleculares, son mejorables mediante un pretratamiento de las muestras, a pesar de que se cree que la polimerasa empleada en la LAMP es menos sensible a los inhibidores externos que las PCR clásicas (María Isabel Arroyo et al. 2008).

En este caso en particular se trataba de evaluar los métodos para su uso en rutina de laboratorio, por lo que el pretratamiento de las muestras no resulta factible ni conveniente, no solo porque encarece el método, sino porque además son técnicas complejas y delicadas de realizar y por lo tanto no aplicables. Es por ello que en todos los casos se realizaron los ensayos con muestras frescas.

A modo de resumen diremos que las técnicas moleculares a pesar de tener una alta especificidad y sensibilidad y ser capaces de detectar pequeñas cantidades de parásito de la muestra, no serían las técnicas de elección para la rutina diaria de un laboratorio clínico donde se requieren resultados individuales, sin demasiada

dilatación en el tiempo. Su principal aplicabilidad son los estudios epidemiológicos ya que ofrecen la posibilidad de procesar las muestras en grandes lotes lo que facilita el trabajo, ahorra tiempo y dinero y en estos casos sería factible el procesamiento de las muestras con objeto de mejorar los resultados obtenidos.

La inmunocromatografía es una buena técnica ya que es rápida y barata y también se pueden realizar muchas muestras al mismo tiempo, sin olvidarnos de la posibilidad de emplear kits para la detección de varios parásitos al mismo tiempo. A pesar de ello no es la mejor técnica, su sensibilidad para la detección de infecciones por *Cryptosporidium* es menor que la de la microscopía y podríamos obtener falsos negativos. Por lo tanto sería una buena técnica de confirmación en el caso de tener dudas al realizar otras técnicas.

La técnica empleada en la actualidad para la detección de *Cryptosporidium* es la microscopía con microscopio de fluorescencia. Es una técnica que requiere invertir mucho tiempo en la observación al microscopio pero es la que mejores resultados obtiene, si se ven los ooquistes la muestra está infectada. A pesar de ello también tiene limitaciones, por ejemplo la dificultad para ver ooquistes cuando la cantidad eliminada en heces es baja, las habilidades visuales del microscopista y la variabilidad interobservador.



## **6. CONCLUSIONES**

1. La inmunocromatografía es una técnica barata y sencilla que no requiere grandes habilidades para su realización y que permite en poco tiempo descartar la presencia de *Cryptosporidium* en las muestras de heces. Es una buena técnica de screening sobre todo cuando disponemos de una muestra amplia de pacientes.
2. La PCR clásica es una técnica molecular compleja y que requiere la inversión de más tiempo. Presenta la ventaja de ser una buena técnica de diagnóstico con una sensibilidad y especificidad elevada pero debido a su precio elevado y al tiempo que conlleva son técnicas empleadas fundamentalmente en laboratorios para la realización de estudios epidemiológicos, donde las muestras pueden ser pretratadas mejorando considerablemente los resultados.
3. La LAMP PCR es una técnica compleja cuyo tiempo de realización es similar al de las PCR clásicas ya que al igual que en las anteriores, la preparación de los reactivos es compleja y la visualización de los resultados requiere electroforesis en gel de agarosa. Ha resultado ser una técnica más cara que las PCR clásicas y sin la ventaja del ahorro de tiempo. Tampoco sería una técnica aplicable al laboratorio clínico ya que los resultados tardan en obtenerse y los resultados se mejorarían tratando previamente las muestras (a priori esta técnica estaba menos influenciada por agentes inhibidores externos).
4. Considerando como factores fundamentales sus características de sensibilidad, especificidad, VPN, VPP, coste y concordancia con microscopia, el orden de aplicabilidad de las técnicas estudiadas, sobre muestras de heces frescas, en un laboratorio clínico de rutina de Parasitología, es el siguiente: microscopía > inmunocromatografía > PCR clásica > PCR- LAMP.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo M. I., Morales G. P., Sosa P. A., Carmona-Fonseca J., Maestre A. (2008). Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de *Plasmodium*: nueva técnica diagnóstica. MÉD.UIS. 2008;21(3):158-75.
- Arya SC et al. *Cryptosporidium* antigen detection in human feces by reverse passive hemagglutination assay. J Clin Microbiol. 1995 Jun;33(6):1684-5.
- Baron EJ, Schenone C, Tanenbaum B. Comparison of three methods for detection of *Cryptosporidium* oocysts in a low-prevalence population. J Clin Microbiol. 1989 Jan;27(1):223-4.
- Baxby D, Blundell N. Recognition and laboratory characteristics of an atypical oocyst of *Cryptosporidium*. J Infect Dis. 1988 Nov;158(5):1038-45.
- Baxby D, Blundell N, and Hart C. A.. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. J Hyg (Lond). 1984 Oct; 93(2): 317–323.
- Casemore DP, Armstrong M, Sands RL.. Laboratory diagnosis of *cryptosporidium*. J Clin Pathol. 1985 Dec;38(12):1337-41.
- Casemore DP. The antibody response to *Cryptosporidium*: development of a serological test and its use in a study of immunologically normal persons. J Infect. 1987 Mar;14(2):125-34.
- Casemore D P, Armstrong M, Bruce Jackson, Gordon Nichols, B.T. Thom (1984) Screening for *Cryptosporidium* in stools. *The Lancet*, Volume 323, Issue 8379, Pages 734-73
- Causapé AC., Quílez J, Sánchez-Acedo C, del Cacho E. Prevalence of intestinal parasites, including *Cryptosporidium parvum*, in dogs in Zaragoza city, Spain. Vet Parasitol. 1996; 67: 161-7
- Chacín-Bonilla L. Cryposporidiosis en humanos. Invest Clin 1995. 36(4): 207-250.
- Chalmers R. M., Elwin K., Thomas A.L., Guy E. C., Mason B. (2009) Longterm *Cryptosporidium* typing reveals the aetiology and species-specific epidemiology of human cryptosporidiosis in England and Wales, 2000 to 2003. Euro Surveill 14 (2).
- Chalmers R.M., Katzer F. (2013) . Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. Trends in Parasitology. 2013 May; 29 (5),237-251.
- Checkley W., Clinton White A., Jaganath D. A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. Lancet Infect Dis. 2015;15: 85–94
- Cieloszyka J., Goñi P., García A., Remacha M. A., Sánchez E., Clavel A. Two cases of zoonotic cryptosporidiosis in Spain by the unusual species *Cryptosporidium ubiquitum* and *Cryptosporidium felis*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30(9):549–551.
- Clavel A., Arnal A. C., Sánchez E. C., Varea M., Castillo F. J., Ramírez de Ocariz I., Quílez J., Cuesta J. Evaluation of the optimal number of fecal specimens in the

- diagnosis of cryptosporidiosis in AIDS and immunocompetent patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995;14 (1), 46-9.
- Farrington M, Winters S, Walker C, Miller R, Rubenstein D. *Cryptosporidium* antigen detection in human feces by reverse passive hemagglutination assay. *J Clin Microbiol*. 1994 Nov;32(11):2755-9.
  - Fayer R., Xiao L. (2007) *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Edited by CRC Press.
  - Garcia LS, Current WL. Cryptosporidiosis: clinical features and diagnosis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1989;27(6):439-60.
  - Garcia LS, Shimizu RY, Bernard CN. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*. 2000 Sep;38(9):3337-40.
  - Garcia LS, Shimizu RY. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J Clin Microbiol*. 1997 Jun;35(6):1526-9
  - Garcia LS, Shum AC, Bruckner DA. Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *J Clin Microbiol*. 1992 Dec;30(12):3255-7.
  - Gómez-Couso H, Méndez-Hermida F, Ares-Mazás E. Levels of detection of *Cryptosporidium* oocysts in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) by IFA and PCR methods. *Vet Parasitol*. 2006 Oct 10;141(1-2):60-5. .
  - Goñi P., Almagro-Nievas D., Cieloszyk J., Lóbeza S., Navarro-Marí J. M., Gutiérrez-Fernández J.. Cryptosporidiosis outbreak in a child day-care center caused by an unusual *Cryptosporidium hominis* subtype. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015. In Press. pii: S0213-005X(15)00072-5. doi: 10.1016/j.eimc.2015.02.003.
  - Goñi P, Martín B, Villacampa M, García A, Seral C, Castillo FJ, Clavel A. Evaluation of an immunochromatographic dip strip test for simultaneous detection of *Cryptosporidium* spp, *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica* antigens in human faecal samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Aug;31(8):2077-82
  - Hijawi N., Ng J., Yang R., Atoum M. F. M., Ryan U. (2010). Identification of rare and novel *Cryptosporidium* GP60 subtypes in human isolates from Jordan. *Exper Parasit* 125, 161-164.
  - Huang BQ, Chen XM, LaRusso NF. *Cryptosporidium parvum* attachment to and internalization by human biliary epithelia in vitro: a morphologic study. *J Parasitol*. 2004 Apr;90(2):212-21.
  - Kehl KS, Cicirello H, Havens PL. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. *J Clin Microbiol*. 1995 Feb;33(2):416-8.
  - Mac Kenzie W.V., Schell W.L., Blair K.A., Addis D.G., Peterson D.E., Hoxie N.J., Kazmierczak J.J., Davis J.P. Massive outbreak of waterborne *Cryptosporidium* infection in Milwaukee, Wisconsin: Recurrence of illness and risk of secondary transmission. *Clin Infect Dis* 1995 Jul. 21 (1), 57-62.

- MacPherson DW, McQueen R. Cryptosporidiosis: multiattribute evaluation of six diagnostic methods. *J Clin Microbiol.* 1993 Feb;31(2):198-202.
- Magi B, Canocchi V, Tordini G, Cellesi C, Barberi A. *Cryptosporidium* infection: diagnostic techniques. *Parasitol Res.* 2006 Jan;98(2):150-2. Epub 2005 Nov 18.
- Martinez I, Belda Neto FM. Contribution to the laboratory diagnosis of human cryptosporidiosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2001 Mar-Apr;43(2):79-82.
- McNabb SJ, Hensel DM, Welch DF, Heijbel H, McKee GL, Istre GR.. Comparison of sedimentation and flotation techniques for identification of *Cryptosporidium* sp. Oocysts in a large outbreak of human diarrhea. *J Clin Microbiol.* 1985 Oct;22(4):587-9.
- Meisel JL, Perera DR, Meligro C, Rubin C. Overwhelming watery diarrhea associated with *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 1976;70: 1156-60.
- Morgan UM, O'Brien PA, Thompson RC. The development of diagnostic PCR primers for *Cryptosporidium* using RAPD-PCR. *Mol Biochem Parasitol.* 1996 Apr;77(1):103-8.
- Ndao M., (2009) Diagnosis of Parasitic Diseases: Old and New Approaches. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.* Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases ,vol 2009. Article ID 278246,
- Nime FA, Burek JD, Page DL, Holscher MA, Yardley JH. Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 1976;70:592-8
- Notomi Tsugunori, Mori Yasuyoshi, Tomita Norihiro, and Kanda Hidetoshi. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology.* 2015; 53(1):1–5
- Omoruyi BE, Nwodo UU, Udem CS, Okonkwo FO. Comparative diagnostic techniques for *Cryptosporidium* infection. *Molecules.* 2014 Feb 24;19(2):2674-83. .
- Panciera RJ, Thomassen RW, Gardner FM. Cryptosporidial infection in a calf. *Vet Pathol.* 1971;8:479-84
- Parisi MT, Tierno PM Jr. Evaluation of new rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Cryptosporidium* oocysts in untreated stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul;33(7):1963-5.
- Parr JB, Sevilleja JE, Samie A, Alcantara C, Stroup SE, Kohli A, Fayer R, Lima AA, Houpt ER, Guerrant RL. Detection and quantification of *Cryptosporidium* in HCT-8 cells and human fecal specimens using real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 May;76(5):938-42.
- Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58:3494-500
- Rosenblatt JE, Sloan LM. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Cryptosporidium* spp. in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 1993 Jun;31(6):1468-71.
- Segura R, Prim N, Montemayor M, Valls ME, Muñoz C (2015) Predominant Virulent IbA10G2 Subtype of *Cryptosporidium hominis* in Human Isolates in Barcelona: A Five-Year Study. *PLoS ONE* 10(3):In Press. e0121753. doi:10.1371/journal.pone.0121753.

- Slavin D. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. Nov.). J Comp Pathol 1955;65:262-6
- Sulaiman I. M., Hira P. R., Zhou L, Al-Ali F. M., Al-Shelahi F. A. , Shweiki H. M., Iqbal J., Khalid N. and Xiao L. () Unique endemicity of Cryptosporidiosis in children in Kuwait. Journ of Clin Microbiol. 2005; 43 (6), 2805-2809.
- Tavares RG , Staggemeier R, Borges ALP, Rodrigues MT, Castelan LA , Vasconcelos J, Anschau ME, Spalding SM. Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection. The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2011;17(3): 239-248.
- Tosini F., Drumo R., Elwin K., Chalmers R.M., Pozio E., Caccio S. M. () The CpA135 gene as a marker to identify *Cryptosporidium* species infecting humans. Parasitol Intern. 2010;59:606-609.
- Tzipori S, Angus KW, Campbell I, Gray . EW, *Cryptosporidium*: evidence for a single-species genus. Infect Immun. 1980 Dec;30(3):884-6.
- Ungar BL, Soave R, Fayer R, Nash TE. Enzyme immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. J Infect Dis. 1986 Mar;153(3):570-8.
- Vejdani M, Mansour R, Hamzavi Y, Vejdani S, Nazeri N, Michaeli A. Immunofluorescence assay and PCR analysis of *Cryptosporidium* oocysts and species from human fecal specimens. Jundishapur J Microbiol. 2014 Jun;7(6):e10284. doi: 10.5812/jjm.10284. Epub 2014 Jun 1.
- Vetterling JM, Jervis HR, Merrill TG, Sprinz H. *Cryptosporidium wriari* sp. N. from the Guinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. J. Protozool 1971;18:243-7
- Weber R, Bryan RT, Bishop HS, Wahlquist SP, Sullivan JJ, Juranek DD. Hreshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. J Clin Microbiol. 1991 Jul;29(7):1323-7.
- Widerström M., Schönning C., Lilja M., Lebbad M., Ljung T. et al. Large Outbreak of *Cryptosporidium hominis* infection transmitted through the public water supply, Sweden. Emerging Infectious Diseases 2014 April; 20( 4)
- Wu Z, Nagano I, Matsuo A, Uga S, Kimata I, Iseki M, Takahashi Y. Specific PCR primers for *Cryptosporidium parvum* with extra high sensitivity. Mol Cell Probes. 2000 Feb;14(1):33-9.