

Diagnóstico de la criptosporidiosis aviar

Descripción de la técnica por coloración S-MB

En este breve trabajo se describe una nueva técnica de coloración Safranina-Azul de metileno para detectar la criptosporidiosis aviar, una de las enfermedades parasitarias zoonóticas más común en los pollos histológicamente diagnosticada.

DANIELLA PIERGILI FIORETTI (1). ANNABELLA MORETTI (1). GIUSEPPINA TACCONI (2)

La criptosporidiosis es una enfermedad parasitaria zoonótica causada por un protozoo perteneciente a la Familia *Cryptosporidiidae*, género *Cryptosporidium*.

La especie tipo, *Cryptosporidium muris*, fue descrita por primera vez por Tyzzer (1907) en cortes histológicos de las glándulas gástricas del ratón de laboratorio; después fue considerada durante varios decenios como una curiosidad científica, privada de cualquier repercusión relativa a la salud humana.

La atención prestada en el último decenio al problema de los síndromes entéricos neonatales en las explotaciones intensivas ha estimulado el interés de los investigadores hacia este protozoo, con la intención de esclarecer su

eventual papel en el origen de esta patología. De aquí la multiplicación de estudios y la detección del parásito en numerosísimas especies animales, domésticas y silvestres (sin excluir al hombre), asociado a manifestaciones morbosas más o menos declaradas, y la consideración de este protozoo como patógeno, desarrollado, tanto por sí sólo como asociado con otros enteropatógenos (*Coccidios*, *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Escherichia coli*), o en presencia de factores favorables como deficiencias nutricionales (Genchi, 1984; Jéret, 1981; Canestri Trotti, 1982).

En las explotaciones avícolas, si bien se indican con una cierta frecuencia infecciones criptosporídicas del tracto respiratorio y de la bolsa de Fabricio en los pavos jóvenes y en las codornices, son relativamente escasos los datos epidemiológicos sobre la prevalencia de la criptosporidiosis en el pollo.

Tzipori (1981) informa de una positividad serológica del 88% en Escocia en explotaciones de pollitos, y Snyder (1988) del 33% en Estados Unidos; Ley (1988) indica una positividad coproscópica del 27% en Carolina del Norte, mientras que Goodwin (1988), en base a investigaciones histológicas (6,4% de positividad), define la criptosporidiosis como «la segunda enfermedad protozoaria más común en los pollos histológicamente diagnosticada». En lo referente a Italia, la presencia de *Cryptosporidium* en las granjas avícolas ha sido detectada en raras ocasiones; únicamente por Mandelli y Valeri (1972) en el intestino de pavo, en la bolsa de Fabricio de pollo y en las cavidades rinosinuales de la codorniz japonesa.

La falta de datos epidemiológicos, difícilmente explicable si consideramos la importancia zootécnica asumida por estas explotaciones, ha motivado nuestro anterior estudio sobre la prevalencia de este protozoo en granjas de «broilers» y «roaster» de Italia central (Piergili Fioretti *et al.* 1991).

El cuadro I, que reúne los resultados obtenidos, muestra la notable difusión de *Cryptosporidium* spp., así como el papel patógeno desarrollado como agente primario y en asociación.

El diagnóstico de criptosporidiosis,

(1) Instituto de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria de Perugia (Italia).

(2) Cátedra de Patología Aviar, Facultad de Medicina Veterinaria de Perugia.

CUADRO I. INFECCIÓN CRIPTOSPORÍDICA EN ALGUNAS EXPLOTACIONES AVICOLAS («BROILER» Y «ROASTER») DE ITALIA CENTRAL

Explotaciones	N.º de sujetos examinados	N.º de sujetos infectados	Lesiones concurrentes	Asociaciones parasitarias
«Roaster» (10 granjas)	40 edad: 60/80 d	2 3 5	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad de Marek • Enteritis • Mala absorción 	<i>Coccidia</i> sp.
«Broiler» (20 granjas)	80 edad: 40/50 d	12 5 5	<ul style="list-style-type: none"> • Mala absorción • Enteritis • Enfermedad de los sacos aéreos 	<i>E. coli</i> + <i>Coccidia</i> sp.
Total %	120	32 (26)		



Son relativamente escasos los datos epidemiológicos sobre la prevalencia de la criptosporidiosis en el pollo.

realizado sobre preparaciones fecales coloreadas selectivamente con el método Ziehl-Neelsen modificado por Henriksen (1981), no ha demostrado ser una técnica totalmente convincente, desde el punto de vista técnico ejecutivo en condiciones «de campo».

Sobre la base de esta experiencia, los autores, vistos los positivos resultados obtenidos en el campo humano por Baxby y col. (1984), han puesto a punto una nueva técnica de coloración, Safranina-Azul de metileno (S-MB), rápida, sensible, específica y fácilmente utilizable para *screenings* epidemiológicos.

METODOLOGIA

Muestras fecales: se han utilizado 80 muestras fecales (30 muestras positivas para ooquistes criptosporídicos con la técnica Ziehl-Neelsen y 50 muestras negativas) recogidas en granjas de «broiler» y «roaster» de Italia central

y conservadas a +4 °C hasta el momento de su análisis.

TECNICA DE COLORACION SAFRANINA-AZUL DE METILENO (S-MB)

Se ha realizado el siguiente procedimiento:

1. Las preparaciones fecales, una vez secadas a temperatura ambiente, han sido fijadas con pase rápido sobre llama-bunsen, seguido de inmersión durante 3-5' en HCl al 3% y en metanol al 100%.

2. Lavado con agua y coloración con safranina acuosa al 1% (1 g de safranina en 100 cc H₂O destilada) durante 1'. La coloración se realiza en caliente mediante pasos rápidos del vidrio sobre llama-bunsen (el colorante debe alcanzar casi el punto de ebullición).

3. Enjuague en agua y contracoloración con azul de metileno al 1% durante 30".

4. Lavado de H₂O, montaje con DPX y observación al microscopio con objetivos 40x y 100x.

RESULTADOS

La técnica S-MB ha permitido evidenciar ooquistes criptosporídicos en las 30 muestras positivas examinadas, mostrando la misma sensibilidad y especificidad (ausencia de falsas positividades en las 50 muestras negativas) que el método selectivo Ziehl-Neelsen modificado por Henriksen. Los ooquistes se presentaban como corpúsculos ovoidales, dimensiones medias de 6,2×4,8 μm, índice corpóreo (longitud/profundidad) 1,2~1,3 y de un color vivo amarillo-naranja.

Los esporozoitos en el interior del ooquiste formaban una masa más oscura, con frecuencia apartada hacia una zona periférica con un efecto bananiforme (artificial debido a la fijación).

Detritus fecales, bacterias y levaduras presentaban la coloración de contraste con el azul de metileno. La fig. 2 muestra la misma coloración sobre preparaciones efectuadas por el menisco después de flotación de la muestra fecal con la técnica DSF (Dichromate Solution Flotation) (Wilson, 1982), utilizada por nosotros en cuanto es particularmente válida para eliminar levaduras y otras partículas que podrían dificultar su exacta lectura en el microscopio.

CONCLUSIONES

El diagnóstico de laboratorio, en las modernas explotaciones intensivas, se ha convertido en parte operativa de una asistencia técnica veterinaria permanente y ya no es, como en el pasado, un apoyo a intervenciones de necesidad. El diagnóstico parasitológico, en particular, ha entrado a formar parte de los criterios gestionales de la explotación, llegando a ser una estimulación para el rendimiento más acentuado de la producción zootéc-

nica. En este contexto, la mejora de las técnicas de diagnóstico a disposición y la puesta a punto de nuevas metodologías son consideradas como de extrema necesidad e interés.

La puesta en evidencia de una infección criptosporídica encuentra actualmente en el examen coprológico (técnicas de enriquecimiento por flotación, preparaciones fecales), apoyado por adecuadas coloraciones, la metodología de diagnóstico más válida, tanto en los casos de sintomatología clínica declarada como para encuestas epidemiológicas.

La coloración Safranina-Azul de metileno (S-MB) propuesta por nosotros como alternativa a las comúnmente en uso, como Giemsa, Ziehl-Neelsen y fenol-auramina (Ley, 1988), presenta mayores características para un uso aplicativo, uniendo a la facilidad y rapidez de ejecución (tiempo máximo 10') una óptima sensibilidad y especificidad, permitiendo eliminar problemas de diagnóstico diferencial. La falta de especificidad de la técnica Giemsa

(coloración de las levaduras con la consiguiente dificultad en la lectura), la duración del método Ziehl-Neelsen unida a la criticidad del momento de coloración en el carbol-fucsina, y la exigencia de un microscopio de fluorescencia para la coloración fenol-auramina, hacen a estas metodologías difícilmente utilizables para un diagnóstico en el campo veterinario. Nuestra experimentación ha mostrado asimismo una óptima respuesta de la técnica sobre preparaciones fijadas y utilizadas después de una semana.

Baxby y col. informan de la plena validez de la coloración S-MB sobre muestras fecales mantenidas durante 4 meses a -70°C , -20°C y $+4^{\circ}\text{C}$. Esto se considera particularmente útil allí donde sea necesario trabajar a gran escala para la programación de intervenciones sanitarias. ■

BIBLIOGRAFIA

BAXBY, J. E.; BLUNDELL, N.; HART, C. A.

1984. The development and performance of a simple, sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in faeces. J. Hyg. Camb., 92, 317-323.

CANESTRI TROTTI, G.; GRAMENZI, F.; FOGLINI, A.; TOGNATO, L. 1982. Prima segnalazione di protozoi del genere *Cryptosporidium* in vitelli in Italia. Atti Soc. Ital. Buiatria, 14, 289-292.

GENCHI, G.; HERMON, J.; SANGALLI, G.; TRALDI, G. 1984. La criptosporidiosi, fattore determinante nella diarrea neonatale. Praxis Vet., 5, 5-8.

GOODWIN, M. A.; BROWN, J. 1988. Istologic incidence and distribution of *Cryptosporidium* sp. infection in chickens, 68 cases in 1986. Avian Diseases, 32, 3-369.

HENRIKSEN, S. A.; POHLENZ, J. F. L. 1981. Staining of criptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen Technique. Acta Veterinaria Scandinavica, 22, 594-596.

JERRET, J. V.; SNODGRASS, D. R. 1981. Cryptosporidia associated with Rotavirus and *Escherichia Coli* in an outbreak of calf scours. Austral. Vet. J., 57, 47-52.

LEY, D. H.; LEVY, M. G.; HUNTERL, A.; CORBETT, W.; BARNES, H. I. 1988. Cryptosporidia positive of avian necropsy accessions determined by examination of auramine stained faecal smears. Avian Disease, 32, 108-113.

MANDELI, G.; VALERI, A. 1972. Coccidi del genere *Cryptosporidium* in alcune specie aviari. Atti XI Conv. Pat. Aviaria, II, 239-245.

PIERCILI FIORETTI, D.; MORETTI, A.; TACCONI, G. 1991. Intestinal cryptosporidiosis of roaster and broiler chicken flocks in Central Italy. XXIV World Veterinary Congress, 18-23 August, pg 293.

SNYDER, D. B.; CURRENT, W. L.; RUSSELL-CIHEEN, E.; GORHAM, S. L.; MALINSON, E. T.; MARQUARDT, W. W.; SAVAGE, P. K. 1988. Serologic incidence of *Cryptosporidium* in Delmarve broiler flocks. Poultry Science, 67, 730-735.

TYZZER, E. E. 1907. A sporozoa found in the peptic glands of the common mouse. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 5, 12-13.

TZIPORI, S.; CABELL, I. 1981. Prevalance of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. J. of Clinical Microbiology, 14, 455-456.

WILLSON, P. J.; ACRES, S. D. 1982. A comparison of Dichromate Solution Flootation and fecal smears for diagnosis of cryptosporidiosis in calves. Can. Vet. J., 23, 240-246.



El diagnóstico parasitológico ha entrado a formar parte de los criterios gestiona- les de la explotación moderna intensiva.