

Detección del parásito *Cryptosporidium* sp. en caracoles *Lissachatina fulica* de las provincias del Guayas y Los Ríos, Ecuador

Detection of the parasite *Cryptosporidium* sp. in *Lissachatina fulica* snails at the provinces of Guayas and Los Ríos, Ecuador

Biutty Cazorla Caicedo^{1,*}, Luigi Martini Robles², Marco Erazo Chiguano¹, Félix Man-Ging Freire¹ & Luis Solórzano Álava²

¹ Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Naturales, Escuela de Biología.
Av. Raúl Gómez Lince s/n Av. Juan Tanca Marengo

² Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, Sub-Proceso de Parasitología (INSPi).
Av. Julián Coronel 905 entre Esmeraldas y José Mascote.

Recibido 6 de mayo 2015; recibido en forma revisada 16 de mayo 2015, aceptado 8 de junio 2015
Disponible en línea 30 de junio 2015

Resumen

Se detectó la presencia del parásito *Cryptosporidium* sp. en las heces de caracoles terrestres del *Lissachatina fulica* utilizando técnicas de tinción, en las provincias Guayas y Los Ríos, en la costa de Ecuador. El número de muestras fue establecido de manera aleatoria, realizándose la recolección en días alternados durante la estación lluviosa. Se colectaron 411 ejemplares vivos en recipientes con el fin de obtener su material fecal. Posteriormente, la detección e identificación del parásito se realizó a través de un análisis coprológico parasitario y las muestras fueron teñidas con las técnicas Ziehl Neelsen modificada, Safranina-Azul de metileno y Giemsa.

De la totalidad de caracoles gigantes africanos terrestres recolectados en las provincias Guayas y Los Ríos, el 48,2% de las muestras resultaron positivas para *Cryptosporidium* sp. con la técnica de Ziehl Neelsen modificada, el 17,8% con Giemsa y el 14,1% con Safranina-Azul de metileno.

Con respecto a la evaluación de las técnicas de tinción, los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el método de ANOVA. Entre los resultados obtenidos, existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la técnica de Ziehl Neelsen modificada en relación con las otras dos empleadas, demostrando un mejor desempeño en la detección de ooquistes de *Cryptosporidium* sp., mientras que no se encontraron diferencias significativas entre las técnicas de Giemsa y Safranina-Azul de metileno.

Palabras clave: Caracol terrestre, *Cryptosporidium*, *Lissachatina fulica*, técnicas de tinción.

Summary

The presence of the parasite *Cryptosporidium* sp. was detected in snail feces of *Lissachatina fulica* through staining techniques, in the provinces Guayas and Los Ríos, in coastal Ecuador. The number of samples was determined by a random collection method conducted on alternate days during the rainy season. About 411 live specimens were placed in containers to obtain the fecal material. Subsequently, the detection and identification were performed through a parasitic stool analysis; Ziehl Neelsen modified Safranin-methylene blue and Giemsa techniques were applied.

Of all Giant African land snails collected in the provinces Guayas and Los Ríos, 48.2% of samples tested positive for *Cryptosporidium* sp. using the modified Ziehl Neelsen, 17.8% for Giemsa and 14.1% for Safranin-methylene blue techniques.

With regards to the evaluation of staining techniques the results were statistically analyzed using ANOVA, there is a significant difference ($p < 0.05$) between Ziehl Neelsen modified technique in comparison to the remaining ones, showing a better detect performance for oocysts of *Cryptosporidium* sp. However, significant differences between Giemsa and Safranin-methylene blue techniques were not found.

Key words: *Cryptosporidium*, *Lissachatina fulica*, staining techniques, terrestrial gastropod.

* Correspondencia del autor:
E-mail: byca_911@yahoo.com



Introducción

La presencia del caracol gigante africano (*Lissachatina fulica*) ha sido detectada en varias provincias de la costa ecuatoriana, reportándose por primera vez desde Esmeraldas, en el año 2005. Esta especie introducida para fines comerciales ha provocado diversos impactos negativos en los sectores agrícola, ecológico y en la salud pública (Correoso, 2006).

Al momento de su aparición el tema no generó mayor interés para las autoridades pertinentes; sin embargo, debido a su tipo alimentación polífaga y a sus desplazamientos masivos hacia las zonas rurales y urbanas como en jardines y parques, este caracol terrestre se ha convertido en una plaga competitiva para nuestros ecosistemas, principalmente durante la época lluviosa. Guayas y Los Ríos son las provincias de mayor interés por el impacto ocasionado en la salud humana, debido a que *Lissachatina fulica* es el hospedador de diferentes grupos zoológicos patógenos, entre ellos, el nemátodo *Angiostrongylus cantonensis*, causante de la meningoencefalitis eosinofílica, una enfermedad previamente registrada en las mencionadas provincias y cantones. Esta es producida por la ingestión de caracoles crudos, su aparición fue reportada en Guayaquil en el 2008 y estudiada por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) (Martini *et al.*, 2009).

Lissachatina fulica está vinculada con la cadena epidemiológica de transmisión de la Criptosporidiosis (diarreas acuosas) (Schiffler *et al.*, 2008); esta se produce por el contacto directo en ambientes contaminados con la presencia de *Cryptosporidium* sp. Este protozoario es un agente patógeno que se desarrolla y multiplica en las células epiteliales de los sistemas digestivos y respiratorios de los vertebrados y en órganos anexos de invertebrados (Arias *et al.*, 2008; Cabrera *et al.*, 2010).

El propósito de este trabajo es determinar la presencia del protozoario *Cryptosporidium* sp. en los caracoles terrestres de *Lissachatina fulica* en las provincias del Guayas y Los Ríos, utilizando las técnicas de tinción Ziehl Neelsen modificada, Safranina-Azul de metileno y Giemsa.

Materiales y métodos

Para la obtención y estimación del tamaño de muestra se realizó un muestreo aleatorio por el lapso de 30 minutos, durante la época lluviosa entre los años 2012 y 2013. Cada localidad elegida como punto de muestreo fue seleccionada mediante un recorrido por la zona, verificando la presencia de *L. fulica*.

Los caracoles fueron recolectados de forma manual, transportados al laboratorio de Parasitología del INSPI y distribuidos en recipientes plásticos *ad hoc* procurando que tengan sus respectivas aberturas de aireación. Posteriormente se colectó el material fecal

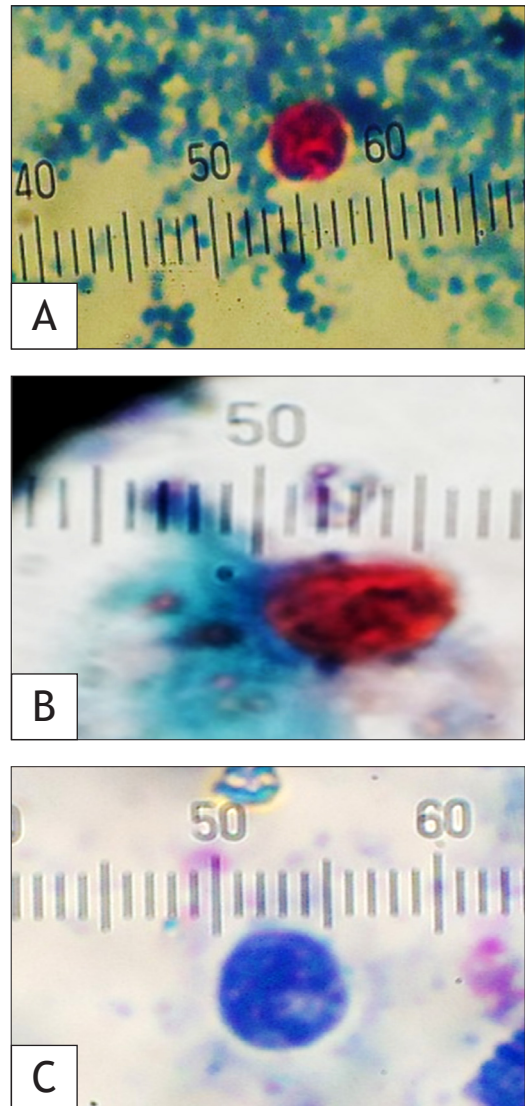


Figura 1. Ooquistes de *Cryptosporidium* sp. teñidos con diferentes técnicas: a) Ziehl Neelsen modificada, b) Safranina-Azul de metileno y c) Giemsa.

empleando el protocolo establecido en el laboratorio para la detección de agentes patógenos.

El material fecal se colocó en los tubos de ensayo, diluyéndose a una concentración de 1:1 con solución salina al 8.5% se homogenizó y centrifugó a 2500 rpm hasta obtener el precipitado final libre de impurezas. Posteriormente se realizó un frotis de este precipitado sobre las placas portaobjetos desengrasados para finalmente aplicar las técnicas de coloración Ziehl Neelsen modificada, Safranina-Azul de metileno y Giemsa para la detección de los ooquistes de *Cryptosporidium* sp. Al momento de determinar su presencia, estos fueron medidos empleando el micrómetro ocular.

Tabla 1. Coordenadas geográficas de las localidades muestreadas para la recolección del caracol *Lissachatina fulica* de la provincia del Guayas y Los Ríos, en la costa de Ecuador.

PROVINCIA DEL GUAYAS			PROVINCIA DE LOS RÍOS		
Cantón	Localidad	Coordenadas	Cantón	Localidad	Coordenadas
GUAYAQUIL	Mucho Lote	2°09'03" 79°92'34"	BABAHOYO	Barrio Lindo	1°48'24" 79°32'21"
	Miraflores	2°09'51" 79°55'02"		Pueblo Nuevo	1°32'38" 79°31'46"
DURAN	El Recreo	2°10'53" 79°48'54"	VENTANAS	Zapotal	1°21'34" 79°24'56"
	Primavera 3	2°11'16" 79°51'21"		Las Palmeras	1°26'22" 79°27'30"
MILAGRO	Chobo	2°15'00" 79°63'53"	QUEVEDO	Km 1 Vía A Valencia	1°01'11" 79°27'18"
	Parque Central	2°07'43" 79°35'37"		La Venus	1°2'31" 79°28'30"

Área de Estudio

La presente investigación ha sido llevada a cabo en dos provincias de la costa: Guayas, en los cantones Guayaquil, Durán y Milagro; y Los Ríos, en los cantones Babahoyo, Quevedo y Ventanas. En las diferentes localidades visitadas de los mencionados cantones y provincias, tanto urbanas como rurales, era evidente la presencia de los caracoles gigantes africanos, *Lissachatina fulica* (tabla 1).

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados a través de una estadística descriptiva, creándose una base de datos detallada en el programa de Excel 2007, donde se elaboraron gráficos representativos de los cantones muestreados de cada provincia. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, empleando la prueba de Tukey al 5% para comparar las medias de las técnicas empleadas, con la ayuda del programa estadístico QED Statistics 2007.

Resultados

El presente estudio determina la presencia de *Cryptosporidium* sp. en las heces de los caracoles *Lissachatina fulica*, en los cantones Guayaquil, Durán y Milagro de la provincia del Guayas y en los cantones Babahoyo, Quevedo y Ventanas, de la provincia Los

Tabla 2. Aplicación de tres técnicas en caracoles *Lissachatina fulica* para la detección de *Cryptosporidium* sp. en los cantones Guayaquil, Durán y Milagro de la provincia Guayas y en los cantones Babahoyo, Quevedo y Ventanas, de la provincia Los Ríos, en la costa de Ecuador.

One-way Analysis of Variance					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	1969,44	984.72	13.02	0.00049162
Within	15	1118.17	74.54		
Total	17	3087.61	18.27		

selected significance level < 0.05				
Group	N	Mean	Variance	StdD
Ziehl Neelsen	6	33	128	11.31
Safranina	6	9.66	24.66	4.96
Giemsa	6	12.16	70.96	8.42

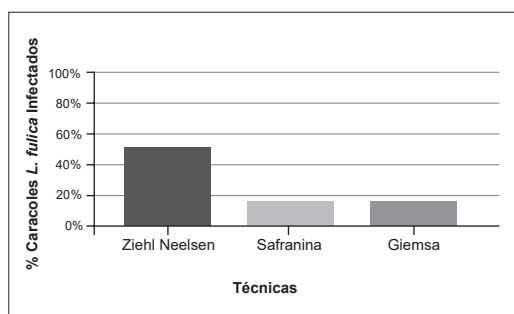


Figura 2. Porcentaje global de caracoles *Lissachatina fulica* infectados por el parásito *Cryptosporidium* sp. según tres técnicas empleadas en dos provincias de Ecuador.

Ríos, ambas en la costa de Ecuador. Se obtuvo un alto porcentaje de positividad, 48.2% con la técnica Ziehl Neelsen modificada; seguida de la técnica de Giemsa con un 17.8% y 14.1% con la técnica de Safranina-Azul de metileno (fig. 1).

Referente al análisis estadístico de las técnicas de tinción empleadas con ANOVA y con la prueba de Tukey se determinó que hay una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las tres técnicas aplicadas para la identificación del *Cryptosporidium* sp. en los caracoles *L. fulica*, en los cantones Guayaquil, Durán y Milagro de la provincia Guayas y en los cantones Babahoyo, Quevedo y Ventanas, de la provincia Los Ríos. La técnica Ziehl Neelsen modificada es significativamente diferente a la técnica Giemsa y Safranina-Azul de metileno; no se encontraron diferencias significativas entre estas dos últimas técnicas (tabla 2).

Conclusiones

Basado en las técnicas de tinción Ziehl Neelsen modificada, Safranina-Azul de metileno y Giemsa, se reporta por primera vez la presencia del parásito *Cryptosporidium* sp. en las heces del caracol gigante africano, *Lissachatina fulica*, en los cantones Guayaquil, Durán y Milagro de la provincia del Guayas y en los cantones Babahoyo, Quevedo y Ventanas, de la provincia Los Ríos, en la costa de Ecuador. La presencia de este coccidio, demuestra que el caracol gigante africano tiene la capacidad de albergar el

parásito y de actuar como vehículo de transmisión de éste y otros microorganismos del medio donde habita, de allí que puede ser considerado como bioindicador de contaminación con interés clínico para el hombre, tal como lo manifiesta Neira *et al.* (2010).

De acuerdo con los resultados obtenidos, existe una diferencia significativa entre los tres métodos de tinción empleados en la detección de oquistes, determinándose una mayor detección de *Cryptosporidium* sp. en *Lissachatina fulica* con la técnica Ziehl Neelsen modificado (ZNm), éstos resultados son comparables al estudio descrito por Schiffler *et al.* (2008). Sin embargo, no se descartaría en su totalidad los restantes dos métodos de tinción (Safranina-Azul de metileno y Giemsa), los cuales también demostraron tener cierta capacidad para detectar la presencia del parásito.

Con relación a la técnica de tinción de Safranina no se han encontrado registros publicados para *Cryptosporidium* sp. en caracoles, pero ha sido documentada para oquistes de *Cryptosporidium baileyi* en pollos de engorde, *Gallus gallus domesticus* (Cardozo *et al.*, 2008).

En cuanto a la técnica de Giemsa, no se encontró información relacionada con *Lissachatina fulica*; sin embargo, esta se ha empleado para la detección de oquistes de *Cryptosporidium* sp. en heces de animales y humanos (Morales & Herrera, 1986; El-Rahim, *et al.*, 1997). Esta técnica es poco utilizada debido a la dificultad de observación de la estructura interna del parásito debido a que no existe contratinción (Cardozo *et al.*, 2008).

Cabe mencionar que las tinciones en laboratorios de microbiología son las primeras herramientas a utilizar, entre ellas, Ziehl Neelsen es una tinción diferencial que ha permitido identificar un mayor porcentaje debido a la propiedad de ser ácido-alcohol resistente al momento de la observación en el microscopio óptico, debido a que permite poner de manifiesto aquellas estructuras del organismo al momento de proyectar el haz de luz (Negrón, 2009; López *et al.*, 2014).

En cuanto a los factores ambientales observados, estos no mostraron tener influencia en el porcentaje de caracoles parasitados dentro de la investigación, debido a que los valores se mantuvieron constantes en los meses de Enero a Marzo, durante la estación lluviosa.

Un elemento poco considerado que puede incrementar el riesgo de contaminación en Ecuador se relaciona con la confusión que existe entre los caracoles terrestres *Lissachatina fulica* y *Helix aspersa*; esta última es una especie muy apreciada en la gastronomía en ciertos sectores del país debido a su gran valor nutricional. Sin embargo, los caracoles de *Helix aspersa* son recolectados en estado silvestre o provienen de criaderos y son consumidos sin una adecuada cocción,

existiendo la posibilidad de que también se encuentren infectados, pudiendo el parásito ser transmitido de esta manera a los consumidores.

Recomendaciones

Se sugiere realizar mayores estudios en la detección de *Cryptosporidium* sp. empleando métodos moleculares.

Promover estudios de detección de *Cryptosporidium* sp. no solo en animales invertebrados sino también en vertebrados a nivel nacional.

Realizar estudios para la detección de *Cryptosporidium* sp. en caracoles *Helix aspersa*.

Referencias

- Arias, G., Marina, M., Cornejo, L., Bermúdez, V. & Ramírez, O. (2008). Estudio de infección sistémica por Herpes virus complicada con *Cryptosporidium* spp., en un delfín manchado del atlántico (*Stenella frontalis* Cuvier, 1829). Venezuela. *Rev. Cient.* (Maracaibo) 18(3): 243-252.
- Cabrera, L., Díaz, Parra, K. & Ojeda, G. (2010). Detección de parásitos protozoarios y helmintos en el molusco bivalvo *Geukensia demissa* (Dillwyn, 1817) presente en el sector de Nararét del Municipio Mara, Estado Zulia, Venezuela. *Rev. Cient.* (Maracaibo) 20(1): 07-16.
- Cardozo, S., Teixeira, W. & Lopes, C. (2008). Avaliação das técnicas de rotina no diagnóstico de oocistos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17(Supl 1): 351-353.
- Correoso, M. (2006). Estrategias preliminar para evaluar y erradicar *Achatina fulica* (Gastropoda: Achatinidae) en Ecuador. Boletín Técnico IASA, Serie Zoológica 2: 45-52.
- El-Rahim, Borghese, A., Failla, S., & Barile, V. L. (1997). Bovine cryptosporidiosis in newborn buffalo calves. In Proceedings 5th World Buffalo Congress, Royal Palace, Caserta, Italy, 13-16 October. Pg. 582-587.
- Martini, L., Muzzio, J., & Solórzano, L. (2009). Morfología y Ciclo Evolutivo del *Angiostrongylus cantonensis* en *Achatina fulica*. Concurso Científico, Anual Interno INHMT-LIP Ecuador. Disponible en: www.inh.gov.ec. Consultado en Marzo del 2012.
- Morales, M. & Herrera, M. (1986). Experiencia con la tinción rápida para el diagnóstico de la diarrea por *Campylobacter* sp. y *Cryptosporidium* sp. *Rev. Cost. Cienc. Med.* 7(3): 297-298.
- Negrón, M. (2009). *Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica*. 2ª Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires - Argentina. Disponible en: http://books.google.com.ec/books/about/Microbiolog%C3%ADa_Estomatol%C3%B3gica.html?id=Gxmui-vjZBgC&redir_esc=y
- Neira, P., Muñoz, N., Stanley, B., Gosh, M. & Rosales, M. (2010). *Cryptosporidium parvum* en gasterópodos silvestres como bioindicadores de contaminación fecal ecosistema terrestres. Universidad de Valparaíso. Santiago - Chile. *Rev. Chil. infect.* 27(3): 211-218.
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S. Cerón, G. & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad* 3(1): 10-18
- Schiffler, C., Gomes, F., Ederli, N. & Oliveira, F. (2008). *Achatina fulica* Bowdich (1822) um novo hospedeiro de especies de *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae). Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17 (1): 273-276.