Efficiency of Three Laboratories in Detecting *Cryptosporidium* in Stool Samples

Amorn Lekkla*
Chantima Sutthikornchai*
Yubolrat Suwanakeeree†
Panpob Lertlaituan‡
Yuawalak Sukthana*

Abstract *Cryptosporidium parvum* is one of the leading causes of opportunistic infections among HIV/AIDS patients. Due to the small size of its oocysts, detection of this protozoan requires special staining and laboratory expertise. In this study, we compare the effectiveness of the three leading parasitology laboratories in Mahidol University, Thailand. Serial concentrations of *Cryptosporidium parvum* oocysts from 6 to 1,500 oocysts per 10 µl were added to stool samples and distributed to the study laboratories. Conventional microscopy and special staining, using dimethyl sulfoxide (DMSO) modified acid-fast stain and modified cold Kinyoun's acid-fast techniques were applied. The sensitivity of both techniques was similar. All three laboratories could detect at least as many as 20 oocysts per 10µl with no statistically significant difference (p= 0.998). Either staining method could be applied at any laboratories serving HIV patients with opportunistic infections. However, training laboratory technicians to acquire such expertise and standardize it is necessary. Effective laboratory diagnosis would be very helpful for physicians, leading to patients' appropriate management.

Key words: *Cryptosporium parvum,* modified acid-fast stain, Kinyoun's acid-fast technique

บทคัดย่อ **การศึกษาเปรียบเทียบการตรวจอุจจาระหา*ครีย์พโตสปอริเดียม* โดยห้องปฏิบัติการ ๓ แห่ง**

อมร เหล็กกล้า*, จันทิรา สุทธิกรชัย*, ยุบลรัตร์ สุวรรณคีรี†, พันธ์พบ เลิศลายต่วน‡, เยาวลักษณ์ สุขธนะ*

**ภาควิชาพยาธิโปรโตซัว, คณะเวชศาสตร์เขตร้อน, †ภาควิชาพยาธิวิทยา, คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี, ‡ภาควิชาปรสิตวิทยา, คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล, มหาวิทยาลัยมหิดล*

Cryptosporidium parvum เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่พบในผู้ป่วยโรคติดเชื้อเอชไอวีระยะเอดส์. เนื่องจากโอโอซิย์สของเชื้อมีขนาดเล็ก การตรวจวินิจฉัยเชื้อนี้จึงต้องใช้วิธีย้อมสีพิเศษในห้องปฏิบัติการที่มีความชำนาญในการตรวจ. การศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *C. parvum* ของ ๓ หน่วยงานหลักในมหาวิทยาลัยมหิดล. ผู้วิจัยเตรียมตัวอย่างอุจจาระจำนวน ๓๐ ตัวอย่าง ในแต่ละตัวอย่างมีอุจจาระ ๑๐ ไมโครลิตร มีโอโอซิย์สในความเข้มข้นต่างๆกัน ตั้งแต่ ๖ - ๑,๕๐๐ ตัว และมีอุจจาระ ๓ ตัวอย่างที่ไม่ได้ใส่เชื้อลงไปเป็นกลุ่มควบคุม แล้วจัดส่งไปยังห้องปฏิบัติการทั้ง ๓ แห่ง เพื่อทำการตรวจด้วยวิธีย้อมพิเศษ dimethyl sulfoxide (DMSO) หรือ modified acid-fast stain (kinyoun's) ตามความชำนาญของแต่ละหน่วยงาน. ผลปรากฏว่าเมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การย้อมสีพิเศษทั้ง ๒ วิธีมีความไวเหมือนกัน โดยห้องปฏิบัติการทั้ง ๓ แห่งสามารถตรวจวินิจฉัยโอโอซิย์สที่มีจำนวนน้อยกว่า ๒๐ ตัว ในตัวอย่างอุจจาระ ๑๐ ไมโครลิตรได้ไม่แตกต่างกัน (ค่าพี = ๐.๙๙๘). การใช้วิธีย้อมสีพิเศษ DMSO หรือ modified acid-fast stain (kinyoun's) ได้ผลดีทั้ง ๒ วิธี จึงสรุปว่าการใช้วิธีใดขึ้นอยู่กับความถนัดและการฝึกฝนอย่างถูกต้องของบุคลากรห้องปฏิบัติการ จะช่วยแพทย์ในการตรวจวินิจฉัยและการรักษาผู้ป่วยอย่างถูกต้องได้.

คำสำคัญ: *ครีย์พโตสปอริเดียม, การตรวจอุจจาระ*

**Department of Protozoology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University*
†Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok
‡Department of Parasitology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

Background and Rationale

Cryptosporidium parvum is a medically important protozoan which can cause acute and chronic diarrhea in healthy people, although it causes more severe diarrhea in HIV patients.[1] Transmission occurs by consuming oocysts, the infective stage, that contaminate food and water. In Thailand, most cryptosporidiosis cases are associated with immunodeficiency hosts.[2] There are several laboratory methods for diagnosis of *C. parvum* infection, such as microscopy, immunological methods, fluorescent techniques and PCR. Although molecular diagnosis using PCR is a sensitive and specific technique, it needs high expertise and, because it is costly, it is less suitable for the majority of Thai HIV patients. Therefore, microscopy and special staining techniques are widely used for detecting *C. parvum,* infection in most laboratories, especially modified acid-fast (cold Kinyoun)[3] and modified acid-fast dimethyl sulfoxide.[4]. The main purpose of this project was to standardize the three Mahidol University laboratories that provide *C. parvum* staining as their routine service in different staining techniques.

Methodology

A stock stool sample with *C. parvum* oocysts at a concentration of 1,500 oocysts/10 μl was two-fold

Table 1

Sample No.	Number of recovered oocysts: Means (min-max)			
	Lab A	Lab B	Lab C	Reference sample
1.	1287.3 (1269-1314)	1215.7 (1193-1253)	1245.7 (1189-1302)	1500
2.	700.7 (691-712)	691.3 (687-698)	693.7 (685-705)	750
3.	266.7 (258-274)	261.3 (252-271)	269.0 (261-283)	375
4.	138.3 (134-145)	140.3 (139-141)	138.3 (135-139)	187
5.	76.0 (69-80)	73.3 (71-78)	73.3 (71-75)	94
6.	30.3 (29-32)	19.0 (28-31)	27.7 (27-29)	48
7.	10.0 (9-11)	9.0 (7-11)	8.0 (6-9)	24
8.	0.3 (0-1)	0.3 (0-1)	0.3 (0-1)	12
9.	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	6

LabA = Laboratory of Department of Parasitology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University
Lab B = Laboratory of Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital, Mahidol University
Lab C = Laboratory of Department of Protozoology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

serially diluted for a total of nine different concentrations, ranging from the original concentration to 6 oocysts/10 μl. Three stool smears were prepared from 10 μl of each dilution, altogether there were 27 samples. Three negative stool samples confirmed by DMSO modified acid-fast stain and PCR method were used as negative control samples. One set containing 30 samples was sent to each laboratory studied for it to perform routine modified acid-fast staining and count the number of recovered oocysts. The result then was recorded, analyzed and compared with the reference sample.

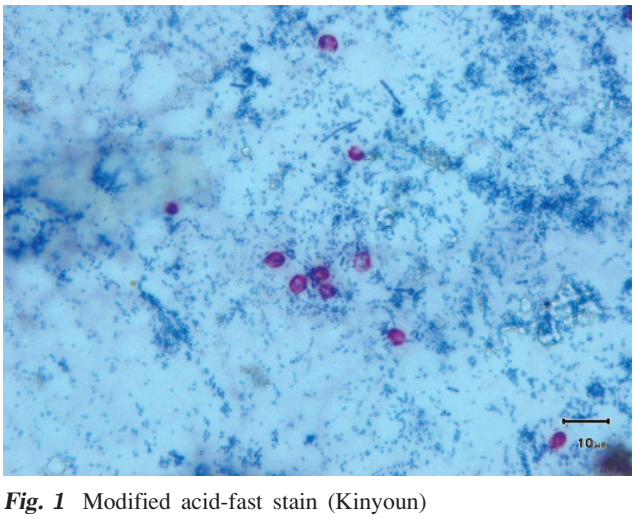

Fig. 1 Modified acid-fast stain (Kinyoun)

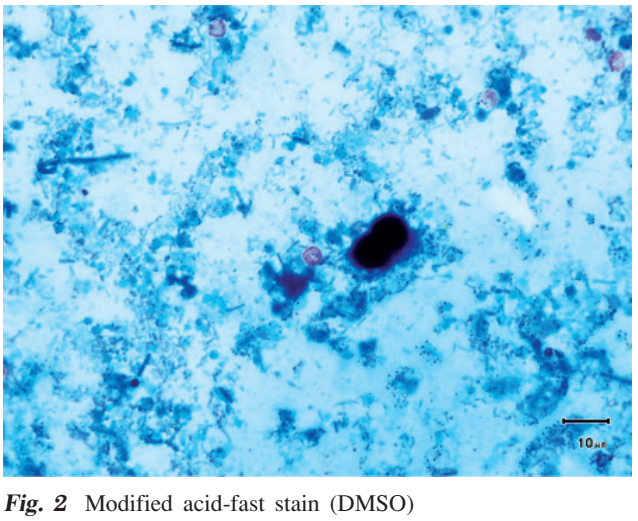

Fig. 2 Modified acid-fast stain (DMSO)

Results

All three laboratories detected *C.parvum* from the stool samples at all concentrations higher than 10 oocysts/ 10 μl, but could not detect the last dilution sample which contained fewer than 10 oocysts/10 μl. Means (min-max) of the recovered oocysts are shown in Table 1. There was no statistical difference among the three laboratories of Mahidol University (p= 0.998)

Discussion

From the results, we found that all three of Mahidol's laboratories: Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital; Department of Pathology, Faculty of Medicine, Ramathibodi Hospital; and Department of Protozoology, Faculty of Tropical Medicine had the same ability in the diagnosis of *Cryptosporidium parvum* by microscopy and modified acid-fast stain. Even though the DMSO and Kinyoun's method are different modified acid-fast staining methods, they are widely used in most laboratories. However, the limitation of Mahidol's laboratories was their inability to detect a small amount oocysts (<10 oocysts/ 10 μl) of *Cryptosporidium*. Mahidol University, as a leading health science university in Thailand, is always concerned about its diagnostic standard and the improvement of its technicians' ability. The high standard of laboratory diagnosis would be very helpful for physicians, leading to the appropriate management of patients.

Acknowledegments

This research was financially supported by the Thanat-Molee Khoman Foundation. Mr. Surapol Yimsumram and Ms. Rachatawan Chiabchalard kindly provided help in its preparation.

References

1. Peterson C. Cryptosporidiosis in patients with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1992;15:903-9.
2. Suputtamongkol Y, Waywa D, Bailey W, Beeching NJ, Hart CA. Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. J Trop Med Parasitol 2002;96:797-802.
3. Garcia LS, Bruckner DA, Brewer TC, Shimizu RY. Techniques for recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from specimens. J Clin Microbiol 1983;18:185-90.
4. Bronsdon MA. Rapid dimethyl sulfoxide-modified acid-fast stain of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. J Clin Microbiol 1984;19:952-3.