

Artículo Original

Propuesta de una técnica de cuantificación estandarizada (Katz-G.G.G.) de *Blastocystis* sp., y su correlación con el contaje en examen directo y la clínica del paciente.

Proposal for a standardized quantification technique (Katz-G.G.G.) of *Blastocystis* sp., and its correlation with the count on direct examination and the patient's clinical.

González-Ramírez Carolina^{1*}, Gil-Gómez Florimar¹, Contreras Sandra¹, Guillén Maryoli¹, Blanco de García María Alejandra¹, Díaz José Javier².

¹Laboratorio de Investigaciones Parasitológicas "Jesús Moreno Rangel", Cátedra de Parasitología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. ²Clinica del Niño, Mérida, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido noviembre 2012 - Aceptado marzo 2013

RESUMEN

Se propone la técnica Katz-G.G.G., que se fundamenta en medir una cantidad de material fecal utilizando el molde de Katz y posterior cuantificación de *Blastocystis* sp., en cámara de Neubauer, relacionando la cantidad de parásitos contados por gramo de heces (p.g.h.) con la cuantificación tradicional hecha por campo en examen directo (400x), las características de la muestra fecal y manifestaciones clínicas del hospedador. Los resultados demuestran que existe correlación entre la cuantificación tradicional en examen directo y la estandarizada, no encontrándose correspondencia entre la clínica del paciente y los individuos que eliminan menos de 5 *Blastocystis* sp., (menos de 35.200 *Blastocystis* p.g.h.), porque más del 50 % mostró sintomatología. El 74,2 % de los individuos que excretaban más de 5 *Blastocystis* sp. (más de 37.154 *Blastocystis* p.g.h.), mostraron clínica. Entre los síntomas más frecuentes se refirió dolor abdominal (66,3 %), flatulencias (47,4 %) y en menor proporción diarrea y vómito (5,2 %). La mayoría de las muestras fecales fue de consistencia blanda (40%) o pastosa (56,6%) y de pH ácido (98,5%). Se concluye que no existe correlación entre la intensidad parasitaria y la clínica del paciente por lo que se sugiere indicar tratamiento a quienes presentan clínica independientemente del número de *Blastocystis* que excrete.

PALABRAS CLAVE

Blastocystis sp., blastocistosis, cuantificación,

Katz, cámara de Neubauer, Katz-G.G.G., parasitosis, sintomatología.

ABSTRACT

Technique Katz-G.G.G. is proposed, which is based on the measurement of stool using the Katz mold and subsequent quantification of *Blastocystis* sp., in a Neubauer chamber, relating the number of parasites counted per gram of feces (p.g.f.) with quantification traditionally made per field (400x) in wet mounts, the fecal sample characteristics and clinical manifestations of host. The results demonstrate a correlation exists between the traditional quantification and standardized direct examination, no relationship was found between the patient and clinical individuals removed within 5 *Blastocystis* sp. (less than 35,200 *Blastocystis* p.g.f.) because more than 50% showed symptoms. 74.2% of individuals over 5 excreting *Blastocystis* sp. (37.154 over *Blastocystis* p.g.f.) showed clinic. Among the most common symptoms referred abdominal pain (66.3 %), flatulence (47.4 %) in smaller proportion diarrhea and vomiting (5.2 %). Most fecal samples were of consistency soft (40 %) or paste (56.6 %) and acid pH (98.5 %). We conclude that there is not correlation between parasite intensity and the patient's clinical state. Therefore, we suggest indicating treatment to those patients that present clinic symptoms regardless of the number excreted of *Blastocystis* sp.

KEY WORDS

Blastocystis, blastocistosis, quantification,

*Correspondencia al autor: carolina.gonzalez@uv.es

Katz, Neubauer chamber, Katz-G.G.G., parasitosis, symptoms.

INTRODUCCIÓN

La ubicación taxonómica del género *Blastocystis* ha sido modificada varias veces por el sistema de clasificación debido a su variabilidad genética, investigaciones recientes basadas en el estudio filogenético del ssrARN (subunidad pequeña del rARN) [1], lo han incluido entre los Stramenopiles, un grupo evolutivamente complejo y heterogéneo de protistas unicelulares y pluricelulares con especies heterótrofas y fotosintéticas [2,3]. La última clasificación para *Blastocystis* sp., se enmarca en el Reino: Chromista; Subreino: Chromobiota; Infrareino: Heterokonta; Superphylum: Grystan; Phylum: Bigyra; Subphylum: Opalinata; Clase: Blastocystea; Orden: Blastocystida; Familia: Blastocystidae; Género: *Blastocystis* (Alexieff 1911) Brumpt 1912; Especies: *Blastocystis hominis*, *Blastocystis ratti*, *Blastocystis cycluri*, *Blastocystis geocheiloni*, *Blastocystis lapemi* y *Blastocystis python* [4,5].

Mediante reacción en cadena de la polimerasa con análisis moleculares de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), PCR seguido de secuenciación y PCR con *primers* subtipos específicos, de parásitos aislados de humanos y animales, se encontraron 9 subtipos de *Blastocystis* filogenéticamente distintos, 5 de ellos de origen humano (*B. hominis*) y el resto de origen animal, por lo que se postuló la presencia de diferentes especies dentro del mismo género, comprobándose una extensa variabilidad genética [5-7].

La revisión de Tan [5] refiere que la nomenclatura de *B. hominis* no es apropiada, debiendo ser designado como *Blastocystis* sp., o *Blastocystis* sp. "subtipo n" donde "n" corresponde al número del subtipo (1-9) de acuerdo con la clasificación de Stensvold y col., en el consenso de 2007 [8].

En relación a *Blastocystis* existe gran controversia debido a su pleomorfismo [1,5,9-11], variabilidad biológica [1,5,12], bioquímica [13], inmunológica [14], genética [15-17] y su rol patógeno tanto en humanos como en animales [1,12,18,19].

Tratando de explicar la repercusión de esta variabilidad sobre la clínica del paciente, se ha asociado su patogenicidad con el número de organismos presentes en materia fecal, planteando que el parásito causa síntomas cuando se presenta en gran número [20] [9,21] y la severidad de la sintomatología se correlaciona con la cantidad de *Blastocystis* sp., presentes en las heces [22,23]. Inicialmente se

comprobó la patología en aquellos pacientes con cuantificaciones mayores a cinco parásitos por campo, empleando aumento de 1000x (oil immersion field) [24,25]. Posteriormente se desvirtuó este criterio afirmando que la patología se relaciona con presencia de 5 ó más parásitos por campo, utilizando aumento de 400x (high-power field) [1,18,19,23,26-28].

Contrariamente, Kukoschke y Müller [14] proponen que el número de *Blastocystis* sp. presentes en las heces puede variar durante el curso de la infección, al igual como ocurre con *Entamoeba histolytica* y *Giardia intestinalis*, el número de organismos no constituye un marcador de la patogenicidad [1,19,24,27,29,30], como se demuestra en aquellos pacientes, huéspedes de una gran cantidad de *Blastocystis* sp., que no suelen presentar manifestaciones clínicas [1,27,31,32].

En los laboratorios clínicos, el parámetro utilizado es la cuantificación de *Blastocystis* sp., mediante examen directo con el empleo de una gota de solución salina y otra de solución yodada, se emulsiona una cantidad de heces no estandarizada y se cuantifica los parásitos observados a 400x.

El objetivo de esta investigación es estandarizar la cuantificación de *Blastocystis* sp., a partir de la técnica que utiliza el molde de Katz [33] para medir la cantidad de heces y la cámara de Neubauer para cuantificar parásitos, consintiendo solamente los errores propios del personal, y obteniendo una mayor exactitud que permita realizar comparaciones de resultados más precisos, unificando los estudios de variabilidad del parásito dependientes de la cantidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron 205 pacientes, 124 femeninos y 81 masculinos, con edades comprendidas entre 3 - 89 años (edad promedio: 39 ± 16 años), con o sin manifestaciones clínicas (dolor abdominal, flatulencia, diarrea y vómito), infectados con *Blastocystis* sp., como parásito único o asociado con especies no patógenas. El diagnóstico se hizo mediante examen directo de rutina en los laboratorios de tres Instituciones públicas (Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, Instituto Venezolano del Seguro Social y Ambulatorio El Llano) del Municipio Libertador del estado Mérida, durante los meses comprendidos entre abril y julio del 2011.

Estas mismas muestras se reevaluaron en el Laboratorio de Investigaciones Parasitológicas "Dr. Jesús Moreno Rangel", Cátedra de Parasitología, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Para

confirmar el parasitismo único o en concomitancia con protozoarios comensales se realizó: examen macroscópico: aspecto, consistencia según la Escala de Bristol [34], sangre y moco; examen químico: determinación del pH con tiras Hydrion Products e inmunocromatografías para sangre oculta (Hema-screen™) y coproantígenos de *Giardia / Cryptosporidium / Entamoeba* (r-biopharm). Examen directo, técnicas de concentración (Ritchie y Kato-Katz), coloración (Lugol para la identificación parasitaria y la coloración de granos de almidón determinantes de amilorrea; Bailer-Faraggi para la detección de esteatorrea; Hematoxilina Férrica y Ziehl Neelsen modificada para la detección de protozoos y coccidias respectivamente).

Criterios de Inclusión. En el muestreo se siguió la normativa de ética y bioseguridad del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) para inclusión de pacientes en investigaciones científicas, siguiendo así lineamientos de la declaración de Helsinki de 1975. Todos los individuos o sus representantes legales otorgaron el consentimiento informado. Se incluyeron en el estudio aquellos individuos parasitados por *Blastocystis* sp. como patógeno único.

Criterios de exclusión. Se excluyeron pacientes que acudieron a los Laboratorios con: Microorganismos patógenos diferentes o asociados con *Blastocystis* sp., y disfunciones gastro intestinales de origen no infecciosos:

- Infectados con parásitos patógenos diagnosticados en una reevaluación microscópica e inmunológica (mediante el uso de coproantígenos).

- Presencia de leucocitos fecales: segmentados neutrófilos (como criterio de procesos inflamatorios o sugerentes de infección bacteriana) y mononucleares (sugerentes de infección viral) e hifas, pseudohifas y blastoconidias en división (como criterio probable de infección micótica).

- Úlcera péptica, úlcera duodenal, enfermedad inflamatoria intestinal, adenocarcinoma colónico, síndrome de intestino irritable (SII).

- Síndrome de malabsorción intestinal (Intolerancia a disacáridos, severa amilorrea, creatorrea y esteatorrea).

Descripción de la Técnica de cuantificación.

Con el molde propuesto por Katz y col. [33] se miden 41,7 mg de materia fecal, en la que se cuantifican los parásitos empleando la cámara de Neubauer (Fig. 1).

La medición de las heces se lleva a cabo en función de la consistencia de ésta. En el caso de materia fecal blanda, pastosa o dura se colocan las heces sobre un papel satinado, cubriéndolas con el tamiz de nylon y se presiona firmemente con la espátula del equipo de Kato-Katz [35] para filtrar las partículas pequeñas, quedando retenidas las partículas gruesas que interfieren en la visualización microscópica. El molde se depositado en el centro de una placa de Petri de 56 mm, se llena con la muestra tamizada, se enrasa el orificio, se retira el molde de forma que toda la muestra fecal quede en la placa de Petri (Fig. 1). En el caso de materia fecal líquida se llena el orificio del molde de Katz con las heces líquidas, previamente filtrada en gasa doble, aumentando la presión para evitar el desplazamiento de las heces por capilaridad entre el molde y la placa.

Una vez retirado el molde, se emulsiona la muestra fecal con 1 mL de solución salina fisiológica.

La cuantificación se lleva a cabo con una cámara de Neubauer. Siguiendo el procedimiento para la cuantificación de leucocitos, se cargan las dos cámaras del hematimetro de Neubauer y se cuantifican los *Blastocystis*, que aparecen en los cuatro cuadrados grandes de las esquinas (marcados como L, en la Fig. 1) y el cuadrado central, lo que corresponde a un volumen de 1 mm³. Para determinar la cantidad de parásitos por mL se multiplica el número de parásitos contados por 1.000.

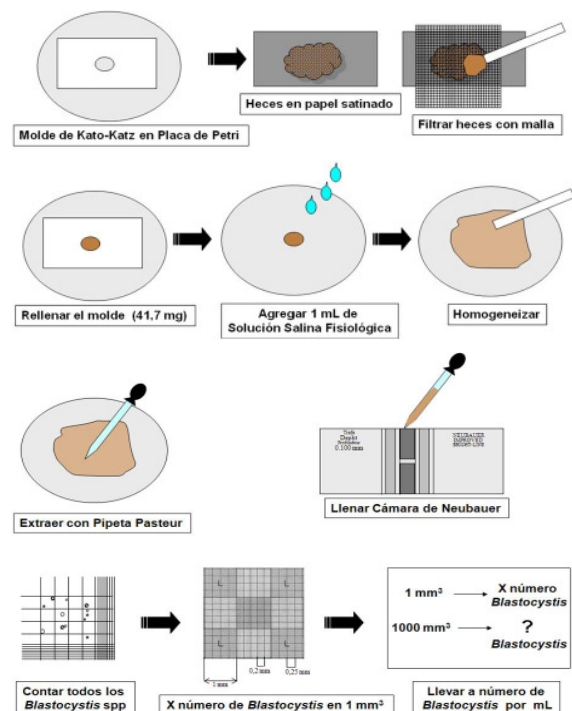


Fig. 1. Procedimiento de la técnica Katz-G.G.G.

Análisis Estadístico. Mediante el test de Chi cuadrado (χ^2) se relacionaron las siguientes variables: infección por *Blastocystis* sp., edad y sexo de los pacientes y la consistencia y el pH de las muestras fecales. Para comparar la cuantificación del examen directo con la técnica Katz-G.G.G. se aplicó la prueba de correlación Spearman. La asociación entre parásitos cuantificados p.g.h. mediante la técnica Kato-G.G.G. y la clínica del paciente se realizó con la prueba U de Mann-Whitney. El intervalo de confianza para todas las pruebas estadísticas fue del 95%. El procesamiento de la información se efectuó empleando los Programas: Microsoft Excel, Statistic y SPSS versión 12,0.

RESULTADOS

El 60,5 % de los individuos que participaron en el estudio fueron de sexo femenino y el 39,5 % de sexo masculino ($\chi^2 = 18,04 p = 0,0001$).

Según la edad, el grupo de 31 a 40 años representó el 30,7 %, seguido por los grupos de 21 a 30 años (20 %) y los de 41 a 50 años (18,0 %) ($\chi^2 = 161,58 p = 0,0001$) (Tabla 1).

TABLA 1

Distribución de las muestras de *Blastocystis* sp. por grupos de edad y sexo.

Edades (años)	Sexo				Total	
	Femenino		Masculino			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
0 – 10	1	0,5	5	2,4	6	2,9
11 – 20	8	3,9	10	4,9	18	8,8
21 – 30	33	16,1	8	3,9	41	20,0
31 – 40	37	18,0	26	12,7	63	30,7
41 – 50	19	9,3	18	8,8	37	18,0
51 – 60	13	6,3	7	3,4	20	9,8
61 – 70	8	3,9	3	1,5	11	5,4
71 – 80	2	1,0	3	1,5	5	2,4
81 – 90	3	1,5	1	0,5	4	2,0
Total	124	60,5	81	39,5	205	100

En la evaluación macroscópica de las heces según la Escala de Bristol (Fig. 2), la consistencia pastosa resultó la más frecuente con 56,6 % (116/205), seguida de la blanda con 40 % (82/205) ($\chi^2 = 252,64 p = 0,0001$) (Figura 2).

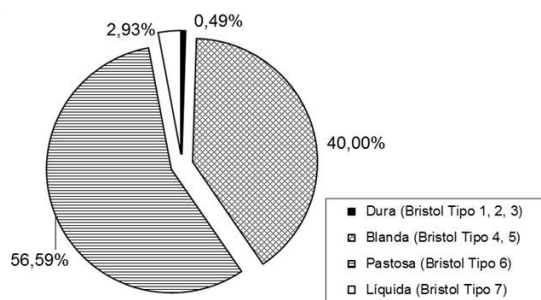


Fig. 2. Distribución de las muestras con *Blastocystis* sp., según la consistencia de las heces.

El examen químico de las heces mostró que 98,54 % (202/205) de las muestras mantenían un pH ácido entre (5-6). El 1,46 % (3/205) presentó pH neutro 7 ($\chi^2 = 386,35 p = 0,0001$) (Fig. 3).

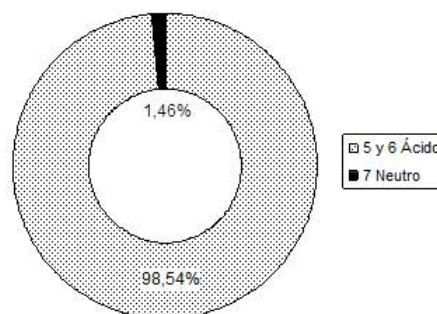


Fig. 3. Distribución de las muestras de heces con *Blastocystis* sp. en función del pH de las mismas.

Con relación a la presencia de manifestaciones clínicas, no se encontró diferencia significativa ($\chi^2 = 7,11 p = 0,0077$) entre los individuos que presentan sintomatología (56,6 %) y los asintomáticos (43,4 %) (Tabla 2).

TABLA 2

Sintomatología en pacientes con *Blastocystis* sp.

Sintomatología	Nº de Pacientes	%
Asintomático	89	43,4
Sintomático	116	56,6
Total muestras	205	100

Relacionando la clínica de los pacientes con la cantidad de parásitos (5 ó más *Blastocystis* sp. por campo), se encontró que el 74,2 % de los pacientes mostraron algún signo o síntoma en contraste con el 25,8 % que eran asintomáticos ($\chi^2 = 31,03 p = 0,0001$). Contrariamente en los que se cuantificó menos de cinco *Blastocystis* sp., por campo (139/205), no se encontró diferencia significativa ($\chi^2 = 0,014 p = 0,90$) entre la presencia (50,4 %) o ausencia (49,6 %) de manifestaciones clínicas (Tabla 3).

TABLA 3

Relación entre la presencia de manifestaciones clínicas y el conteo de *Blastocystis* en el examen directo.

Manifestaciones clínicas	<i>Blastocystis</i>				Total	
	< 5 células		≥ 5 células			
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Si	70/139	50,4	49/66	74,2	119/205	58,1
No	69/139	49,6	17/66	25,8	86/205	41,9
Total	139/205	67,8	66/205	32,2	205/205	100

Cuando se comparó la cuantificación de parásitos realizada mediante examen directo y Katz-G.G.G., se determinó correlación mediante la prueba de Spearman ($R_2 = 0,758779$; $p < 0,05$). Sin embargo, cuando se comparó la cantidad de parásitos cuantificados p.g.h. mediante Katz-G.G.G. y las manifestaciones clínicas del paciente, la prueba de Mann-Whitney no encontró correspondencia entre ellos ($U = 561,0$; $p = 0,691$).

Al distribuir los pacientes según la cantidad de

Blastocystis sp., se encontró que un 67,8 % de ellos excretaron menos de cinco parásitos determinados mediante examen directo, lo que corresponde con una eliminación igual o menor a 35.200 parásitos p.g.h. mediante Katz-G.G.G.

Al analizar la clínica mostrada por los pacientes se encontró, dolor abdominal 77/116 (66,3 %), flatulencia 55/116 (47,4 %), diarrea 6/116 (5,2 %) y vómito 6/116 (5,2 %) ($\chi^2 = 129,46$; $p = 0,0001$) (Tabla 4).

TABLA 4
Correlación entre cuantificación de *Blastocystis* sp. y sintomatología

Número de pacientes	Examen Directo (p/c) ^a	Contaje estandarizado promedio ^b	Asintomático n=89 (43,4 %)		Sintomático n=116 (56,6 %)							
			Ninguno	%	DA	%	FT	%	DIA	%	VO	%
≤ 5 <i>Blastocystis</i> sp. por campo (400x)												
33	0-1	13.485	22	10,7	10	8,6	2	1,7	0	0,0	0	0,0
20	0-2	16.250	15	7,3	4	3,5	1	0,9	0	0,0	0	0,0
2	0-3	17.000	1	0,5	0	0,0	1	0,9	0	0,0	0	0,0
16	1-2	25.625	7	3,4	7	6,0	2	1,7	2	1,7	0	0,0
15	1-3	23.667	6	2,9	4	3,5	5	4,3	0	0,0	0	0,0
10	2-3	29.400	1	0,5	8	6,9	2	1,7	0	0,0	1	0,9
33	2-4	24.606	14	6,8	10	8,6	10	8,6	0	0,0	0	0,0
2	2-5	22.000	1	0,5	0	0,0	1	0,9	0	0,0	0	0,0
2	3-4	29.000	1	0,5	1	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
6	3-5	35.200	1	0,5	3	2,6	3	2,6	0	0,0	0	0,0
≥ 5 <i>Blastocystis</i> sp. por campo (400x)												
3	3-6	37.154	1	0,5	0	0,0	2	1,7	0	0,0	0	0,0
13	4-6	41.333	7	3,4	4	3,5	1	0,9	1	0,9	0	0,0
3	5-7	38.333	1	0,5	1	0,9	1	0,9	1	0,9	0	0,0
1	5-8	32.000	0	0,0	0	0,0	1	0,9	0	0,0	0	0,0
3	6-8	63.333	1	0,5	2	1,7	0	0,0	1	0,9	0	0,0
2	7-10	46.000	0	0,0	1	0,9	1	0,9	0	0,0	0	0,0
13	8-10	62.462	3	1,5	7	6,0	6	5,2	0	0,0	2	1,7
6	10-12	57.000	2	1,0	2	1,7	2	1,7	0	0,0	0	0,0
2	10-15	159.500	1	0,5	0	0,0	1	0,9	0	0,0	0	0,0
2	12-14	60.000	1	0,5	1	0,9	1	0,9	0	0,0	0	0,0
4	12-15	103.250	1	0,5	2	1,7	2	1,7	0	0,0	0	0,0
1	12-16	49.000	1	0,5	1	0,9	1	0,9	0	0,0	0	0,0
4	14-16	230.500	1	0,5	1	0,9	3	2,6	0	0,0	0	0,0
2	18-20	244.000	0	0,0	2	1,7	1	0,9	1	0,9	1	0,9
1	20-22	60.000	0	0,0	1	0,9	1	0,9	0	0,0	0	0,0
1	20-24	100.000	0	0,0	1	0,9	1	0,9	0	0,0	1	0,9
1	25-30	80.000	0	0,0	1	0,9	1	0,9	0	0,0	0	0,0
1	26-30	90.000	0	0,0	0	0,0	1	0,9	0	0,0	0	0,0
1	30-35	840.000	0	0,0	1	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
1	> 50	264.000	0	0,0	1	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
1	> 100	825.000	0	0,0	1	0,9	1	0,9	0	0,0	1	0,8
205		47.610	89	43,4	77	66,4	55	47,4	6	5,2	6	5,2

a: Número de *Blastocystis* sp. cuantificados en Examen Directo (400X);

b: Mediante la técnica de Katz-G.G.G.; DA: dolor abdominal; FT: flatulencia; DIA: diarrea; VO: vómito.

DISCUSIÓN

Se estandarizó una técnica de cuantificación de parásitos utilizando un hematímetro, previa medición de las heces en un molde, se propone el nombre de Katz-G.G.G., debido al empleo del molde de Katz y a las iniciales de los apellidos de las autoras.

Cuando se compara la cuantificación de parásitos realizada mediante examen directo y la técnica propuesta Katz-G.G.G., se determinó una correlación directa entre ambas técnicas. Sin embargo, se puede considerar que el examen directo no es una técnica estandarizada para la cuantificación de *Blastocystis*, debido a que se observa solapamiento en las cuantificaciones realizadas con esta técnica en relación a las estimaciones obtenidas en la cámara de Neubauer. Este hecho pudiera atribuirse a la variación que puede existir en la cantidad de muestra fecal y el tamaño de la gota de solución donde se emulsiona, así como lo impreciso de la cuantificación, sujeta a la percepción personal del analista.

En el examen directo no se considera la consistencia de las heces, especialmente de las muestras líquidas, debido a la cantidad de agua presente que provoca una mayor dilución de los parásitos, situación que ha sido corregida en esta técnica siguiendo las indicaciones hechas por Stoll [36] en la determinación de intensidades de huevos de helmintos, situación que se debe considerar al momento de cuantificar cualquier elemento en una muestra fecal.

Otra ventaja de la técnica estandarizada sobre la cuantificación directa de las heces formadas, es que al diluir la materia fecal en solución salina para cargar el hematímetro, los parásitos se distribuyen de manera más homogénea [28].

La propuesta de cuantificación que realiza Ponce de León y col. [37] presenta la desventaja de una técnica semi-estandarizada, mediante conteo en examen directo que conlleva a las imprecisiones antes mencionadas.

La técnica propuesta en este trabajo, aunque más laboriosa, requiere del molde de Katz y el hematímetro para su ejecución, mantiene menor margen de error por cuanto la cantidad de heces en la que se cuantifican los parásitos es invariable y el error humano es disminuido debido a que los conteos se realizan en los cuadrantes del hematímetro. Esta técnica puede ser reproducida por cualquier grupo de investigación, obteniendo resultados más confiables, con la rigidez necesaria para llevar a cabo comparaciones estandarizadas que se requieran para dilucidar la variabilidad intrínseca de *Blastocystis* sp.

Existe consenso sobre la patogenicidad de

Blastocystis sp., en ausencia de otro microorganismo patógeno (parasitario, bacteriano, vírico o micótico) [38,39], sin embargo, las investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha no encuentran correlación entre la cantidad de *Blastocystis* sp. en heces y la clínica del paciente [1,27,29,31,40,41]. Se considera a *Blastocystis* sp. como patógeno potencial, independientemente de la cantidad de parásitos presentes por campo a 400x [27,42]. En el pasado se utilizó como criterio para tratar la enfermedad la presencia de 5 o más parásitos por campo (400x) [19,20,43-46].

Devera y col. [39,47] determinaron que las manifestaciones clínicas de los pacientes no dependen de la cantidad de *Blastocystis* sp. por campo, aunque observaron una relación directamente proporcional entre la carga parasitaria y la severidad del cuadro clínico. Los trabajos de Sheenan y col. [20], Kain y col. [29] y Carbajal y col. [43] coinciden en que el hallazgo de un gran número de parásitos en heces se asocia con formas agudas, aunque no es predictivo de diarrea [11,43,48].

Según los resultados obtenidos en esta investigación, no se puede asegurar que la cantidad de parásitos encontrados en heces determine la presencia de sintomatología en los pacientes con blastocistosis. El criterio de cuantificación de los parásitos observados por campo microscópico o por gramo de heces no se relacionó directamente con la aparición de síntomas. Si bien, la mayoría de los pacientes que excretaron 5 ó más parásitos por campo (400x) presentaron clínica, más de la mitad de los individuos con menos de 5 *Blastocystis* sp., mostraron sintomatología al momento del estudio.

Los resultados de esta investigación concuerdan con los hallazgos de Vassalos y col. [27], quienes afirman no detectar diferencias de intensidad (medida en parásitos por campo) entre la población sintomática y asintomática con blastocistosis [22].

Este estudio se realizó con una muestra puntual, es necesario destacar que la descarga de *Blastocystis* sp., en la muestra fecal ocurre de forma irregular [1,27,49]. Por tanto se hace necesario que en futuras investigaciones se analicen varias muestras fecales del mismo individuo emitidas en diferentes días, como internacionalmente se reconoce, 3 muestras en días alternos.

Se ha descrito que la presencia de sintomatología en los pacientes que cursan con blastocistosis no se relaciona con el número de parásitos presentes sino con los diferentes estadios morfológicos del parásito, [1,12,27], y a las características genéticas de los parásitos (subtipos: intrasubtipos / intersubtipos y genotipos patógenos) [1,12,14,16,17,27,50-53], como ha sido descrito por Vassalos y col. [27] quienes

describen mayor relación de pacientes sintomáticos con la presencia de subtipo 3 y forma ameboide en los cultivos.

El tipo de alimentación [1,28,54] y el estado inmune del hospedador [1,28,42] son factores que han sido relacionados con la presencia de sintomatología, debido a que la patogenicidad de *Blastocystis* sp., depende de la interacción entre el sistema inmune, el microambiente en el intestino del hospedador y la acción tóxico-alérgica que origina inflamación inespecífica del colon [5,32,55].

En relación al aspecto macroscópico de las heces de los individuos parasitados con *Blastocystis* sp., la mayoría excretó heces pastosas (56,59 %) y blandas (40 %), siendo mínimo el porcentaje de heces duras (0,49 %) y líquidas (2,93 %). La menor proporción de heces líquidas analizadas en el estudio, sugiere que esta consistencia de la materia fecal no depende directamente de la presencia del parásito.

Entre la sintomatología más frecuente informada por los individuos bajo estudio se encontró dolor abdominal (66,3 %) asociado a flatulencia (47,4 %) y en menor frecuencia diarrea y vómito (5,2 %) respectivamente. El dolor abdominal, síntoma mayormente reportado en estos pacientes, probablemente se deba a la producción de CO₂, producto de la fermentación de hidratos de carbono que lleva a cabo *Blastocystis* sp. [56], la inflamación de la mucosa intestinal [32,44] y el síndrome de colon irritable [1,55,57].

El 98,5 % de las muestras en este estudio presentaron un pH entre 5 y 6, no encontrándose muestras fecales con pH alcalino; es importante destacar que en esta investigación ningún paciente informó ardor o prurito perianal, como consecuencia de la acidificación de las heces por aumento del ácido láctico producido en anaerobiosis como producto del metabolismo de los hidratos de carbono [56], lo que origina molestia perianal, descrito por Ponce de León y col. [37]. Cabe destacar, los hallazgos de Lee [58], quien describe bajos niveles de *Escherichia coli* y *Lactobacillus* sp., pH fecal ácido y sobrecrecimiento de *Candida* sp., en casos crónicos de blastocistosis.

Los resultados del presente estudio, sugieren a los médicos en ejercicio clínico la aplicación de tratamiento farmacológico solo a pacientes que presenten sintomatología, independientemente de la intensidad del parasitismo, evitando así el tratamiento innecesario a aquellos que portan subtipos no patógenos [1,12,17,27,59-61] o se encuentren en equilibrio parásito-hospedador [46,62], trayendo como consecuencia la ruptura de este equilibrio y alterando el efecto inmune protector. De igual manera, sería conveniente aplicar tratamiento farmacológico

a aquellos pacientes que cursan con sintomatología aunque presenten menos de 5 *Blastocystis* sp. por campo en determinado momento.

CONCLUSIONES

La técnica de cuantificación propuesta de Katz-G.G.G. se correlaciona con el reporte de *Blastocystis* por campo, mediante examen directo realizado de rutina en los laboratorios clínicos. Esta técnica se recomienda para estudios de investigación que requieran resultados comparables, ya que disminuye los errores intrínsecos del analista.

No se observó correlación entre la intensidad parasitaria y la clínica del paciente por lo que se sugiere indicar tratamiento a quienes presentan clínica independientemente del número de *Blastocystis* que excrete.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Kozubsky L, Archelli S. Algunas consideraciones acerca de *Blastocystis* sp., un parásito controversial. Acta Bioquím Clín Latinoam. 2010; 44 (3): 371-376.
- [2] Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, et al. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of *Stramenopiles* inferred from multiple molecular sequence data. J Eukaryot Microbiol. 2002; 49: 42-53.
- [3] Silberman J, Sogin M, Leipe D, Clark C. Human parasite finds taxonomic home. Nature. 1996; 380-398.
- [4] Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. Biol Rev Camb Philos Soc. 1998; 73: 203-266.
- [5] Tan K. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* sp. Clin Microbiol Rev. 2008; 21 (4): 639-665.
- [6] Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H. Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. Parasitology. 2003; 126: 1-9.
- [7] Lanuza M, Carbajal J, Villar J, Borrás R. *Blastocystis hominis*, patógeno intestinal. An Med Inter. 1997; 14 (9): 490.
- [8] Stensvold C, Arendrup M, Jespersgaard C, Mølbak K, Nielsen H. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 59(3): 303-307.
- [9] Guzmán de Rondón C, Vethencourt A, Galindo M, Chacón N, Wagner C, Nessi A. Comportamiento biológico de *Blastocystis hominis* en pacientes tratados con secnidazol (Unidazol®). Rev Soc Ven Microbiol. 2008; 28 (1): 66-71.

- [10] Pérez de Suárez E, Guzmán de RC. La morfología del *Blastocystis hominis* en las heces y evaluación de métodos parasitológicos. GEN. 1994; 48 (4): 226-231.
- [11] Zierdt C. *Blastocystis hominis* - Past and Future. Clin Microbiol Rev. 1991; 4 (1): 61-79.
- [12] Salinas J, Vildozola H. Infección por *Blastocystis*. Artículo de Revisión. Rev Gastroenterol Perú. 2007; 27 (3): 264-274.
- [13] Zierdt C, Donnelly C, Muller J, Constantopoulos G. Biochemical and ultrastructural study of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol. 1988; 26: 965-970.
- [14] Kukoschke K, Müller H. SDS-PAGE and immunological analysis of different axenic *Blastocystis hominis* strains. J Med Microbiol. 1991; 35 (1): 35-39.
- [15] Carbajal J, Villar J, Lanuza M, Esteban J, Muñoz C, Borrás R. Significación clínica de la infección por *Blastocystis hominis*: estudio epidemiológico. Med Clin. 1997; 108 (16): 608-612.
- [16] Clark C. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. Mol Biochem Parasitol. 1997; 87 (1): 79-83.
- [17] Meloni D, Poirier P, Mantini C, Noël C, Gantois N, Wawrzyniak I, et al. Mixed human intra- and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis* sp. Parasitol Inter. 2012; 61 (4): 719-722.
- [18] Hussein E, Hussein A, Eida M, Atwa M. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentally infected rats. Parasitol Res. 2008; 102 (5): 853-60.
- [19] Cañete-Villafranca R, Rodríguez-Jiménez P. Infección por *Blastocystis* sp.: revisión de la literatura. Rev Méd Electrón [Internet]. 2012 Sep-Oct [Disponible en: <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202012/vol5%202012/tema05.htm>]; 34(5) (consultado 01-02-2013).
- [20] Sheenan D, Raucher B, McKittrick J. Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of human disease. J Clin Microbiol. 1986; 24 (4): 548-550.
- [21] García L. 2007. Diagnostic medical parasitology, 5th ed. ASM Press, Washington, DC.
- [22] Nimri L, and Batchoun R. Intestinal colonization of symptomatic and asymptomatic school children with *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol. 1994; 32 (11): 2865-2866.
- [23] Stenzel D, Boreham P. *Blastocystis hominis* revisited. Clin Microbiol Rev. 1996; 9: 563-584.
- [24] Kain K, Noble M, Freeman H, Barteluk R. Epidemiology and clinical features associated with *Blastocystis hominis* infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 1987; 8 (4): 235-244.
- [25] Özçakir O, Güreşer S, Ergüven S, Akyön Yılmaz Y, Topaloglu R, Haşçelik G. Characteristics of *Blastocystis hominis* infection in a Turkish university hospital. Turkiye Parazitoloj Derg. 2007; 31: 277-282.
- [26] Kaya S, Sesli M, Cicioğlu B, Arikan S, Demirci M. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. Turkiye Parazitoloj Derg. 2007; 31: 184-187.
- [27] Vassalos C, Spanakos G, Vassalou E, Papadopoulou C, Vakalis N. Differences in clinical significance and morphologic features of *Blastocystis* sp. subtype 3. Am J Clin Pathol. 2010; 133 (2): 251-258.
- [28] Anderson R. Propagación y persistencia de enfermedades infecciosas en las poblaciones de mamíferos. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 1993; 12 (1): 179-180.
- [29] Kain K, Noble M. *Blastocystis hominis* infection in humans. Clin Infect Dis. 1989; 11(3): 508-509.
- [30] Martínez-Barbabosa I, Gutiérrez-Quiroz M, Ruiz-González L, Ruiz-Hernández A, Gutiérrez-Cárdenas E, Gaona E. *Blastocystis hominis* y su relación con el estado nutricional de escolares en una comunidad de la sierra de Huayacocotla, Veracruz, México. Rev Biomed. 2010; 21: 77-84.
- [31] Doyle P, Helgason M, Mathias R, Proctor E. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol. 1990; 28 (1): 116-121.
- [32] Garavelli P, Zierdt C, Fleisher T, Liss H, Nagy B. Serum antibody detected by fluorescent antibody test in patients with symptomatic *Blastocystis hominis* infection. Recenti Prog Med. 1995; 86 (10): 398-400.
- [33] Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1972; 14 (6): 397-400.
- [34] Lewis S, Heaton K. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. Scand J Gastroenterol. 1997; 32(9): 920-924.
- [35] Ash L, Orihel T, Savioli L. Bench aids for the diagnosis of human intestinal parasites. World Health Organization, Geneva. 1994.
- [36] Stoll N, Hauscheer W. Concerning two options in dilution egg counting: Small drop displacement. Am J Hyg. 1926; 6: 136-145.
- [37] Ponce de León P, Svetaz M, Zdero M. Importancia del diagnóstico de *Blastocystis hominis* en el examen parasitológico de heces. Rev Latinoam Microbiol. 1991; 33 (2-3): 159-164.
- [38] Carrero S, Carrero de P. M, Pérez M, Carrero J. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en pacientes

sintomáticos. MedULA. 1999; 5 (1-4): 49-56.

[39] Devera R, Velásquez V, Vásquez V, Azacon B, Jiménez M. *Blastocystis hominis*: criterios de patogenicidad. Saber. 2000; 12 (2): 23-28.

[40] Chourio G, Díaz I, Casas M, Sánchez M, Torres L, Luna M, *et al.* Epidemiología y patogenicidad de *Blastocystis hominis*. Kasmera. 1999; 27 (2): 77-102.

[41] Markell E, Udkow M. *Blastocystis hominis* pathogen or fellow traveler? Am J Trop Med Hyg. 1986; 35 (5): 1023-1026.

[42] Llibre J, Tor J, Manterola J, Carbonell C, Foz M. *Blastocystis hominis* chronic diarrhoea in AIDS patients. Lancet. 1989; 1: 221.

[43] Carbajal J, Del Castillo L, Lanuza M, Villar J, Borrás R. Karyotypic diversity among *Blastocystis hominis* isolates. Int J Parasitol. 1997; 27 (8): 941-945.

[44] García-Pascual L, Bartolomé-Comas R, Cuenca-Luque R, Laporte A. Enteritis por *Blastocystis hominis*. Med Clin (Barc). 1988; 91 (20): 797.

[45] LeBar W, Larsen E, Patel K. Afebrile diarrhea and *Blastocystis hominis*. Ann Intern Med. 1985; 103 (2): 306.

[46] Zierdt C. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol. 1991; 29 (3): 662-663.

[47] Devera R, Azacon B, Jiménez M. *Blastocystis hominis* en pacientes del Hospital Universitario "Ruíz y Páez" de Ciudad Bolívar, Venezuela. Bol Chil Parasitol. 1998; 53 (3-4): 65-70.

[48] Lanuza M, Carbajal J, Villar J, Borrás R. Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. Parasitol Res. 1997; 83 (1): 60-63.

[49] Vennila G, Kumar G, Anuar A, Rajah S, Saminathan R, Sivanandan S, *et al.* Irregular shedding of *Blastocystis hominis*. Parasitol Res. 1999; 85: 162-164.

[50] Garavelli P, Scaglione L, Bicocchi R, Libanore M. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. Infection. 1991; 19 (3): 185.

[51] Mansour N, Mikhail E, El-Masry N, Sabry A, Mohareb E. Biochemical characterisation of human isolates of *Blastocystis hominis*. J Med Microbio.

1995; 42 (4): 304-307.

[52] Zierdt C, Zierdt W, Nagy B. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. J Parasitol. 1995; 81: 127-129.

[53] Souppart L, Moussa H, Cian A, Sancier G, Poirier P, El-Alaoui H, *et al.* Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from symptomatic patients in Egypt. Parasitol Res. 2010; 106 (2): 505-511.

[54] Vannatta J, Adamson D, Mullican K. *Blastocystis hominis* infection presenting as recurrent diarrhea. Ann Int Med. 1985; 102: 495-496.

[55] Ramírez-Miranda M, Jiménez-González D, Rodríguez-Campa M, González-Angulo A, Hernández-Castellanos R, Sara Arroyo-Escalante A, *et al.* Irritable bowel syndrome: Frequency and phylogenetic relationship of *Blastocystis* sp. from Mexican patients. Rev Gastroenterol Mex. 2011; 76 (4): 309-315.

[56] León-Barua R. Flatulencia. Rev Gastroenterol Perú. 2002; 22 (3): 234-242.

[57] Giacometti A, Cirioni O, Fiorentini A, Fortuna M, Scalise G. Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1999; 18 (6): 436-439.

[58] Lee M. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol. 1991; 29 (9): 2089.

[59] Lanuza M, Carbajal J, Villar J, Mir A, Borrás R. Soluble-protein and antigenic heterogeneity in axenic *Blastocystis hominis* isolates: pathogenic implications. Parasitol Res. 1999; 85 (2): 93-97.

[60] Rivas-Rodríguez ID. *Blastocystis hominis*. Disponible en: <http://www.gastromerida.com/pdf/gastro/pacientes/hominis.pdf> (consulta 12-02-2013).

[61] Dogruman-Al F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt O, Demirel M. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. Parasitol Res. 2008; 103: 685-689.

[62] Zierdt C, Nagy B. Antibody response to *Blastocystis hominis* infections. Ann Int Med. 1993; 118: 985-986.