

**ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO PARA EL DIAGNÓSTICO DE
BLASTOCYSTIS SP EN PACIENTES DE LA CIUDAD DE MONTERÍA**

ANA LUIS LLANOS BANDA

Trabajo de grado como opción para obtener el título de Bacterióloga

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
MONTERÍA- COLOMBIA
NOVIEMBRE DE 2017**

**ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO PARA EL DIAGNÓSTICO DE
BLASTOCYSTIS SP EN PACIENTES DE LA CIUDAD DE MONTERÍA**

ANA LUIS LLANOS BANDA

MAYRA LIGIA RACINY ALEMÁN. M.Sc

DIRECTORA

WILLIAM SEGUNDO HOYOS MORALES. M.Sc

CO-DIRECTOR

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA

MONTERÍA- COLOMBIA

NOVIEMBRE DE 2017

PÁGINA DE RESPONSABILIDAD DEL AUTOR:

La responsabilidad ética, legal y científica de las ideas, conceptos y resultados del proyecto,
serán responsabilidad de los autores.

Artículo 61, acuerdo N° 093 del 26 de Noviembre del 2002 del Consejo Superior.

PÁGINA DE NOTA DE ACEPTACIÓN:

El Jurado calificador del trabajo no será responsable de las ideas emitidas por los autores (Artículo 46, acuerdo 006 de Mayo de 1979)

(Consejo Directivo)

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Jurado

Jurado

Montería, Noviembre de 2017

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar a este momento. A mi padre y a mi madre, gracias por su inalcanzable dedicación, amor y sacrificio, porque sin ellos no hubiera podido llegar al lugar donde estoy.

A mi hermano: porque sus palabras de no poder graduarme me hicieron perseverar más mi meta.

A Alfonso, mi compañero de batallas, por su inmenso apoyo, amor, porque en los momentos que sentía que podía desfallecer estabas para apoyarme.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Mayra Raciny Alemán, por todas sus enseñanzas y directrices para culminar esta etapa.

A mi co-director William Hoyos Morales, por su confianza, consejos, conocimientos, tiempo y dedicación, por todas esas horas dedicadas para poder culminar este gran proyecto.

A mis amigos Senaida Garrido, Jorge Cordero y Jairo Mass, que de una u otra forma me ayudaron para poder culminar todo este proceso.

RESUMEN

Blastocystis sp. es un agente infeccioso unicelular que afecta el aparato digestivo de humanos y diferentes especies animales, el cual a pesar de haber sido descubierto hace alrededor de 100 años y de ser el parásito intestinal mayormente identificado a nivel mundial mantiene muchas incógnitas en la comunidad científica en lo referente a su morfología, estructura genética, ciclo de vida, diagnóstico y tratamiento. La identificación microscópica puede ser complicada por la variedad de formas morfológicas con las que el parásito aparece en materia fecal. Es muy importante la pericia del profesional de laboratorio, la calidad técnica del microscopio y los colorantes que son elementos críticos para su correcta identificación. Por lo tanto, los cultivos son considerados la mejor opción para su detección ya que estos proporcionan alta carga parasitaria, y suficiente ADN para su identificación molecular. El objetivo de esta investigación fue establecer un cultivo para la detección de *Blastocystis sp.* en pacientes de la ciudad de Montería. Se propuso el medio de Boeck y Drbohlav para el aislamiento de dicho parásito, el cual está compuesto de una base sólida a base de huevo y una fase sobrenadante o solución de Locke, preparada con algunas modificaciones. Se prepararon cuatro (4) soluciones con diferencias en sus componentes y se escogió la que obtuvo el mayor porcentaje con respecto a las muestras positivas. De las muestras analizadas, el 54% fueron positivas con la solución 1, siendo esta la de mejor porcentaje de recuperación de *Blastocystis sp.* en el medio. Este parásito creció en las dos atmósferas de incubación, siendo en anaerobiosis donde mayor cantidad de parásitos se obtuvieron en el cultivo a las 24 horas. En conclusión, el medio Boeck y Drbohlav es un buen medio para el aislamiento de *Blastocystis sp.*, ya que a partir del cultivo se puede realizar estudios más exhaustivos acerca de su morfología, subtipos y demás características moleculares.

Palabras clave: *Blastocystis sp.*, medio de cultivo, Medio Boeck y Drbohlav.

ABSTRACT

Blastocystis sp. is a single-cell infectious agent that affects the digestive tract of humans and different animal species, which despite having been discovered about 100 years ago and being the most widely identified intestinal parasite worldwide, maintains many unknown in the scientific community regarding its morphology, genetic structure, life cycle, diagnosis and treatment. Microscopic identification can be complicated by the variety of morphological forms in which the parasite appears in fecal matter. The expertise of the laboratory professional, the technical quality of the microscope, and the dyes are critical elements for their correct identification. However, cultures are the best option for their detection because they provide high parasitic load, and enough DNA for molecular identification. The aim of this research is to establish a culture for the diagnostic of *Blastocystis* sp in patients from the city of Montería. Boeck and Drbohlav's means of isolation of the parasite was proposed. This consists of a solid egg-based base and a supernatant phase or Locke's solution, prepared with some modifications. Four solutions were prepared with differences in their components and the one with the highest percentage of positive samples was chosen. Of the samples analyzed, 54% were positive with solution 1, being this the best recovery percentage of *Blastocystis* spp in the medium. This parasite grew in the two incubation atmospheres, being in anaerobiosis where more parasites were obtained in the culture at 24 hours. in conclusion, the medium Boeck and Drbohlav is a good means for the isolation of *Blastocystis* sp, since from the culture more exhaustive studies can be made about its morphology, subtypes and other molecular characteristics

Keywords: *Blastocystis* sp, culture medium, boeck and drbohlav médium.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCCIÓN | 15 |
| 1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE..... | 19 |
| 1.1 Historia | 19 |
| 1.2 Morfología..... | 20 |
| 1.2.1 Forma vacuolar | 21 |
| 1.2.2 Forma ameboide | 22 |
| 1.2.3 Forma granular | 23 |
| 1.2.4 Forma quística | 23 |
| 1.2.5 Forma multivacuolar y avacuolar..... | 24 |
| 1.3 Ciclo de vida..... | 25 |
| 1.4 Manifestaciones clínicas..... | 27 |
| 1.5 Diagnóstico de laboratorio | 27 |
| 1.6 Tratamiento | 29 |
| 2. OBJETIVOS | 31 |
| 2.1 Objetivo general | 31 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 31 |
| 3. METODOLOGÍA | 32 |
| 3.1 Caracterización de la población en estudio | 32 |
| 3.2 Estandarización del aislamiento de <i>Blastocystis sp</i> en el medio Boeck y Drbohlav.. | 32 |
| 3.3 Análisis de los datos | 34 |
| 3.4 Consideraciones éticas..... | 34 |
| 4. RESULTADOS..... | 35 |
| 4.1 Descripción de la población | 35 |
| 4.2 Estandarización del aislamiento de <i>Blastocystis sp</i> en el medio Boeck y Drbohlav. | 37 |
| 4.3 Viabilidad de <i>Blastocystis sp</i> | 38 |
| 4.4 Cultivo de <i>Blastocystis sp</i> | 39 |
| 5. DISCUSIÓN | 40 |

| | |
|--------------------------|----|
| 6. CONCLUSIONES | 44 |
| 7. RECOMENDACIONES | 45 |
| 8. REFERENCIAS | 46 |
| ANEXOS | 53 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variantes morfológicas de *Blastocystis sp* observadas en heces de pacientes infectados

Figura 2. Formas vacuolares de *Blastocystis sp*

Figura 3. Forma ameboide de *Blastocystis sp*

Figura 4. Forma granular de *Blastocystis sp*

Figura 5. Quistes de *Blastocystis sp*.

Figura 6. Formas multivacuolares de *Blastocystis sp*

Figura 7. Ciclo de vida de *Blastocystis sp*

Figura 8. *Blastocystis sp* en repique en el medio Boeck y Drbohlav a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo. 40X

Figura 9. *Blastocystis sp* en repique a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X.

Figura 10. *Blastocystis sp* en repique a las 72 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Soluciones de Locke con diferente composición

Tabla 2. Caracterización de las muestras positivas.

Tabla 3. Caracterización de las muestras negativas.

Tabla 4. Muestras positivas de *Blastocystis sp* en el medio Boeck y Drbohlav con diferentes tiempos y atmósferas de incubación.

Tabla5. Solución de Locke para cultivo de *Blastocystis sp*

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Lugar de procedencia de los pacientes implicados en el estudio.

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Protocolo para cultivo de *Blastocystis sp.*

Anexo B. Consentimiento informado proyecto *Blastocystis sp.*

Anexo C. Preparación del medio de cultivo Boeck y Drbohlav.

Anexo D. Base de huevo antes de coagularse.

Anexo E. Base de huevo después de coagularse.

Anexo F. Base de huevo después de coagularse.

Anexo G. Medio Boeck y Drbohlav listo para inocularse.

Anexo H. Medio de Boeck y Drbohlav inoculado

Anexo I. *Blastocystis sp* a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X

Anexo J. Formas granulares de *Blastocystis sp* a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X.

Anexo K. Forma quística de *Blastocystis sp* a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X.

Anexo L. Formas granulares de *Blastocystis sp* en reproducción a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X.

Anexo M. Formas granulares de *Blastocystis sp* a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X.

Anexo N. Forma vacuolar y quística de *Blastocystis sp* a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X

Anexo O. Reproducción de *Blastocystis sp* a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos están ampliamente representados en el tracto digestivo de los humanos. Algunas especies son beneficiosas otras perjudiciales, pero todas tienen en común su gran habilidad para adaptarse a las condiciones ecológicas del entorno en que viven. Dentro de esos microorganismos los parásitos son particularmente frecuentes. Las infecciones parasitarias son altamente prevalentes en todo el planeta, sin embargo, se conoce que son más comunes en poblaciones económicamente menos favorecidas que habitan en regiones tropicales y subtropicales(1).

Entre las enfermedades infecciosas las producidas por parásitos constituyen importantes problemas de salud, muchos son agentes patógenos frecuentes en todo el mundo y se encuentran entre las causas de morbilidad y mortalidad en regiones de África, Asia, América Central y América del Sur. Estas enfermedades parasitarias intestinales constituyen una de las infecciones más comunes a nivel mundial y de mayor prevalencia en las comunidades empobrecidas de los países en desarrollo(2).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que existen actualmente 2.000 millones de habitantes en el mundo portadores de estas infecciones producidas por parásitos. Éstas, son un problema serio en la salud pública, debido a que suelen causar anemia por deficiencia de hierro, malabsorción de nutrientes y diarrea, entre las principales afecciones. Frecuentemente, la elevada prevalencia de parasitosis, está relacionada con la contaminación fecal del agua de consumo y suelo, o de los alimentos unida a deficientes condiciones sanitarias.(2).

Blastocystis sp. es un agente infeccioso unicelular que afecta el aparato digestivo de los humanos y diferentes especies de animales que, a pesar de haber sido descubierto hace alrededor de 100 años y ser el parásito intestinal mayormente identificado en todo el planeta, mantiene muchas incógnitas en la comunidad científica referente a su morfología, estructura genética, ciclo de vida, diagnóstico y tratamiento(3).

Blastocystis sp es un organismo, cuya taxonomía, ciclo biológico y forma de transmisión ha generado polémica. Han sido descritas una variedad de formas por microscopía óptica (MO) y microscopía electrónica de transmisión (MET) y las características de las formas reportadas como quistes en MET no son uniformes. El conocimiento de todas las variantes morfológicas es indispensable para la identificación y para los estudios biológicos. *Blastocystis sp* es polimórfico y hasta hace pocos años se pensaba que solo presentaba formas vegetativas, las cuales eran nombradas de acuerdo a su aspecto morfológico, como forma con cuerpo central (FCC), forma granulosa (FGra) y forma ameboides(4).

Blastocystis sp también es catalogado como un protozoo de distribución cosmopolita, se asocia a zonas tropicales y subtropicales y más frecuentemente en países en vía de desarrollo, teniendo como foco de infección el consumo de alimentos y aguas contaminadas con heces(5). Este parásito se encuentra en frecuencias similares en pacientes asintomáticos y sintomáticos, con una gran prevalencia entre los pacientes sintomáticos que están ubicados en viviendas con mal saneamiento ambiental y los rangos de prevalencia van desde un 30-50% en países de desarrollo y 1, 5-10% en países desarrollados. Aunque en algunos estudios indican baja prevalencia en el antiguo continente, datos epidemiológicos han demostrado que esta tendencia no se mantiene en países como Indonesia (60%), Filipinas (40,7%) y Egipto (33%) (6).

Este protozoo se puede encontrar en personas inmunocompetentes, con manifestaciones clínicas, fenómeno atribuido a los diferentes subtipos. Estudios realizados muestran que inmigrantes, refugiados, niños y adultos mayores están propensos a padecer blastocitosis(6). En Latinoamérica, se ha evidenciado *Blastocystis sp* con una frecuencia de 61,6% en pacientes adultos sintomáticos, a diferencia de los asintomáticos en los que se encontró un 41,6%. En Perú un estudio en niños de 5 a 13 años demostró su presencia en 92,3% de los participantes con sintomatología digestiva; además se ha identificado como agente causal en un 51,6% en poblaciones indígenas infantiles. Un estudio realizado en Venezuela se encontró que el 95,7% de la población está parasitada, con predominio del protozoo *Blastocystis sp.*, con un porcentaje cercano al 66,7%(7).

Lo anterior posiblemente por las condiciones socio-demográficas de la población en el estudio, lo que no les resta importancia a los datos. En Colombia la prevalencia fluctúa de 0,8 a 88% en diferentes poblaciones(8). En Córdoba, la prevalencia de *Blastocystis sp* en niños menores de 5 años es del 7%, en un estudio realizado por el Instituto Colombiano De Bienestar Familiar entre los años 2010 y 2014(9). Es importante resaltar un estudio realizado en la ciudad de Bogotá, con pacientes infectados con VIH y presentando un cuadro diarreico agudo, se reportó como parásito oportunista más frecuente *Blastocystis sp*, con prevalencia de 25,2%, seguido por *Entamoeba histolytica* con un 13%. La blastocitosis también se ha relacionado con la diarrea del viajero, pues el 15,6% de estos pacientes tenían sintomatología digestiva y presencia del parásito(10).

La búsqueda del parásito se hace por examen coprológico: directo, concentraciones, preparaciones coloreadas con hematoxilina o tricrómica, y cultivo. Sin embargo en un laboratorio de diagnóstico clínico estándar aunque las tinciones son el estándar de oro para el diagnóstico de parásitos entéricos se ha demostrado que más del 50% de las infecciones por *Blastocystis sp* no logran ser identificadas. La baja sensibilidad de estos métodos puede ser el resultado de un bajo número de parásitos en las muestras; por lo tanto, no son detectados por el procedimiento de tinción.

El uso de cultivos axénicos, en los que *Blastocystis sp* se produce in vitro, ha demostrado ser más sensible en su detección, pero no es comúnmente utilizado en el laboratorio de diagnóstico(11). *Blastocystis sp* pueden obtenerse de cultivos bifásicos o monofásicos, entre los medios idóneos para este enteropatógeno está el medio bifásico de Boeck-Drbohlav (MBDM), que contiene una fase líquida constituida por una solución tamponada y suero inactivado (bovino, caballo, conejo o humano)(12). El cultivo también es el paso inicial para lograr cantidades adecuadas del parásito puro para realizar estudios bioquímicos y moleculares. Por otro lado, el cultivo puede resultar una herramienta útil para realizar los controles posttratamiento como han sugerido otros autores. Aunque el examen directo es la técnica más idónea para el diagnóstico, cuando el paciente recibe tratamiento el número de formas vacuolares tiende a disminuir y a aumentar las formas quísticas, lo que determina que el examen directo vaya perdiendo eficacia y el cultivo

tiende a mejorar su rendimiento en los controles de cura posteriores(13). Las mayores tasas de detección observadas en los cultivos puede atribuirse al organismo que necesita más tiempo para crecer y replicar(11).

La axenización es necesaria para realizar estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares del parásito que, aunque no se realizan en nuestro medio, son fundamentales para establecer la verdadera relevancia clínica del parásito una vez que se ha demostrado actualmente que hay genotipos que son más prevalentes que otros y lo más importante, existe además de diversidad genética, variabilidad en la patogenicidad de los genotipos(14). Por lo tanto, se quiere reforzar más los conocimientos acerca de *Blastocystis sp*, y por medio de las técnicas de microscopia y diferentes medios de cultivo, enfatizar cuál de los medios de cultivo se puede recuperar mejor el parasito y corroborarlo con la microscopia. A partir de esta investigación, se desea que se tome el cultivo como otro método diagnóstico para identificar *Blastocystis sp* en muestras de materia fecal, con fines epidemiológicos y de investigación.

1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

1.1 Historia

La primera descripción cumpliendo criterios de nomenclatura fue hecha por Alexeieff en 1911 llamándolo “*Blastocystis enterocola*”, una levadura, aplicando la misma nomenclatura para designar organismos observados en heces de roedores, serpientes, pulgas y cucarachas. En 1912, Brumpt estudiando solo material humano presentó una breve descripción del germen al que llamó “*Blastocystis hominis*”, presentándolo como una levadura intestinal inocua importante por su posibilidad de ser confundida con *Entamoeba histolytica*. Dicha descripción y el término acuñado en ésta ganaron prestancia rápidamente, siendo reconocido este nombre en la literatura hasta fecha reciente(15).

Luego de varios reportes del microorganismo en heces humanas durante las primeras décadas del siglo XX, sugiriendo patogenicidad especialmente en regiones tropicales, poco fue publicado hasta 1967, en que el trabajo de Zierdt (16) renovó el interés por el parásito presentando evidencia para clasificar a “*Blastocystis hominis*” como un protozooario (sub clasificación del reino protista que incluye a la mayoría de parásitos humanos, amebas, flagelados, ciliados entre otros)(16).

Posteriormente, *Blastocystis sp* fue objeto de múltiples estudios ultraestructurales, clínicos y terapéuticos además de una serie de reportes de casos donde se le adjudica un rol patogénico; sin embargo, estudios sugiriendo lo contrario también han sido publicados, persistiendo la controversia. A su vez “*Blastocystis hominis*” sufrió múltiples “reclasificaciones” dentro del subreino de los protozoarios, emparentándolo con las amebas, sin embargo Silberman (17) utilizando secuencias del ARN ribosómico de *Blastocystis sp* lo ubica dentro del reino cromista o stramenopila un grupo de diversos organismos que incluye las algas marrones y diatomeas. Dentro del sistema de clasificación de seis reinos (Monera, Protista, Cromista, Fungi, Plantae y Animalia) *Blastocystis sp* no es considerado un protozooario (Protista) sino es ubicado en el reino Cromista, posición mantenida hasta la

actualidad. En los últimos años, varios estudios fueron realizados basados en el análisis genético de *Blastocystis sp*, mostrando diferentes subtipos de difícil comparación, logrando posteriormente la uniformidad de la nomenclatura, describiendo 9 subtipos, lo que se plasmó en una reciente publicación de consenso (18).

Actualmente se cree que la gran variabilidad genética de *Blastocystis sp* sería causante de la disparidad de resultados en investigaciones respecto de su rol patógeno; como resultado, la búsqueda de relación entre manifestaciones clínicas y los subtipos de *Blastocystis sp* se ha convertido en una de las principales líneas de investigación en parasitología (18).

1.2 Morfología

Blastocystis sp por lo general tiene forma esférica, un tamaño que oscila entre 4 μ y 20 μ , en algunos casos hasta 40 μ . Está provisto de una gran vacuola retráctil dentro de una delgada capa de citoplasma, posee varios núcleos periféricos, mitocondria, aparato de Golgi y un retículo endoplasmático propio de los protozoos. Al microscopio electrónico se ven mejor definidos los núcleos. En algunos casos se observan formas granulares, colapsadas, ameboides o quistes(8).

Este parásito presenta tres formas morfológicas diferentes para su diagnóstico en materia fecal que en forma clásica se han dividido en: forma vacuolar, forma ameboide, forma quística y forma granulosa (figura 1)(19).

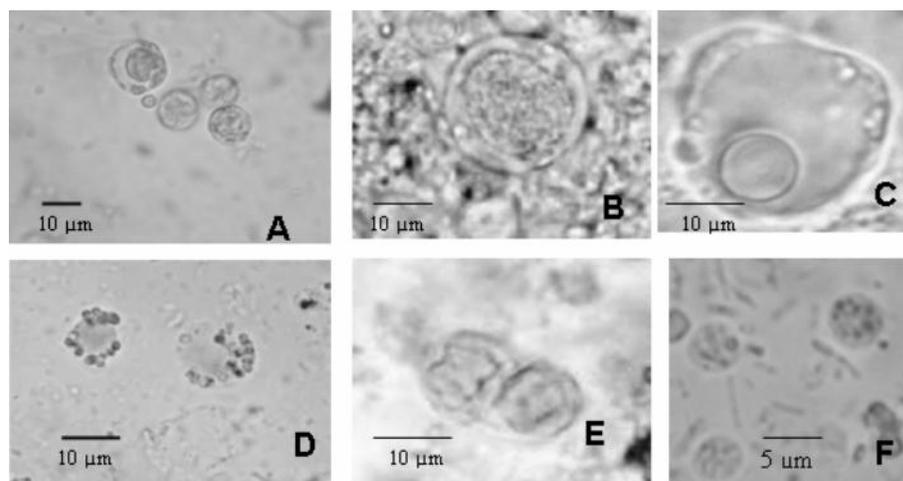


Figura 1. Variantes morfológicas de *Blastocystis sp* observadas en heces de pacientes infectados. A. forma vacuolar. B. forma granulosa. C. forma ameboide. D. formas globulosas. E. Fisión binaria. F. formas quísticas. Fuente: Guzmán *et al.*, 2008

1.2.1 Forma vacuolar

La forma vacuolar se caracteriza por tener una gran vacuola central que ocupa aproximadamente el 90% del volumen de la célula (figura 1 a y 2). Esto relega el citoplasma y orgánulos a un borde periférico delgado, que a veces puede ser difícil de visualizar bajo microscopía de luz. Los núcleos y los organelos similares a las mitocondrias están usualmente situados dentro de regiones citoplásmicas en extremos opuestos de la célula. La vacuola central puede aparecer vacía o puede contener material fino a floculante. La vacuola también se ha sugerido que desempeñan un papel en la reproducción de esquizogonías proporcionando un entorno para el desarrollo de la progenie diminuta de los parásitos. Los contenidos citoplasmáticos, que a menudo contienen organelos, pueden invaginar y depositar filamentos o vesículas en la membrana vacuola central. Las características observables por microscopía electrónica de transmisión (TEM) incluyen uno o más núcleos, un aparato de Golgi, un endosoma, como las vacuolas, los microtúbulos y los organelos similares a las mitocondrias (20).

El organismo está a menudo rodeado por una capa de superficie (figura 1 a) veces denominada capa fibrilar o cápsula, de diversos grosores. La capa superficial suele ser más gruesa en los parásitos recién aislados de las heces y se diluyen gradualmente durante el cultivo prolongado en laboratorio, y se han observado células sin capas superficiales en cultivo *in vitro* (20). La razón de este adelgazamiento es desconocida, pero puede deberse al papel postulado de la capa en la captura de bacterias para fines nutricionales, lo que no es posible durante el cultivo axénico, o puede ser innecesario si los nutrientes proporcionados por el cultivo en el laboratorio son suficientes para el crecimiento. La capa superficial contiene una variedad de carbohidratos y ha sido postulado para desempeñar un papel en la captura y degradación nutricional, protección contra choque osmótico, o para proporcionar una barrera mecánica para proteínas de la membrana plasmática del sistema inmunológico (21).

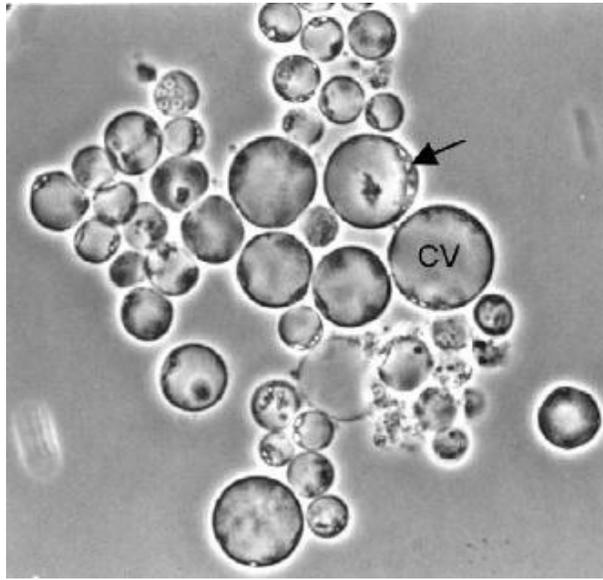


Figura 2. Formas vacuolares de *Blastocystis sp* Fuente: Tan, Kevin. 2004.

1.2.2 Forma ameboide

Muestra una morfología irregular (figura 3) con 1 ó 2 pseudópodos que estarían involucrados más en la fagocitosis de bacterias que en la motilidad del organismo. Esta forma ha sido raramente informada en heces diarreicas(22). La forma ameboide de *Blastocystis sp* rara vez ha sido reportada, y hay una serie de informes contradictorios sobre su morfología. Dunn *et al.*(20) proporcionó una descripción detallada de la forma ameboide de *Blastocystis sp* en el material de cultivo. Las células tenían 2,6 a 7,8 mm de diámetro, eran irregulares en forma, y a menudo tenían pseudópodos extendidos. Las células mostraron pocas características morfológicas adicionales vistas en las otras formas de *Blastocystis sp*. Los organismos fueron descritos como irregulares y lobulados en el contorno, con pseudópodos que se extienden desde la célula(15).



Figura 3. Forma ameboide de *Blastocystis sp.* Fuente: Abaza *et al.*, 2017

1.2.3 Forma granular

Esta forma mide entre 6 y 8 μ , posee 1 a 4 núcleos y presenta gran cantidad de gránulos en el citoplasma y dentro de la vacuola. Estas granulaciones tienen varias funciones en la célula y se clasifican en 3 grupos funcionales: metabólicos, reproductivos y lipídicos. Diversos autores han sugerido que la forma granular podría surgir de la forma vacuolar ante determinados estímulos en el cultivo *in vitro*, como la concentración de suero fetal o la adición de ciertos antibióticos (figura 4)(23).



Figura 4. Formas granulares de *Blastocystis sp.* Fuente: Abaza *et al.*, 2017

1.2.4 Forma quística

La forma de quiste (Fig. 1A y 5) es la más reciente forma del parásito y el descubrimiento tardío se debe a su pequeño tamaño (2 a 5 μ) lo que puede resultar en confusión con los desechos fecales y la observación de que los quistes son poco frecuentes en el laboratorio. Los quistes son variables en pero son en su mayoría ovoides o esféricos, están protegidos por una pared de quistes multicapa (figura 4), que puede o no ser cubierta por una capa superficial suelta. El citoplasma del quiste puede contener de uno a cuatro núcleos,

mitocondrias, glucógeno, depósitos y vacuolas pequeñas. En una investigación encontraron la presencia de grandes quistes multinucleados de las heces de monos *Macacccus*, que eran de 15 μ de tamaño, y esto fue sugerido como un indicador de las diferencias entre *Blastocystis sp.* Los quistes de *Blastocystis sp* supuestamente pueden sobrevivir en agua hasta 19 días a una temperatura normal pero son frágiles a temperaturas extremas y en desinfección común(21).

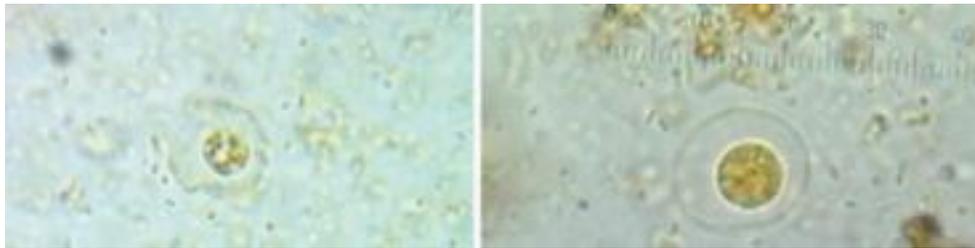


Figura 5. Quistes de *Blastocystis sp.* Fuente: Abaza *et al.*, 2017

1.2.5 Forma multivacuolar y avacuolar

Se han descrito otras formas morfológicas de *Blastocystis sp.* Las formas multivacuolares y avacuolares. Estas formas reportadas de estudios en microscopia electrónica de muestras de heces frescas fueron significativamente menor (5 a 8 μ m) que las formas de cultivo y se sugirieron para ser la forma que ocurre in vivo. Sin embargo, otros autores observaron formas vacuolares típicas de muestras fecales frescas. La vacuola central estaba ausente en la forma avacuolar, mientras que el multivacuolar contenían múltiples vacuolas pequeñas(24). El pequeño tamaño y una morfología multivacuolar o avacuolar distinta puede deberse a variaciones de deformación, o son posiblemente células en diversas etapas de enquistamiento con morfologías similares, según información descrita en los estudios de microscopia electrónica(15).

El tamaño y la morfología podrían deberse a variaciones en las cepas o constituir distintos estados de enquistamiento o desenquistamiento parasitario (ver figura 6) (23).

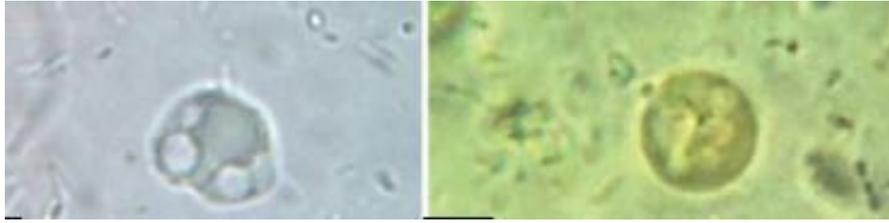


Figura 6. Formas multivacuolares de *Blastocystis sp.* Fuente: Abaza *et al.*, 2017

1.3 Ciclo de vida

La infección humana se adquiere por contaminación fecal a partir de otras personas o reservorios. La forma infectante no está claramente definida, pero lo más aceptado es que está constituida por quistes de pared dura. Este parásito se localiza en el colon donde se han descrito cuatro formas de reproducción asexual: división binaria; plasmotomía que consiste en la formación de varios núcleos, que dan origen a varios organismos; endodiogenia en la que una célula madre da origen a 2 hijas, antes de que se divida el parásito; y la esquizogonia, que es la formación de gran cantidad de células hijas que forman un esquizonte. De estas formas de reproducción, la más frecuente y aceptada, es la división binaria(8).

El parásito tiene 2 tipos de quistes que salen en la materia fecal, uno con cubierta fibrilar externa y el otro sin ella, la primera se forma a medida que el quiste madura. Algunos estudios indican que los quistes sin la cubierta externa salen con mayor frecuencia en la materia fecal(8).

En 2008 Tan(21), propone un ciclo de vida de *Blastocystis* en el cual el hombre se infecta tras la ingestión de los quistes, los cuales desarrollan en el intestino la forma vacuolar, y esa forma vacuolar se divide por fisión binaria y se puede transformar en las formas ameboide o granular. Luego, al transitar por el intestino ocurre la enquistación y los quistes son excretados en las heces(25).

Pequeñas modificaciones posteriores han surgido tras la aparición de evidencia de la presencia de *Blastocystis sp* en algunos animales como aves, ratas, cerdos, cucarachas,

entre otros. En relación a ello se plantea que el hombre podría ser el reservorio en algún momento y en otros algunos animales actuarían como reservorio(26). Se plantea además que aunque el modo de transmisión no ha sido determinado de manera definitiva, es posible que ocurra por vía fecal – oral (Por ejemplo a través del consumo de agua o alimentos, manipuladores de los mismos e incluso vectores mecánicos como moscas, con lo cual se ha relacionado a condiciones sanitarias deficientes, consumo de alimentos o agua contaminados y contacto animal cercano(27) (ver figura 7).

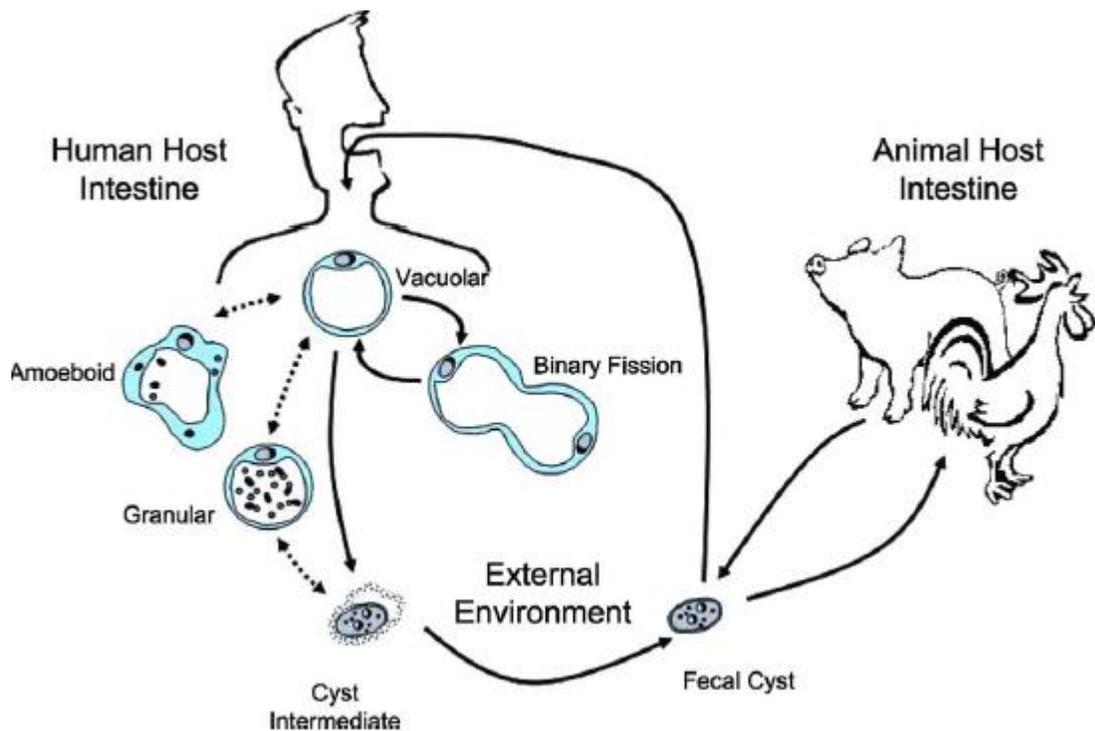


Figura 7. Ciclo de vida de *Blastocystis sp.* Fuente: Tan,K. 2004

En 2007 se propone la estandarización de la terminología para *Blastocystis*, sugiriendo el grupo de expertos, que se deje atrás la denominación de *Blastocystis hominis*, y se designe como *Blastocystis sp.*, seguido por el subtipo. Hasta el presente se han identificado 17 subtipos, de los cuales 9 pueden colonizar al hombre. En los seres humanos, el subtipo 3 (ST3) parece ser el subtipo más común, seguido de la prevalencia por subtipo 1 (ST1), subtipo 2 (ST2) y subtipo 4 (ST4)(27).

1.4 Manifestaciones clínicas

Cuando este protozoo genera manifestaciones clínicas se presenta como una diarrea con dolor abdominal, mareo, anorexia, náuseas, vómito, meteorismo intestinal y pérdida de peso (28). *Blastocystis sp* puede aislarse de individuos con enfermedad gastrointestinal y síntomas extra-intestinales (por ejemplo, náusea, dolor abdominal, hinchazón, vómito o anorexia) asintomáticos con una prevalencia casi igual. Ocasionalmente, una mayor prevalencia pueden encontrarse en asintomáticos que en individuos sintomáticos. Muchos investigadores clasifican a *Blastocystis sp* como comensal u oportunista patógeno, mientras que otros informan encontrar *Blastocystis sp* más comúnmente en las heces de los pacientes sintomáticos que de pacientes asintomáticos(29).

Los informes de casos han vinculado *Blastocystis sp* con varias enfermedades gastrointestinales como los ya mencionados, además de colitis, proctosigmoiditis hemorrágica, abdomen agudo en niños, hipoalbuminemia, urticaria crónica, Artritis infecciosa y prurito palmo plantar. Algunos estudios se centran en el papel potencial de *Blastocystis sp* en el síndrome del intestino irritable(29). Claramente, aunque hay una abundancia de información identificando la naturaleza comensal u oportunista de *Blastocystis sp*, También hay una profusión de información que indica la asociación entre la infección por *Blastocystis sp* y una variedad de síntomas gastrointestinales y extra-intestinales(29).

1.5 Diagnóstico de laboratorio

Las técnicas usadas para su identificación son el exámen en fresco, concentración con formol-éter, la tinción permanente (hematoxilina férrica o tricrómica) tinta china modificada y el cultivo axénico *in vitro*, presentándose una sensibilidad mayor para el cultivo con respecto a la microscopía y menor para la concentración en formol-éter. La coloración tricrómica muestra mejores resultados que el examen directo de materia fecal, pero algunos autores consideran el cultivo como el estándar de oro para el diagnóstico de la blastocistosis. Sin embargo, para otros investigadores, el estándar de oro son las técnicas

moleculares. Esta disparidad de métodos y resultados ha llevado a que se considere que los estudios sobre la patogenicidad de y la eficacia del tratamiento contra *Blastocystis sp* se deban tomar con precaución pues no se emplearon en muchos casos las técnicas más sensibles para determinar la presencia (portador) o ausencia (no portador) del parásito(30).

El frotis fecal directo es uno de los métodos más utilizados para la detección de *Blastocystis sp*, porque toma menos tiempo y recursos en comparación con otros métodos. Sin embargo, el diagnóstico basado en la morfología tiene varias desventajas, incluido el desafío planteado por la diversidad en formas celulares de *Blastocystis sp*. Las manchas pueden a menudo asociar erróneamente las etapas vegetativas del parásito como glóbulos lipídicos u otros contaminantes(31)

Aunque el cultivo puede emplearse para el diagnóstico de varias especies parasitarias, en especial de protozoarios, éste no siempre forma parte de la rutina diagnóstica debido a que hay otras técnicas más sencillas, rápidas y de igual o mayor rendimiento diagnóstico(13). Por otro lado, para realizar los controles postratamiento se requiere de una técnica diagnóstica específica, donde el cultivo del parásito ha demostrado ser el más efectivo. Actualmente la mayoría de los estudios bioquímicos sobre *Blastocystis sp* han sido realizados en células procedentes de cultivos. Todo lo anterior justifica la necesidad de contar con un método de cultivo confiable y estandarizado para el diagnóstico, aislamiento y mantenimiento del parásito(13). Este cultivo puede ser de tipo xénico o axénico. El medio de Boeck-Drbohlav o su modificación (llamada LE por Locke-egg) es uno de los más empleados para el cultivo axénico de *Blastocystis sp*. Inicialmente se usó para el diagnóstico de amibas hasta que Zierdt *et al* (16) lo utilizaron por primera vez, en 1967, para el diagnóstico y aislamiento de *Blastocystis sp*, mostrando resultados satisfactorios(32)(33).

El cultivo axénico de protozoarios es ampliamente empleado en el estudio de la biología, epidemiología, protocolos de infectividad o de fuentes de estadios parasitarios útiles en el desarrollo de técnicas inmunodiagnósticas(34)

El cultivo in vitro de *Blastocystis sp* es considerado un método que aumenta la sensibilidad de la detección en relación al método directo, rutinariamente aplicado en la mayoría de los laboratorios. Sugiriendo que puede ser empleado en estudios posteriores (epidemiología molecular, caracterización de antígenos para inmunodiagnóstico o estudios de la biología y pruebas con fármacos)(34). El cultivo es ventajoso para la detección de *Blastocystis sp* porque aumenta la cantidad de células que están inicialmente presentes en las heces, por lo tanto disminuye significativamente el tiempo de detección y permite tener éxito en los ensayos a realizar, que pueden involucrar análisis molecular. Sin embargo, hay varios factores que pueden afectar la detección de *Blastocystis sp* a través del método de cultivo(31). Estos factores pueden ser el subtipo implicado, ya que algunos son más difícil de cultivar, adaptación al medio artificial, entre otras (13). Las diferencias en la composición entre el medio adecuado para *Blastocystis sp*, y los protocolos aplicados para su cultivo, pueden contribuir a la variación en la sensibilidad y especificidad en dicha técnica.(31).

Debido a la importancia que ha cobrado el *Blastocystis sp* como patógeno emergente, se están desarrollando distintas líneas de investigación, donde se requiere disponer de un gran número de estos microorganismos, ya sea para el desarrollo de modelos de infección experimental, preparación de antígenos para pruebas inmunodiagnósticas y elaboración de vacunas, así como para el desarrollo de pruebas moleculares de diagnóstico y genotipificación(10). Por lo tanto, implementar el medio Boeck y Dbohlav para el cultivo de *Blastocystis spp* es el paso inicial para lograr grandes cantidades de carga parasitaria pura para realizar estudios epidemiológicos, bioquímicos y moleculares (13). Así mismo, es un medio que por su bajo costo es accesible.

1.6 Tratamiento

Los pacientes asintomáticos con *Blastocystis sp* no requieren tratamiento. En casos sintomáticos es necesario descartar la presencia de otros agentes patógenos y cuando esta búsqueda es negativa, se justifica administrar tratamiento, siempre que la cantidad de

Blastocystis sp sea abundante. Debe considerarse que la sintomatología asociada a la infección por *Blastocystis sp* es autolimitada, lo cual hace difícil valorar la eficacia de los tratamientos. Cuando se decide administrar tratamiento se utiliza 5-nitroimidazoles que son los medicamentos más utilizados, principalmente el metronidazol(8), cuando estos no son eficaces, se puede utilizar: Trimetoprim- Sulfametoxazol y Nitazoxanida (8). El metronidazol se considera de primera línea de tratamiento, pero el éxito de la erradicación de *Blastocystis sp* se ha informado que este fármaco es de 0% a 100%. Es posible que el metronidazol sea efectivo para ciertos pacientes pero no proporciona una erradicación completa, especialmente en aquellos con infección grave, o que los pacientes que no respondieron pudieron haber sido infectados con subtipos resistentes(35).

TMP-SMX (Trimetoprim sulfametoxazol) se ha utilizado como agente de segunda línea en pacientes que son alérgicos o que no toleraron el tratamiento con metronidazol (35). Una de las dificultades en la evaluación de la eficacia terapéutica es la tremenda variabilidad seguimiento postratamiento de pacientes tratados por infección por *Blastocystis sp*. El análisis microbiológico postratamiento mostrando las deposiciones positivas a *Blastocystis sp* puede no reflejar el fracaso del tratamiento pero podría representar la reinfección. Los pacientes también pueden tener un proceso secundario que respondió inicialmente al tratamiento con fracaso posterior del tratamiento que pueden no ser capaces de tolerar o no responder al tratamiento con metronidazol (35). Los agentes adicionales, tales como yodoquinol, tinidazol, nitazoxanida,emetina, pentamidina, yodo clorhidroxiquina y furazolidona, han sido utilizados y han demostrado una eficacia variable en erradicar la infección por *Blastocystis sp*(36).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Establecer un cultivo para la detección de *Blastocystis sp* en pacientes de la ciudad de Montería.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a la población de estudio en términos de persona, tiempo y lugar.
- Estandarizar la técnica de cultivo del medio de Boeck y Drbohlav para *Blastocystis spp*.
- Cultivar *Blastocystis spp*, a partir de las muestras de materia fecal analizadas.

3. METODOLOGÍA

Se llevó a cabo un estudio descriptivo de corte transversal que se realizó durante 12 meses en la ciudad de Montería, localizada en el departamento de Córdoba, al noreste de Colombia, a 8° 45' de latitud norte y 75° 53' de longitud oeste; con una altitud de 18 m.s.n.m, temperatura promedio de 28°C, precipitación media anual de 1.156 mm y una población de 500.000 habitantes aproximadamente.

3.1 Caracterización de la población en estudio

La población y muestra de estudio fueron personas que asistieron al Hospital San Jerónimo de Montería a realizarse un exámen coprológico. En total se recolectaron 100 muestras de materia fecal en un periodo de 3 meses. De las cuales 50 fueron positivas para el examen directo, y 10 se tomaron como control negativo del estudio. Para cumplir con los parámetros éticos de confidencialidad, se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los participantes del estudio. Como criterio de inclusión a esta investigación, se tuvo en cuenta la muestras de materia fecal diarreicas o formes con presencia de alguna de las formas morfológicas de *Blastocystis sp.*

Por lo tanto, el criterio de exclusión fue que las materias fecales que al exámen directo no tengan presencia de las diferentes formas morfológicas de *Blastocystis sp.*

Las muestras fueron transportadas con las medidas necesarias para la preservación de los parásitos (en refrigeración a 4°C), al laboratorio de microbiología GIMBIC.

3.2 Estandarización del aislamiento de *Blastocystis sp* en el medio Boeck y Drbohlav.

Se procesaron las muestras utilizando microscopios ópticos, y el cultivo se realizó con el medio de Boeck y Drbohlav. Dichas muestras al llegar al laboratorio, se inocularon en el medio de cultivo. 1 gramo si las heces eran de consistencia sólida, y 0.5 ml si eran de consistencia líquida.

Es un medio formado por una base semisólida de huevo y una capa superficial de solución de Locke modificada, tomado como base el utilizado por Botero y Restrepo(8). Tanto para

el medio semisólido y la solución de Locke, se prepararon 4 soluciones con diferencias en sus componentes (Tabla 1), y se escogió la mejor teniendo en cuenta los resultados de crecimiento de *Blastocystis sp* en cada una de ellas. Así mismo, se incubaron en atmósferas diferentes (anaerobiosis y aerobiosis) para observar el comportamiento del parásito en el medio de cultivo con una temperatura de 37°C.

Tabla 1. Soluciones de Locke con diferente composición.

| Solución | NaCl | CaCl ₂ ·2H ₂ O | KCl | MgCl ₂ ·6H ₂ O | Na ₂ HPO ₄ | NaHCO ₃ | KH ₂ PO ₄ | Glucosa | AD |
|----------|------|--------------------------------------|-----|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------|---------------------------------|---------|---------|
| 1 | 8.0 | 0.2 | 0.2 | 2.0 | 0.1 | 0.4 | 0.3 | NA | 1000 ml |
| 2 | 8.0 | 0.2 | 0.2 | NA | 0.1 | 0.4 | 0.3 | NA | 1000 ml |
| 3 | 9.0 | 0.2 | 0.4 | NA | 2.0 | 0.2 | 0.3 | 2.5 | 1000 ml |
| 4 | 9.0 | 0.2 | 0.4 | NA | 2.0 | 0.2 | 0.3 | NA | 1000 ml |

AD: Agua destilada; NA: No Aplica; NaCl: Cloruro de sodio; CaCl₂·2H₂O: Cloruro de calcio; KCl: Cloruro de potasio; MgCl₂·6H₂O: Cloruro de magnesio; Na₂HPO₄: Fosfato de sodio; NaHCO₃: Bicarbonato de sodio; KH₂PO₄: Fosfato de potasio.

Las sustancias mencionadas se agregaron en su orden al agua destilada; se mezcló cada una hasta disolver completamente; se hirvió durante 10 minutos y se obtuvo un precipitado; se enfrió a temperatura ambiente y se filtró por papel; se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

La base de huevo se preparó de la siguiente manera:

- Se lavaron 2 huevos frescos y se rompen en un balón volumétrico de 1000 ml, que contenga algunas perlas de vidrio.
- Se añadió 50 ml de solución de Locke estéril, sin antibióticos y se emulsionó, agitando.
- Se filtró por gasa y se distribuyó en tubos de ensayo estériles de 15 x125 mm de manera que se llenó el fondo del tubo y se colocó inclinado para que formara bisel.
- Se dejó coagular en horno, controlando el momento en que se gelifica.
- Se esterilizó a 15 libras por 15 minutos.
- Se hizo control de esterilidad incubando por 24 horas a 37°C.
- Al momento de utilizarlo se agregaron de 4 ml de solución de Locke, con antibióticos, como sobrenadante. En este caso se utilizaron Gentamicina y

Penicilina. La técnica de referencia por Botero y Restrepo (8) menciona que por cada 500 ml de solución se le agrega 1 ml de antibiótico. En nuestro caso, para la solución de Locke se envaso en un beacker de 200 ml y se le agregó 400µl de cada antibiótico respectivamente.

Tanto la solución de Locke, como la base semisólida se guardaron a 4°C hasta su uso. En el momento de realizar la siembra, se agregó 30 mg de polvo de arroz estéril. La siembra se hizo en el sobrenadante, colocando 0,5 ml si la muestra es líquida o semilíquida y 1 gramo si es sólida. Los tubos se revisaron microscópicamente a las 24, 48 y 72 horas. Como criterio de positividad del cultivo se tomó el establecido en la investigación realizada por Urbina *et al.*,(37) realizada en el año 2013, la cual consiste en la observación de las diferentes formas morfológicas de *Blastocystis sp* (forma con cuerpo central, forma granular y/o forma ameboide) en cualquiera de los tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas). Así mismo, la presencia de multiplicación del parásito (fisión binaria), también es tomado como criterio positivo para el cultivo(37).

3.3 Análisis de los datos

Los datos fueron almacenados en una base de datos del programa Excel y analizados mediante estadística descriptiva utilizando el programa estadístico R para Windows.

3.4 Consideraciones éticas

Para proceder en la ejecución de dicho estudio se solicitó previamente autorización escrita al coordinador del laboratorio del Hospital San Jerónimo de Montería y autorización a los pacientes y padres de familia de los pacientes menores de 18 años.

4. RESULTADOS

4.1 Descripción de la población

El promedio de edad de la población de estudio fue de 24 años, con un predominio de hombres de 53% (26/50). En cuanto al lugar de procedencia, la mayoría de los pacientes provienen de la ciudad de Montería, como se puede observar en la gráfica 1. Con respecto a las características de las muestras (color y consistencia) se muestran en la siguiente tabla (tabla 2):

Gráfica 1. Lugar de procedencia de pacientes implicados en el estudio.

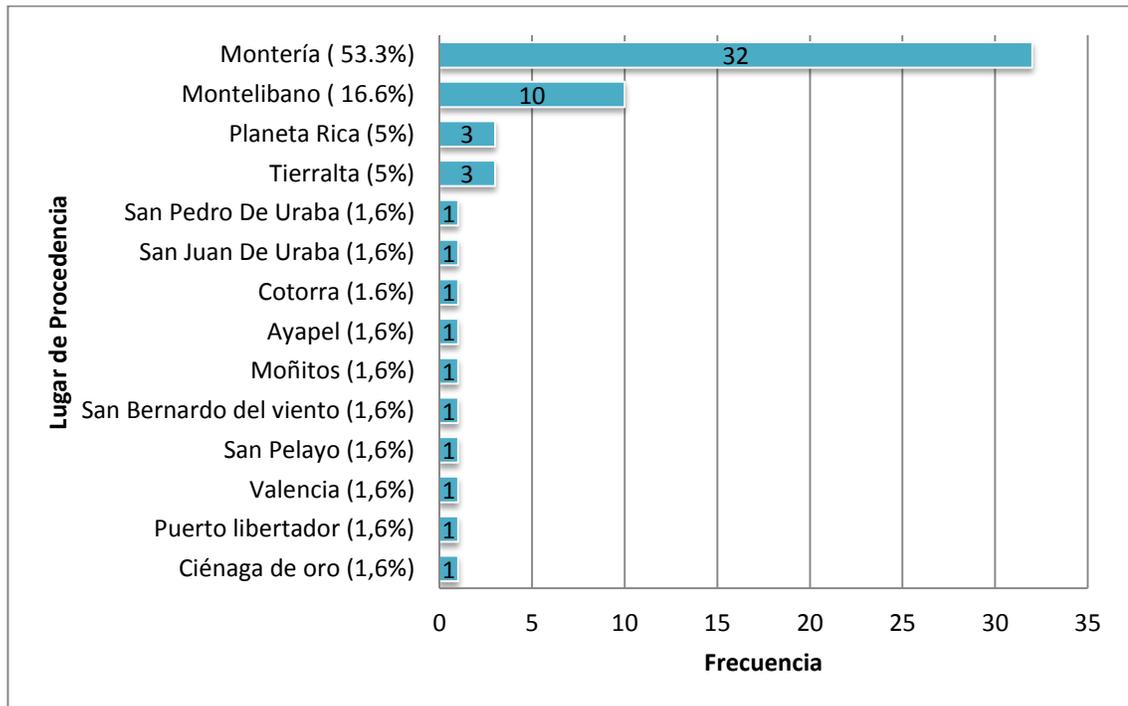


Tabla 2. Caracterización de las muestras positivas.

| Características de las muestras | | Muestras positivas | |
|---------------------------------|-----------|--------------------|-----|
| | | n = 50 | % |
| Color | Amarillo | 22 | 44% |
| | Café | 11 | 22% |
| | Negro | 2 | 4% |
| | Pardo | 10 | 20% |
| | Verde | 5 | 10% |
| Consistencia | Blanda | 42 | 84% |
| | Diarreica | 1 | 2% |
| | Dura | 2 | 4% |
| | Líquida | 5 | 10% |

La población de las muestras negativas (10 /60) que se recolectaron como control negativo de la presente investigación, presentaron una edad promedio de 18 años, con un predominio de hombres de 60% (6/10) Para las características de las muestras (color y consistencia) los datos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Caracterización de las muestras negativas.

| Características de las muestras | | Muestras negativas | |
|---------------------------------|-----------|--------------------|-----|
| | | n = 10 | % |
| Color | Amarillo | 3 | 30% |
| | Café | 3 | 30% |
| | Pardo | 2 | 20% |
| | Verde | 2 | 20% |
| Consistencia | Blanda | 7 | 70% |
| | Diarreica | 1 | 10% |
| | Líquida | 2 | 20% |

A partir de esta tabla se puede inferir, que la consistencia blanda, los colores amarillo con un 30% (3/10) y café con un 3% (3/10) predominan en las muestras negativas al examen directo para *Blastocystis sp.* La de color verde con un 20% (2/10) y consistencia líquida con 20% (2/10) presentaron las menores frecuencias en cuanto a las mencionadas características.

4.2 Estandarización del aislamiento de *Blastocystis sp* en el medio Boeck y Drbohlav.

Se sometieron las muestras positivas a las 4 soluciones de Locke realizadas (tabla 1) en atmósferas de incubación diferentes (anaerobiosis y aerobiosis) con una temperatura de 37°C. Los resultados se explican en la tabla 4.

Tabla 4. Muestras positivas de *Blastocystis sp* en el medio Boeck y Drbohlav con diferentes tiempos y atmósferas de incubación.

| Soluciones | Tiempo (horas) | | | | | | Atmósfera | | | |
|------------|----------------|----|----|----|----|----|------------|----|--------------|----|
| | 24 | | 48 | | 72 | | Aerobiosis | | Anaerobiosis | |
| | + | % | + | % | + | % | + | % | + | % |
| 1 | 27 | 54 | 27 | 54 | 27 | 54 | 0 | 0 | 27 | 54 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 34 | 17 | 34 | 0 | 0 |
| 3 | 3 | 6 | 3 | 6 | 3 | 6 | 0 | 0 | 3 | 6 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

A partir de estos resultados, se puede inferir la solución de Locke 1 con un 54% muestra el mayor porcentaje de recuperación de *Blastocystis sp* en anaerobiosis, mientras que la solución de Locke 2 en aerobiosis tiene un 17%. Por tanto, la solución de Locke 1 muestra mejores resultados de aislamiento de dicho parásito en el medio de Boeck y Drbohlav.

Con respecto a la atmósfera de incubación, en presencia de CO₂, se observó mayor carga parasitaria al momento de observar el cultivo a las 24, 48 y 72 horas respectivamente. Esto se pudo constatar por la presencia de la fase de reproducción del parásito (Fisión binaria).

4.3 Viabilidad de *Blastocystis sp*

Se pudo constatar a través de diferentes tiempos de incubación que *Blastocystis sp* pudo sobrevivir mas de las 72 horas estipuladas en el cultivo. Es decir, pudo sobrevivir 96 horas, y mediante repiques se pudo mantener 2 semanas (15 días aproximadamente) como se puede constatar en las siguientes imágenes.

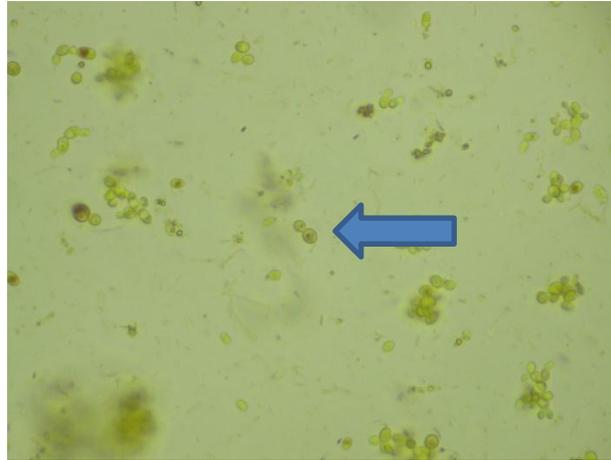


Figura 8. *Blastocystis sp* en repique en el medio Boeck y Drbohlav a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo. 40X Fuente: Autor.

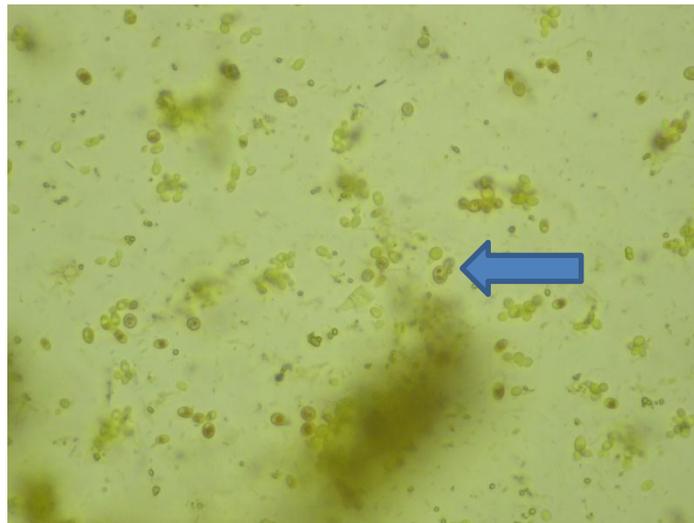


Figura 9. *Blastocystis spp* en repique a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X. Fuente: Autor

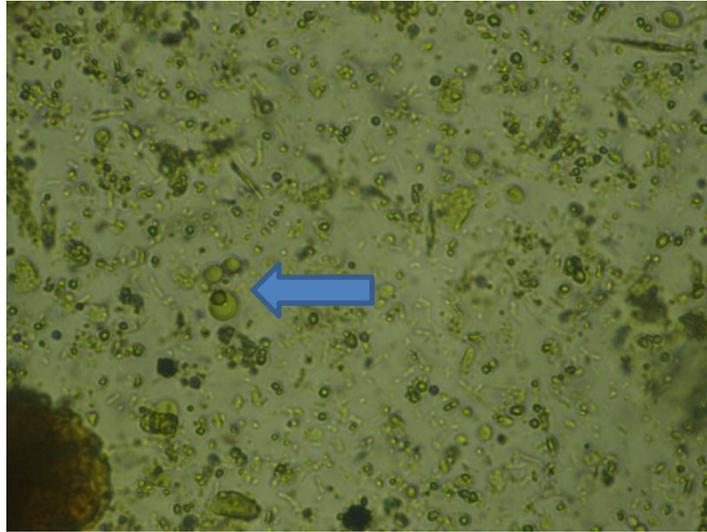


Figura 10. *Blastocystis sp* en repique a las 72 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X.

Fuente: autor.

4.4 Cultivo de *Blastocystis sp*

Se logró elaborar un protocolo de cultivo en donde los principales ajustes están en la concentración de Cloruro de magnesio ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), Fosfato de sodio (Na_2HPO_4) y en la cantidad de huevos (2), lo que permite recuperar el parasito entre 24 y 72 horas (ver anexo A).

5. DISCUSIÓN

La frecuencia más alta de pacientes con *Blastocystis sp* en la ciudad de Montería con un 53%. Aunque es perímetro urbano, no se está exento de infectarse con *Blastocystis sp*. Esto puede deberse a las condiciones socioeconómicas, como lo menciona Lozano *et,al* 2005, además de que exista escasa cobertura de servicios de saneamiento básicos, lo cual son un factor predisponente para la infección por este parásito(12).

La edad promedio de las personas que fueron positivas al examen directo para *Blastocystis sp* fue de 24 años. Las infecciones por este parasito mayormente ocurren en personas jóvenes, con factores de riesgo como el incorrecto lavado de manos, consumo de alimentos y agua contaminados entre otros(38). La prevalencia en adultos ha sido mayor que en niños observados en varios estudios, y los adultos jóvenes parecen tener las tasas más altas de infección, como los observados en las investigaciones realizadas por Boreham (39) y como lo obtenido en este estudio.

Se debe tener en cuenta que los medios de cultivos son necesarios para mejorar el diagnóstico porque la microscopía sola posee una baja sensibilidad cuando se usa como única modalidad de diagnóstico de *Blastocystis sp* (10). A pesar de ser la principal herramienta diagnóstica a nivel mundial, el uso de la microscopía para detectar *Blastocystis sp* tiene una utilidad limitada en los laboratorios de microbiología clínica y en la generación de datos para propósitos clínicos y epidemiológicos: La microscopia de concentrados fecales tiene una sensibilidad muy baja para detectar *Blastocystis sp*, no hay consenso sobre la importancia de los números celulares o las diversas formas morfológicas reportadas y la microscopia no puede distinguir entre organismos con diferencias genéticas(subtipos: STs)(40). Los cultivos axénicos en anaerobiosis aumentan la sensibilidad de la detección parasitaria(22).La insensibilidad de la microscopia de los concentrados fecales probablemente se debe a la desintegración de *Blastocystis sp* durante el procesamiento técnico, pero también se debe tener en cuenta que no hay consenso con respecto a la morfología de la *Blastocystis sp*(41). Los métodos de cultivo son una mejor opción de diagnóstico a partir de muestras de heces fecales frescas porque el exámen directo tiene

debilidad en el diagnóstico de *Blastocystis sp* debido a la diversidad en la morfología y el tamaño, que puede imitar a otros parásitos u organismos o contaminantes(42).

La observación y seguimiento de las diferentes formas de *Blastocystis sp* en los cultivos suministra una información importante que enriquece el conocimiento sobre la biología de este organismo que ha generado tantas controversias. Tiene consecuencias directas en la identificación en las muestras de heces, su correlación con la situación clínica de los hospederos humanos, ciclo evolutivo y estudios de taxonomía(4). En el proceso de comprensión de los aspectos biológicos de *Blastocystis sp* los investigadores han utilizado medios de cultivo in vitro para alcanzar sus objetivos(43). Actualmente, la detección de infección humana con *Blastocystis sp* se basa generalmente en el examen bajo un microscopio de luz de muestras fecales, ya sea directamente, como "frotis simples" o después de alguna forma de concentración. Si el cultivo in vitro a corto plazo aumentaría la sensibilidad de tal detección sigue siendo motivo de controversia(44).

La estandarización del cultivo para el desarrollo de futuros proyectos es de gran importancia, de acuerdo a lo realizado por Ortigoza *et,al* 2011 y Gallegos *et, al* 2013, en donde probaron distintas sales y líquidos como la glucosa y suero humano, pudieron obteniendo excelentes resultados en cuanto a la recuperación del parásito en el medio Boeck y Drbohlav. En esta investigación obtuvieron mejores resultados con el protocolo utilizado por Botero *et, al* 2012, pero con variaciones en sus concentraciones para una mejor recuperación de *Blastocystis sp*.

En general, en el caso de las infecciones intestinales por protozoos, el cultivo suele hacerse no solo para establecer el diagnóstico, sino con fines didácticos y de investigación(45). Para el cultivo de *Blastocystis sp* se han empleado varios medios, sin embargo, el medio Boeck y Drbohlav (o modificaciones) ha sido el más utilizado. Este es un medio que fue utilizado inicialmente para el diagnóstico de amebas(32) y para el presente estudio, los resultados obtenidos fueron satisfactorios, en cuanto al aislamiento de *Blastocystis sp*. Este medio es fácil de preparar; las células cultivadas crecen constantemente y se multiplica rápidamente. Por lo tanto, puede ser una opción de continuo cultivo in vitro para *Blastocystis sp*(46).

En este estudio se realizó la modificación y estandarización de algunas condiciones en el medio de cultivo para *Blastocystis sp*, lo que permitió que dicho parásito se reprodujera adecuadamente. Dicho cultivo puede resultar positivo, aún cuando las muestras al examen directo sean negativas, como sucedió con 2 de las 10 muestras negativas usadas como control, fueron positivas al cultivo para *Blastocystis sp*. La positividad no necesariamente depende de la cantidad de formas parasitarias detectadas, sino tal vez de la viabilidad y otras características biológicas, bioquímicas y/o moleculares del parásito(13). De las 50 muestras positivas al examen directo, 3 fueron negativas para el cultivo, esto se puede explicar debido a que ciertos subtipos de *Blastocystis sp* son más difíciles de cultivar que otros(45). Sin embargo, a pesar de la sensibilidad que puede tener el cultivo, los resultados de cultivo negativo no descartan la presencia de infección(33).

De las formas morfológicas de *Blastocystis sp*, la más predominante en el cultivo fue la forma vacuolar, seguido de la forma granular. Además, se pudo evidenciar una intensa actividad replicativa del parásito en el cultivo a través de fisión binaria. Hasta la fecha, la fisión binaria es la única forma aceptada de reproducción de *Blastocystis sp* en cultivo y en heces demostrado tanto por microscopia de luz como por microscopio de transmisión de electrones(46). Por consiguiente la frecuencia de las formas morfológicas coinciden con otros estudios en la que coinciden en que la forma vacuolar seguido de la granular son la más frecuentes en los medios de cultivo(11).

Otro aspecto importante fue que *Blastocystis sp* pudo crecer en las dos atmósferas de incubación, con un mejor crecimiento en anaerobiosis. Fisiológicamente *Blastocystis sp* es un anaerobio estricto, pero tiene orgánulos similares a mitocondrias, lo cual le permite realizar respiración aerobia y por consiguiente crecer en esta atmosfera(48). Mientras que en aerobiosis a las 72 horas se pudo evidenciar crecimiento de *Blastocystis sp* en el medio de cultivo. Estos resultados donde creció en aerobiosis fueron similares a los observados por Gallego *et,al.* 2011 en la cual el procedimiento de estandarización fue en atmosfera de O₂. En otro estudio realizado por Ortigoza *et, al* realizaron todo el proceso de estandarización en atmosfera de CO₂, visualizando crecimiento desde las 24 horas de incubación.

En cuanto al tiempo de crecimiento, *Blastocystis sp* creció más rápido (a las 24 horas se obtuvo cultivo positivo) en atmósfera de anaerobiosis, ya que este parásito su atmósfera típica de crecimiento es la anaerobiosis, y esto le facilitó la reproducción de las diferentes formas morfológicas presentes(49). El extracto de levadura proporciona nitrógeno orgánico, compuestos de carbono y elevadas concentraciones de vitaminas del complejo B (50) necesarias para el crecimiento de *Blastocystis sp*.

En este estudio se logró mantener a *Blastocystis sp* en repiques sucesivos por 2 semanas empleando este medio de cultivo, en contraste a lo obtenido con Devera *et,al* 2013, en donde pudieron hacer repiques sucesivos del parásito durante 3 semanas. Aquí puede estar implicado el subtipo, y los nutrientes necesarios para que pudiera realizar todo su proceso de multiplicación y se conservara más tiempo. No se pudo obtener la axenización completa del medio de cultivo, esto debido posiblemente a la biota bacteriana presente y a los antibióticos utilizados para lograr tal fin. Pero, la axenización se puede lograr en investigaciones futuras(13). Ya que gran cantidad de bacterias puede dificultar su visualización y crecimiento en cultivo(51).

Blastocystis sp requiere la presencia de bacterias para su desarrollo *in vitro*, a menos que se realicen cultivos axénicos cuidadosamente controlados. No se desarrolla en medios de cultivos para hongos o bacterias, ni en la superficie de medios sólidos, crece en Ph neutro y en temperatura óptima de 37°C(52).El estudio realizado por Devera *et,al* 2013 no obtuvo la axenización completa, pero obtuvo crecimiento de *Blastocystis sp* en el medio de cultivo. La axenización es necesaria para realizar estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares del parásito, que son fundamentales para establecer la relevancia clínica del parásito una vez que se ha demostrado actualmente que hay genotipos que son más prevalentes que otros, y, existe además de diversidad genética, variabilidad en la patogenicidad de los genotipos (13)(53)

6. CONCLUSIONES

El medio Boeck y Drbohlav es un buen medio para la recuperación de *Blastocystis sp* a partir de muestras de materia fecal, ya que proporciona todos los nutrientes necesarios para su crecimiento. Además, es eficaz para mantener la viabilidad de dicho parásito estandarizando su aislamiento para una correcta multiplicación.

Su atmosfera idónea de incubación es anaerobiosis, ya que fisiológicamente es anaerobio estricto, pero puede crecer en aerobiosis gracias a mitocondrias presentes que le ayudan a realizar este intercambio de oxígeno.

Blastocystis sp puede estar presente en cualquier edad, teniendo en cuenta las condiciones de salubridad presentes en cada ciudad y/o perímetro urbano. Es muy importante resaltar la higiene y presencia de servicios sanitarios básicos para evitar contagios y afectación de la salud.

Considerar la importancia de la implementación de cultivo para *Blastocystis sp* para la identificación de subtipos implicados, así como para fines epidemiológicos y/o de investigación, contribuyendo a entender un poco más acerca de la biología y taxonomía de este parásito.

7. RECOMENDACIONES

- Mantener muestras axénicas que permitan posteriormente hacer diagnósticos moleculares y poder determinar el subtipo del parásito que está infectando y/o circulando.
- Realizar un estudio comparativo entre la microscopia y el cultivo para establecer una mejor opción diagnóstica para *Blastocystis sp.*

8. REFERENCIAS

1. Cañete R; RP. Infección por Blastocystis sp.: revisión de la literatura. Rev Médica Electrónica [Internet]. 2012;34(5):556–65. Available from: <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista medica/ano 2012/vol5 2012/tema05.htm>
2. Pérez MP, Margarita L, Ferrer V, Mendoza BM. Estudio comparativo de la frecuencia De Blastocystis hominis en niños edad preescolar de una zona urbana y una rural de la ciudad de Cartagena de Indias y su relacion con las manifestaciones clinicas y factores de riesgo. 2015;5(1):91–100.
3. Pipatsatitpong D, Rangsin R, Leelayoova S, Naaglor T, Mungthin M. Incidence and risk factors of Blastocystis infection in an orphanage in Bangkok, Thailand. Parasit Vectors [Internet]. 2012;5(1):37. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/37>
4. Guzman C, Arrechdera H, Perez E. Ultraestructura de Blastocystis hominis y su enquistamiento en cultivo polixénico. Vitae Acad Biomed Digit. 2007;30.
5. Con E, Rosa M, Camacho P, Nacional U, San M De. Blastocystis hominis y Enterocytozoon bieneus i: enteropatogenos emergentes con potencial zoonotico. 2010;
6. Zaman V, Howe J, Ng M, Goh TK. Scanning electron microscopy of the surface coat of Blastocystis hominis. Parasitol Res [Internet]. 1999 Dec [cited 2017 Sep 18];85(12):974–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10599919>
7. Chandramathi S, Suresh K, Anita ZB, Kuppusamy UR. Infections of Blastocystis hominis and microsporidia in cancer patients: Are they opportunistic? Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 2012;106(4):267–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.12.008>
8. Botero, David; Restrepo M. Parasitosis Humanas. Medellin; 2012. 719 p.

9. Amaya, Alana; Trejos, Juanita; Morales E. Blastocystis spp, revision literaria de un parasito intestinal altamente prevalente. 2016;47(2015):1–15.
10. Gallegos L, González A, López-urbina T, Gonzales- E. Comparacion de la eficacia de tres medios de cultivo in vitro para el desarrollo de Blastocystis spp. 2013;24(4):480–8.
11. Roberts T, Barratt J, Harkness J, Ellis J, Stark D. Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of Blastocystis sp. in clinical stool samples. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(2):308–12.
12. Lozano Socarras SL. Prevalencia de Blastocystis hominis como agente causal de Enfermedades Gastrointestinales en la comuna 7 (Gaira) Del distrito De Santa Marta. 2005;2(1):5–7.
13. Devera R, Jaimes N, Blanco Y, Requena I. Uso del cultivo en el diagnostico de Blastocystis sp. 2013;60–5.
14. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KSW, Thompson RCA, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for Blastocystis subtypes - a consensus. Trends Parasitol. 2007;23(3):93–6.
15. Stenzel DJ, Boreham PF. Blastocystis hominis revisited . D J Stenzel and P F Boreham. 1996;9(4):129–36.
16. Zierdt CH, Rude WS, Bull BS. Protozoan characteristics of Blastocystis hominis. Am J Clin Pathol [Internet]. 1967 Nov [cited 2017 Sep 18];48(5):495–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6058384>
17. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. Nature [Internet]. 1996 Apr 4 [cited 2017 Sep 18];380(6573):398–398. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8602239>
18. Salinas J, Gonzales HV. Infección por blastocystis. Rev Gastroenterol del Peru [Internet]. 2007;(1):264–74. Available from:

<http://www.scielo.org.pe/pdf/rgp/v27n3/a07v27n3.pdf>

19. Velarde, Luz Teresa; Mendoza Romo MA. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en menores de 12 años de una población mexicana urbana. 2006;78(4).
20. Dunn LA, Boreham PFL, Stenzel DJ. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *Int J Parasitol*. 1989;19(1):43–56.
21. Tan KSW. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):639–65.
22. Leonora Eugenia Kozubsky1 SA. Algunas consideraciones acerca de *Blastocystis* sp., un parásito controversial*. *Acta Bioquím Clín Latinoam* [Internet]. 2010;44(3):371–6. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v44n3/v44n3a09.pdf>
23. Del coco V, Molina N, Basulado J, Córdoba M. *Blastocystis* spp avances, controversias y desafíos futuros. *Rev argentina Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Oct 15];49(1):110–8. Available from: https://ac.els-cdn.com/S0325754116300876/1-s2.0-S0325754116300876-main.pdf?_tid=d724a8d8-b1e7-11e7-9a16-00000aab0f26&acdnat=1508099676_f06a26bffa5a1765e90ee92098eabe05
24. Lanuza MD, Carbajal JA, Villar J, Borrás R. Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. *Parasitol Res*. 1997;83(1):60–3.
25. Decanato A. Infection por *Blastocystis* sp. en el hombre: mecanismos patógenos. *Boletín Médico de Postgrado*. 2014;30(4):326–35.
26. Yoshikawa H, Abe N, Wu Z. PCR-based identification of zoonotic isolates of *Blastocystis* from mammals and birds. *Microbiology*. 2004;150(5):1147–51.
27. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, et al. *Blastocystis* , an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis* [Internet]. 2013;1(5):167–78. Available from:

<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2049936113504754>

28. Karina Y, Yaneth C, Alejandra M, Casta Y. Identificación de los subtipos de *Blastocystis* sp en pacientes sintomáticos y asintomáticos de la ciudad de Cucuta, norte de Santander.
29. Stensvold CR, Nielsen H V., Mølbak K, Smith H V. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* - diagnostic limitations. *Trends Parasitol.* 2009;25(1):23–9.
30. Rojas Cruz C y Zapata Valencia JI. Una actualización sobre *Blastocystis* sp. *Rev Gastrohnp.* 2012;14(3):94–100.
31. Santos HJ, Rivera WL. Comparison of direct fecal smear microscopy , culture , and polymerase chain reaction for the detection of *Blastocystis* sp . in human stool samples. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2013;6(10):780–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60138-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60138-8)
32. Guzmán de Rondón C, Vethencourt MA, Galindo Pérez M, Chacón N, Wagner C, Nessi Paduani A. Comportamiento biológico de *Blastocystis hominis* en pacientes tratados con Secnidazol (Unidazol®). *Rev la Soc Venez Microbiol* [Internet]. 2008 [cited 2016 Mar 31];28(1):66–71. Available from: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562008000100013&lng=es&nrm=iso&tlng=es
33. Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(3):329–41.
34. Martínez J, Rolo M, Osorio L, Pulido N, Blanco Z, Moreno N. Mantenimiento y transporte de *blastocystis* sp en condiciones de vitalidad. *Salus Online* [Internet]. 2004;12:233–41. Available from: salus-online.fcs.uc.edu.ve/contrib_ucna_diag_molec.pdf
35. Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, Tanowitz HB. *Blastocystis*: To treat or not to

treat.. Clin Infect Dis. 2012;54(1):105–10.

36. Moghaddam DD, Ghadirian E, Azami M. Blastocystis hominis and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. Parasitol Res. 2005;96(4):273–5.
37. T C, Bandes A, Urbina J, Cruz J, Nessi P AJ, Galindo P M V, et al. Investigación de Blastocystis spp, Giardia Spp, y Cryptosporidium Spp en aguas de consumo en una comunidad de caracas -Venezuela. Reporte preliminar. [Internet]. Vol. 44, Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel; 2013 [cited 2017 Jul 29]. 33-40 p. Available from: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772013000200007
38. Basak S, Rajurkar MN, Mallick SK. Detection of Blastocystis hominis: A controversial human pathogen. Parasitol Res. 2014;113(1):261–5.
39. Stenzel DJ, Boreham PFL. Blastocystis hominis revisited. Clin Microbiol Rev. 1996;9(4):563–84.
40. Stensvold CR, Clark CG. Current status of Blastocystis: A personal view. Parasitol Int [Internet]. 2016;65(6):763–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>
41. Stensvold CR. Laboratory diagnosis of Blastocystis spp. Trop Parasitol [Internet]. 2015 [cited 2017 Nov 21];5(1):3–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25709945>
42. Sari IP, Benung MR, Wahdini S, Kurniawan A. Diagnosis and Identification of Blastocystis Subtypes in Primary School Children in Jakarta. J Trop Pediatr [Internet]. 2017;1–7. Available from: <http://academic.oup.com/tropej/article/doi/10.1093/tropej/fmx051/4100569/Diagnosis-and-Identification-of->

Blastocystis%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28977665

43. Zhang X, Qiao J, Wu X, Da R, Zhao L, Wei Z. In vitro culture of *Blastocystis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of blastocystosis. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2012;16(1):e23–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2011.09.012>
44. Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M. In-vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2017 Oct 16];96(8):803–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12625935>
45. Visvesvara GS, Garcia LS. Culture of Protozoan Parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(3):327–9.
46. Zhang X, Qiao JY, Zhou XJ, Yao FR, Wei ZC. Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and in vitro. 2007;101:43–51.
47. Domínguez-Márquez MV, Guna R, Muñoz C, Gómez-Muñoz MT, Borrás R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitol Res*. 2009;105(4):949–55.
48. Stechmann A, Hamblin K, Pérez-Brocal V, Gaston D, Richmond GS, van der Giezen M, et al. Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Biol* [Internet]. 2008 Apr 22 [cited 2017 Oct 17];18(8):580–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403202>
49. Ajjampur SSR, Tan KSW. Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. — Interpreting results from in vitro and in vivo studies. *Parasitol Int* [Internet]. 2016;65(6):772–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.007>
50. Tortora G, Funke BR, Case CL. Introducción a la microbiología [Internet]. Médica Panamericana; 2007 [cited 2017 Nov 21]. Available from: <https://books.google.fr/books?id=Nxb3iETuwpIC>

51. Coskun A, Malatyali E, Ertabaklar H, Yasar MB, Karaoglu AO, Ertug S. Blastocystis in ulcerative colitis patients: Genetic diversity and analysis of laboratory findings. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2016;9(9):916–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.018>
52. Blastocystis P De, Sulbarán SC, Pérez MCC De, Feo MP, Eliel J, Guerra C. Prevalencia de Blastocystis hominis en pacientes sintomaticos. 1999;5(publicado):48–55.
53. Yakoob J, Jafri W, Beg MA. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of Blastocystis hominis. 2010;106:1033–8.

ANEXOS

ANEXO A

Protocolo para cultivo de *Blastocystis sp*

A continuación se describe el protocolo que se logró establecer para el cultivo de *Blastocystis sp* teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio.

Medio de Boeck y Drbohlav.

Este medio está formado por una base semisólida de huevo y una capa superficial de solución de Locke modificada. El procedimiento consta de 3 etapas:

- Preparación de la base de huevo.
- Elaboración de la Solución de Locke.
- Cultivo.

Preparación de base de huevo:

- Se lavan 2 huevos frescos y se rompen en un balón volumétrico de 1000 ml, que contenga algunas perlas de vidrio.
- Se añade 50 ml de solución de Locke estéril, sin antibióticos y se emulsiona, agitando.
- Se filtra por gasa y se distribuye en tubos de ensayo estériles de 15 x125 mm de manera que se llena el fondo del tubo y se coloca inclinado para que formara bisel.
- Se deja coagular en horno, controlando el momento en que se gelifica.
- Se esteriliza a 15 libras por 15 minutos.
- Se hace control de esterilidad incubando por 24 horas a 37°C.
- Al momento de utilizarlo se agregan 4 ml de solución de Locke, con antibióticos, como sobrenadante. Los antibióticos son Gentamicina y Penicilina. A la solución de Locke de sobrenadante se agrega 1 ml de antibiótico (penicilina y gentamicina) 1 ml por cada 500 ml de solución de Locke.

Solución de Locke. En la tabla 6 se explican los reactivos necesarios y sus cantidades para su elaboración.

Tabla 6. Solución de Locke para cultivo de *Blastocystis sp*

| Componente | NaCl | CaCl ₂ ·2H ₂ O | KCl | MgCl ₂ ·6H ₂ O | Na ₂ HPO ₄ | NaHCO ₃ | KH ₂ PO ₄ | AD |
|------------|------|--------------------------------------|-----|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------|---------------------------------|------------|
| Cantidad | 8.0 | 0.2 | 0.2 | 2.0 | 0.1 | 0.4 | 0.3 | 1000 ml |

AD: agua destilada

Las sustancias mencionadas se agregan en su orden al agua destilada; se mezcla cada una hasta disolver completamente; se hierve durante 10 minutos y se obtiene un precipitado; se enfría a temperatura ambiente y se filtra por papel; se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión.

Cultivo

Sembrar en el sobrenadante, colocando 0,5 ml si la muestra es líquida o semilíquida y 1 gramo si es sólida. Al momento de la siembra agregar 30 mg de polvo de arroz estéril. Los tubos se revisaran microscópicamente a las 24, 48 y 72 horas.



ANEXO B
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIONES MICROBIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS DE CÓRDOBA



Proyecto: Establecimiento de un cultivo para el diagnóstico de *Blastocystis* sp. en pacientes de la ciudad de Montería, Córdoba.

CÓDIGO:

Consentimiento Informado

El grupo de investigaciones microbiológicas y biomédicas de la universidad de Córdoba, está adelantando una investigación en la que se pretende establecer un cultivo para el diagnóstico de *Blastocystis sp* a partir de muestras de materia fecal de pacientes que asistan al Hospital San Jerónimo de la ciudad de Montería.

Cabe resaltar que su colaboración es de vital importancia para nosotros, ya que la investigación en la cual, consentirá participar traerá consigo beneficios a la comunidad en general.

Si usted tiene a gusto colaborar, su participación consiste en:

1. Autorizar el procesamiento de las muestras para el estudio.

La decisión que usted tome es voluntaria y no influirá en el tratamiento que usted reciba en esta institución.

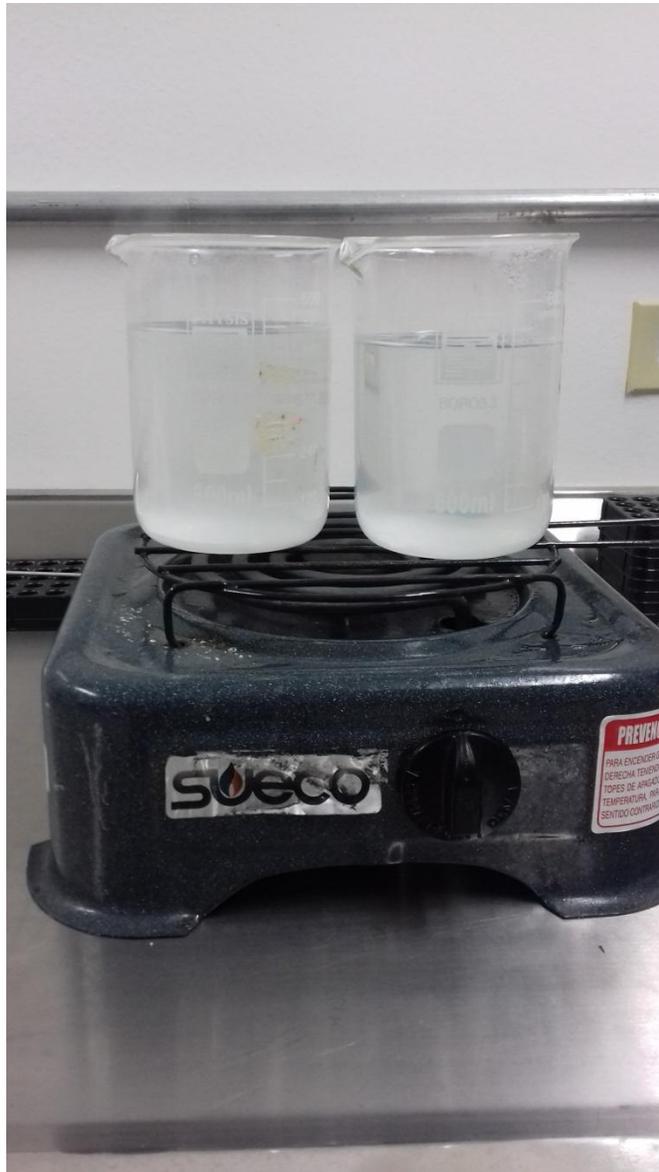
Luego de conocer el objetivo de la presente, yo: _____

_____ identificado con CC: _____

Acepto mi participación voluntaria en el estudio a realizar.

ANEXO C

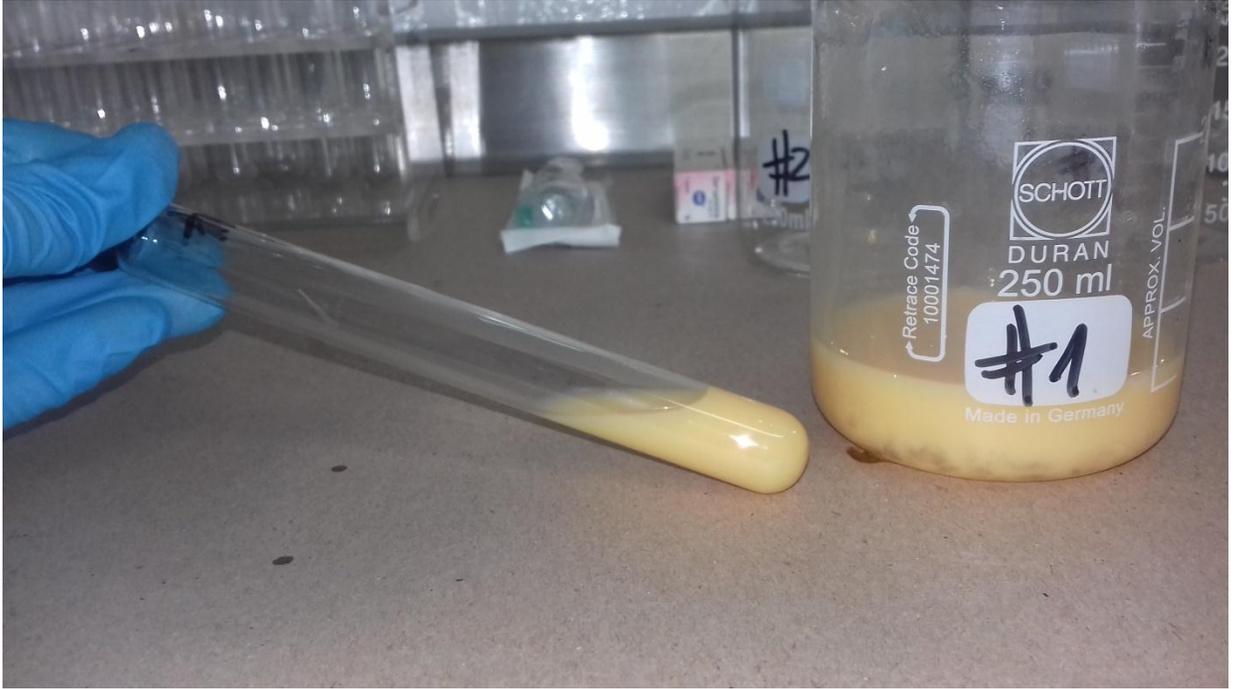
Preparación del medio de cultivo Boeck y Drbohlav



Preparación de solución de Locke. Fase de formación de precipitado.

ANEXO D

Base de Huevo Medio Boeck y Drbohlav

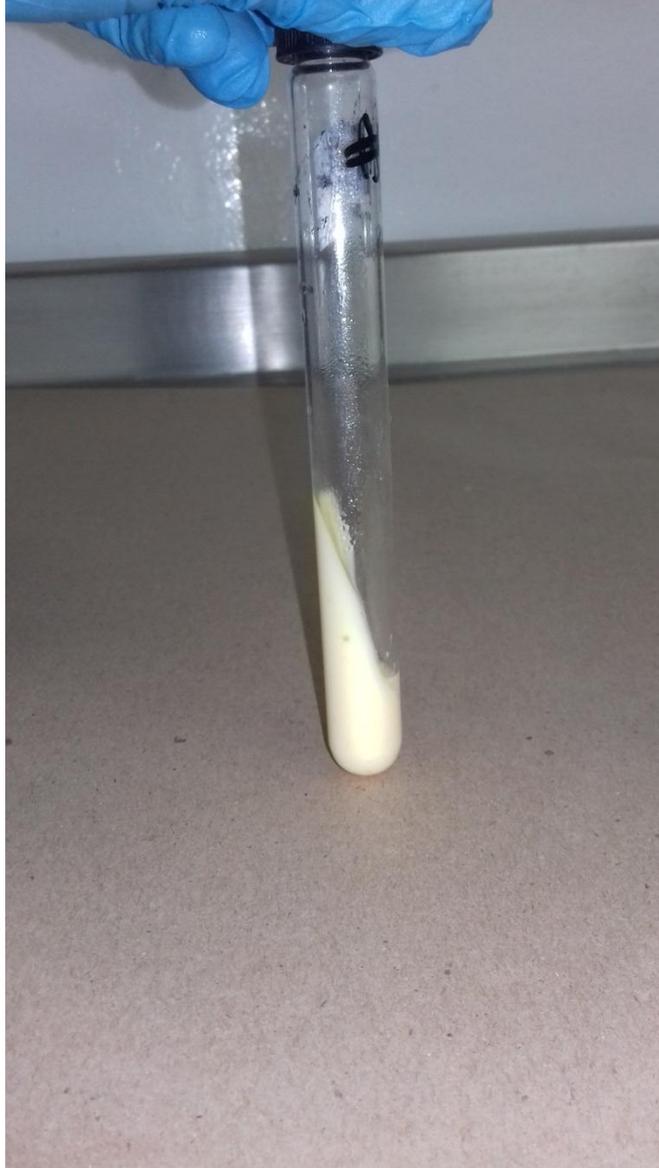


Base de huevo antes de coagularse.

Formación de bisel.

ANEXO E

Base de huevo después de coagularse



. Nótese la formación de bisel.

ANEXO F

Base de huevo después de coagularse



Nótese la formación de bisel.

ANEXO G

Medio Boeck y Drbohlav listo para inocularse.



Obsérvese la base de huevo y la fase líquida o sobrenadante.

ANEXO H

Medio de Boeck y Drbohlav inoculado

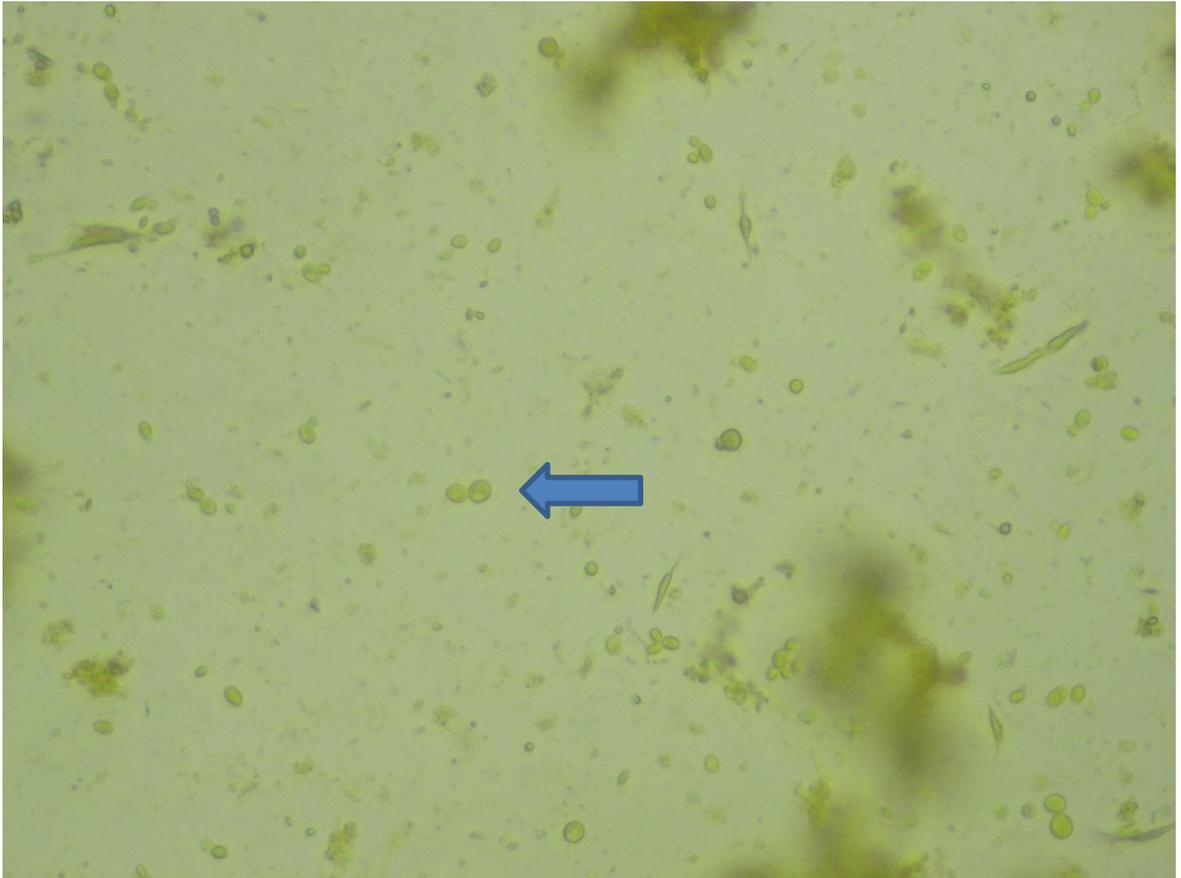


Medio de cultivo Inoculado.

Fuente: autor

ANEXO I

Blastocystis spp en el medio de cultivo Boeck y Drbohlav

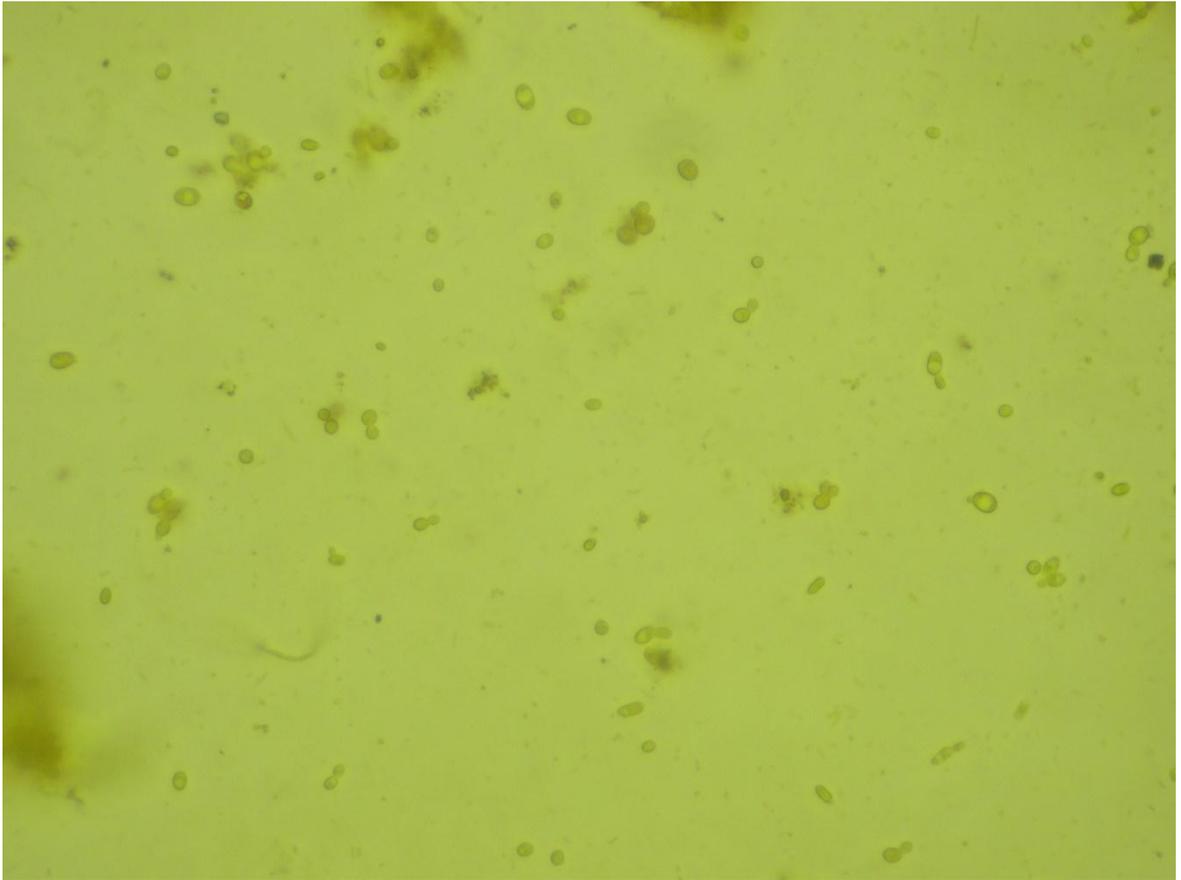


Blastocystis spp a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, examen directo 40X.

Fuente: Autor

ANEXO J

Blastocystis spp en el medio de cultivo Boeck y Drbohlav

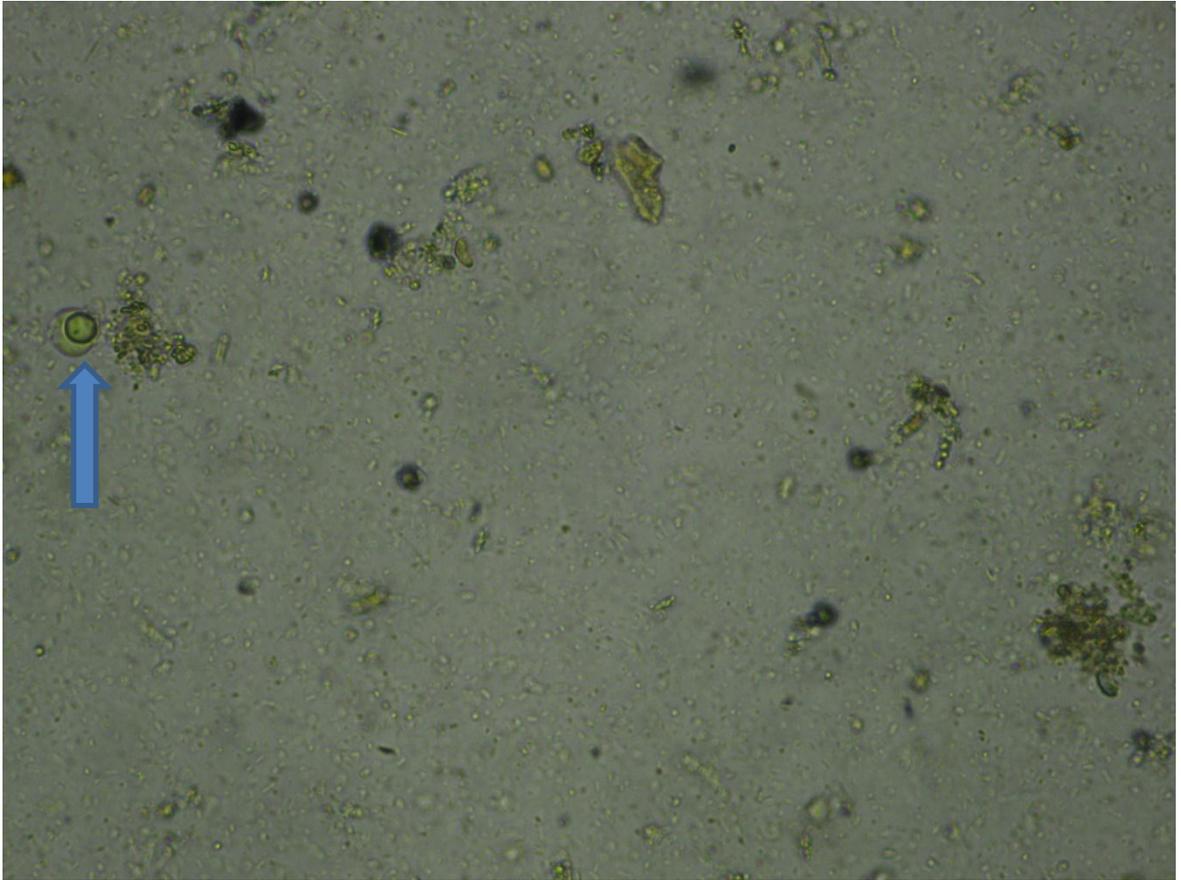


Formas granulares de *Blastocystis spp* a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X.

Fuente: Autor

ANEXO K

Blastocystis spp en el medio de cultivo Boeck y Drbohlav

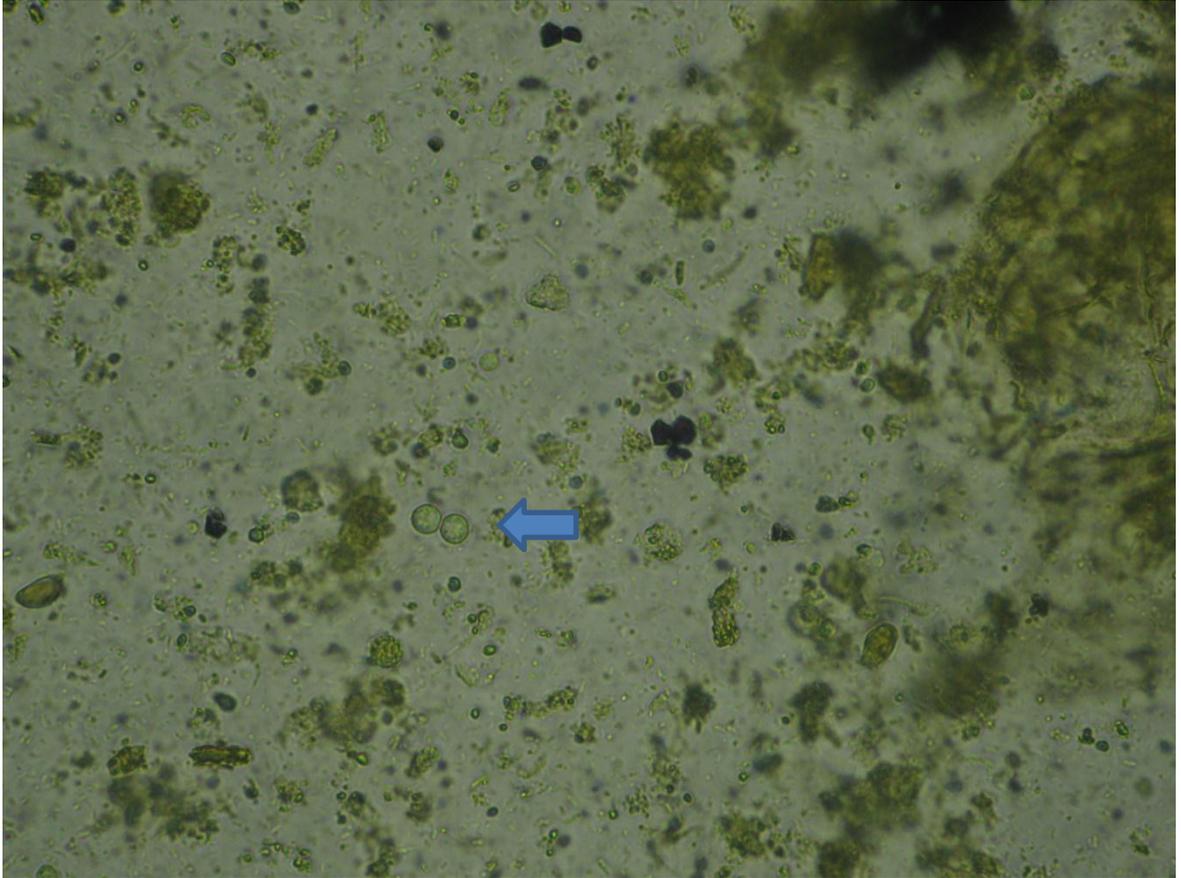


Forma quística de *Blastocystis spp* a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X.

Fuente: autor.

ANEXO L

Blastocystis spp en el medio de cultivo Boeck y Drbohlav

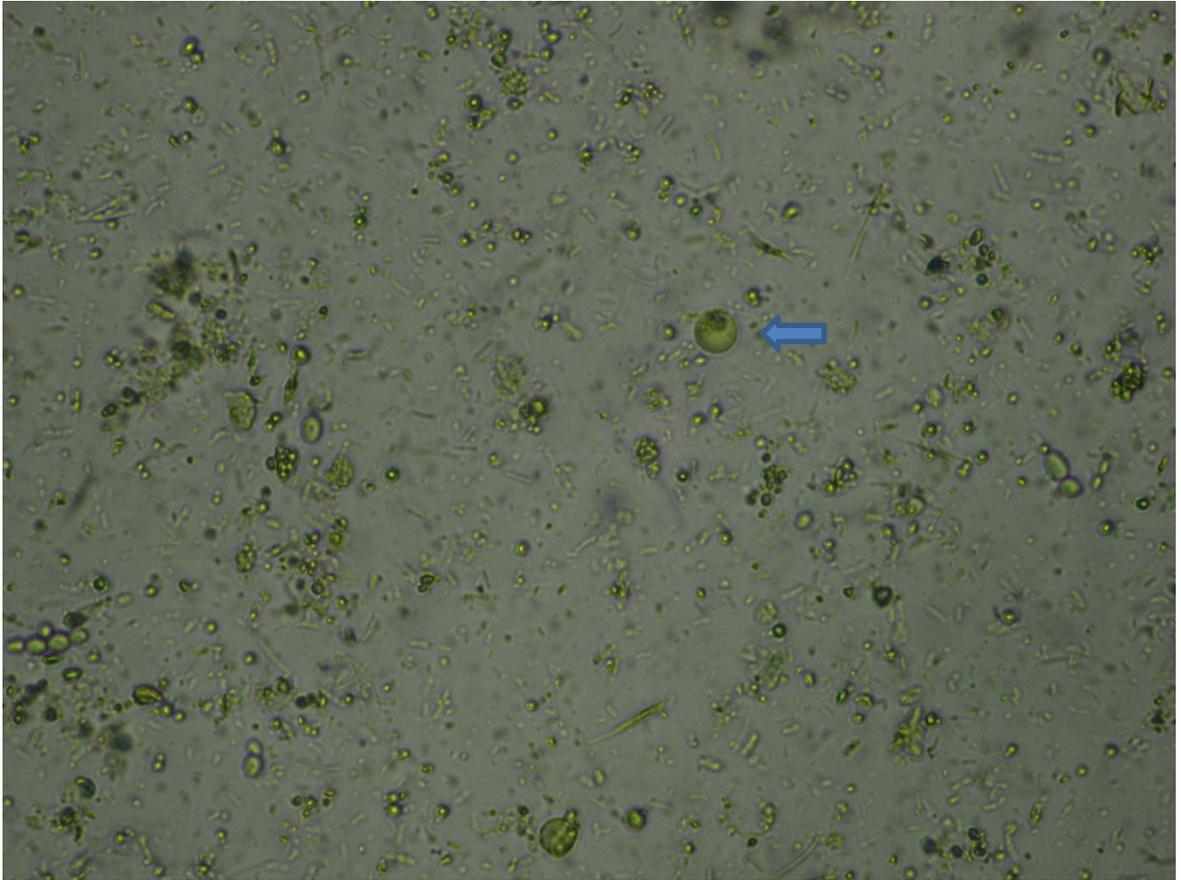


Formas granulares de *Blastocystis spp* a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X.

Fuente: Autor.

ANEXO M

Blastocystis spp en el medio de cultivo Boeck y Drbohlav

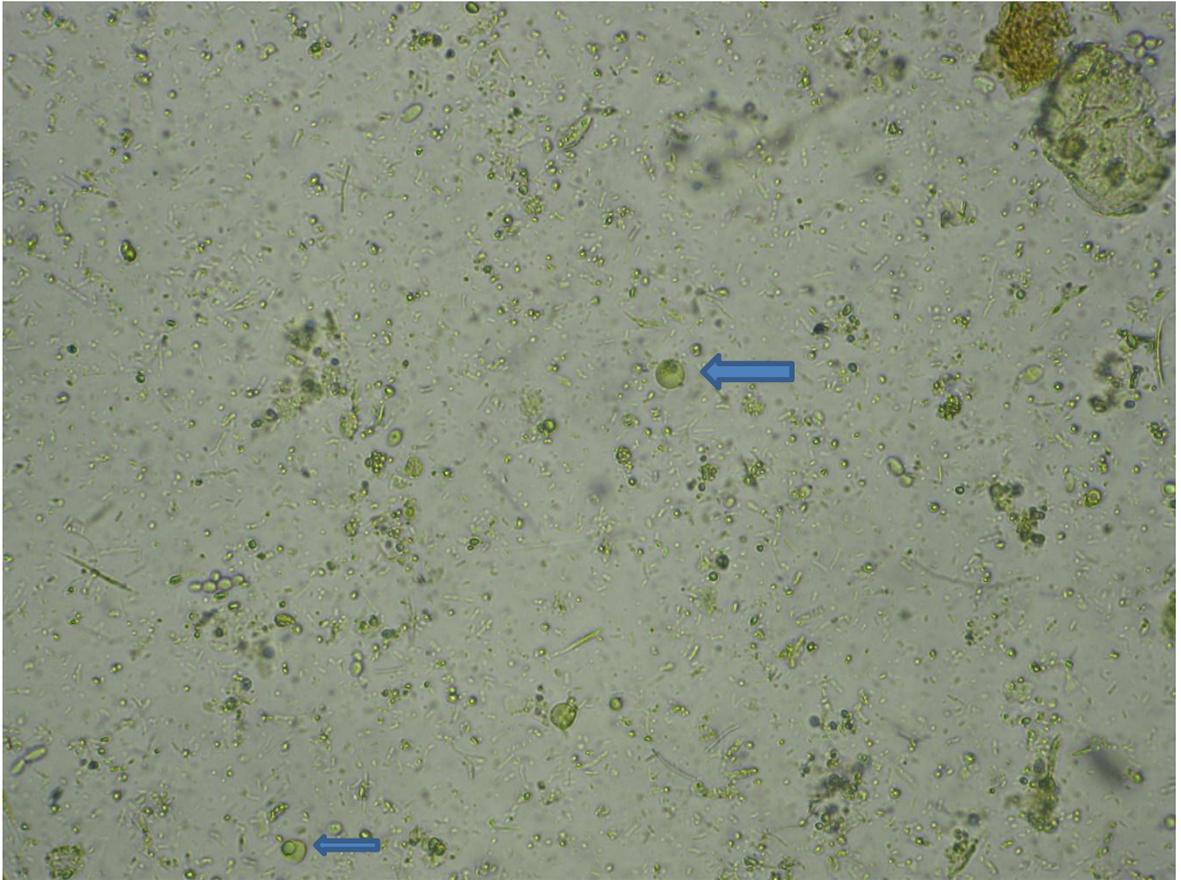


Formas granulares de *Blastocystis spp* a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X.

Fuente: Autor.

ANEXO N

Blastocystis spp en el medio de cultivo Boeck y Drbohlav

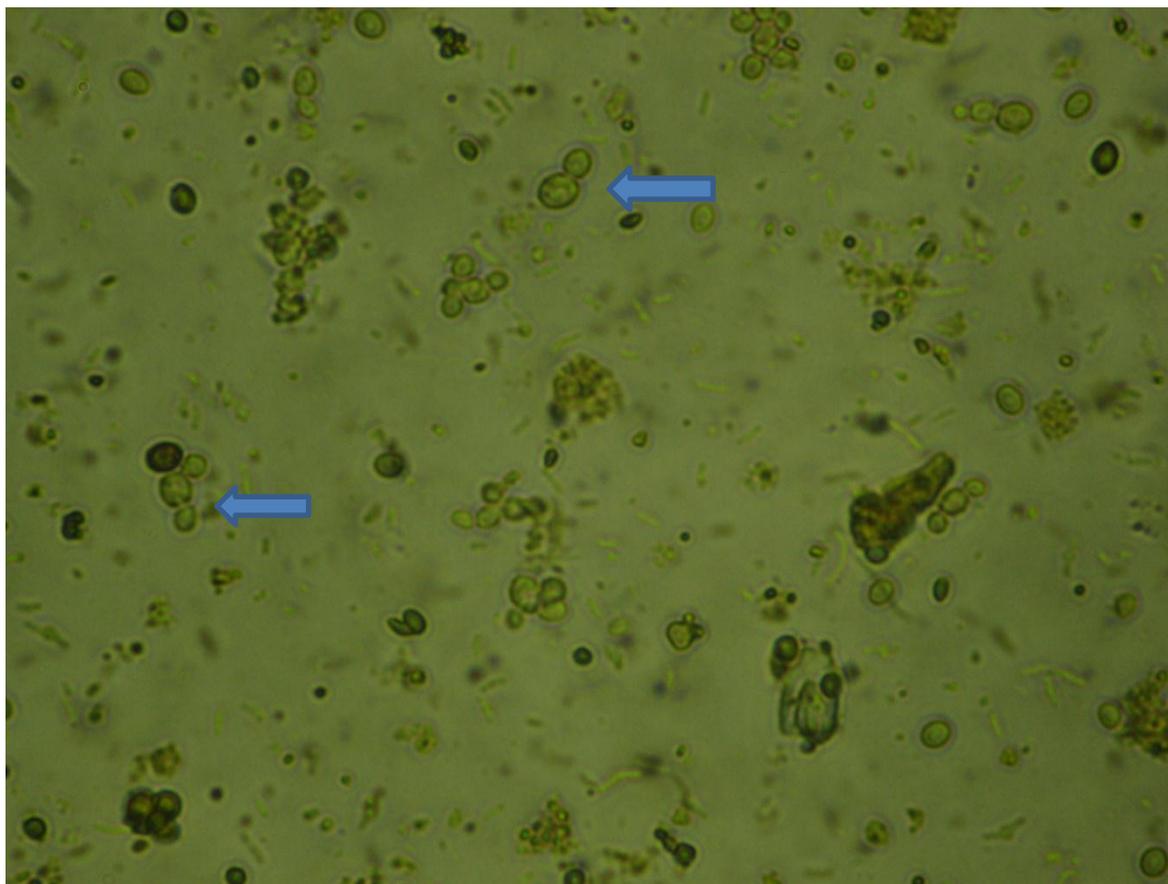


Forma granular y quística de *Blastocystis spp* a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, exámen directo 40X

Fuente: Autor.

ANEXO O

Blastocystis spp en el medio de cultivo Boeck y Drbohlav



Reproducción de *Blastocystis spp* a las 48 horas de incubación. Tinción con lugol, examen directo 40X.

Fuente: Autor

