

# Métodos para la detección de *Blastocystis spp*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, y *Cryptosporidium spp* en muestras de agua y materia fecal

José Mijail Campos Compean,<sup>1</sup> Ana María Fernández Presas,<sup>3</sup> María del Carmen Monroy Dosta,<sup>4</sup> Aída Hamdan Partida<sup>2</sup> y Jaime Bustos Martínez<sup>2\*</sup>

**Resumen.** Las enfermedades gastrointestinales son un problema de salud pública debido a que poseen altos índices de prevalencia en la población nacional y mundial. Por ello, es importante contar con una metodología adecuada para su identificación segura y oportuna. Existen diversos métodos para realizar el diagnóstico de parásitos protozoarios, los que se pueden agrupar en 3 tipos: métodos microscópicos, métodos moleculares y métodos inmunobiológicos.

Se realizó una búsqueda a través de PubMed, Medline, Scopus, Google Scholar, DBLP, JSTOR y LILACS para la recolección de artículos enfocados en métodos para la identificación y diagnóstico de *Blastocystis spp*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp*. Se encontró que se puede tener una confirmación confiable de la presencia de estos parásitos intestinales si se utilizan los métodos microscópicos, moleculares e inmunobiológicos aquí descritos. Estas metodologías permiten la realización de estudios tanto de diagnóstico como epidemiológicos y ambientales.

**Palabras clave:** Parásitos protozoarios, Enfermedades gastrointestinales, Métodos microscópicos, Moleculares e Inmunobiológicos.

<sup>1</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana.

<sup>2</sup> Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

<sup>3</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>4</sup> Laboratorio de Análisis Químico del Alimento Vivo para la Acuicultura, Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco.

\* Autor de correspondencia: Jaime Bustos Martínez, 5554837000 ext. 3848, e-mail: jbustos@correo.xoc.uam.mx.

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial las enfermedades gastrointestinales presentan altas tasas de prevalencia y amplia distribución, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, son del tipo de enfermedades más desatendidas y comunes en poblaciones de escasos recursos, causando una alta morbilidad y mortalidad, sobre todo en países en desarrollo (Lacoste *et al.*, 2012).

Dentro de las enfermedades gastrointestinales se encuentran las parasitosis intestinales, cuyo hábitat es el aparato digestivo de las personas y animales, estas enfermedades son producidas por protozoarios y helmintos. Las parasitosis intestinales tienen distribución mundial y se relacionan estrechamente con la pobreza y con las malas condiciones sanitarias, por lo que aparecen más frecuentemente en países en vías de desarrollo (Lacoste *et al.*, 2012).

Los protozoarios intestinales se destacan por su alta resistencia a los diversos factores ambientales, además se encuentran relacionados con altos índices de morbilidad y mortalidad en la población infantil (Menocal y Caraballo, 2014).

Se sabe que los ecosistemas acuáticos contaminados por diversas fuentes, como aguas residuales, ganado y la industria, favorecen la presencia de parásitos gastrointestinales en agua y alimentos recolectados en la zona contaminada (Walter y Querales, 2008).

La transmisión de parásitos intestinales a través del agua representa un grave problema de salud pública a nivel mundial, debido a que es un medio de diseminación importante de agentes patógenos causales de diversas enfermedades en el humano, las que afectan frecuentemente a la población (Guillen *et al.*, 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 24% de las enfermedades que ocurren en el mundo están asociadas con factores ambientales, entre ellos el agua de calidad insegura y precarias condiciones higiénicas (WHO, 2007). La principal fuente de contagio es el mal manejo de los residuos de materia fecal que contaminan fuentes de agua recreativa, agua potable, suelo y alimentos (Pérez *et al.*, 2008).

Los protozoos que infectan el tracto gastrointestinal con una mayor incidencia y prevalencia son: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Blastocystis* spp y *Cryptosporidium* spp (Romero y López, 2020).

### ***Blastocystis* spp**

*Blastocystis* spp es un parásito de distribución mundial, cuyo nicho ecológico habitual es el aparato digestivo de humanos, mamíferos, aves y reptiles. Inicialmente, fue considerado como una levadura no patógena, sin embargo, en la actualidad se clasifica como un protozoario unicelular anaerobio facultativo, y su patogenicidad continúa en discusión;

recientes investigaciones basadas en el estudio filogenético de la subunidad ribosomal pequeña posicionan a *Blastocystis* spp como el único parásito descrito en humanos perteneciente al reino Chromista, posteriormente, en 2007, se concluyó la existencia de 17 subtipos y se propuso la eliminación del término "*Blastocystis hominis*" y se incluyó el término *Blastocystis* spp, seguido de un subtipo del 1 al 17 en toda muestra aislada (Wawrzyniak *et al.*, 2013).

Cada parásito posee cuatro formas vegetativas: cuerpo central, granular, ameboide y quistes. El quiste mide entre 3 y 6  $\mu\text{m}$  y ha sido aislado de varios diferentes hospederos vertebrados, incluido el hombre. La forma vacuolar está constituida por una gran vacuola central que ocupa una gran parte del espacio celular, limitando al citoplasma y otros componentes intracelulares a la periferia del mismo. Se ha determinado un diámetro con un amplio rango de tamaño que va de entre 4 y 63  $\mu\text{m}$ . La forma granular presenta un rango de diámetro entre 15 y 25  $\mu\text{m}$  y exhibe gránulos en el centro del citoplasma, la forma ameboide es más pequeña, midiendo alrededor de 10  $\mu\text{m}$  y presenta pseudópodos, aun así, no presenta actividad de locomoción (Chacón y Durán, 2017).

El mecanismo de transmisión es a través de ingestión de alimentos y aguas contaminadas con quistes. Posterior a la ingesta y por acción de los jugos gástricos, en el duodeno es liberada la forma vacuolar (Dhurga *et al.*, 2012). Aún no se sabe si se puede adquirir por el consumo de alimentos crudos, ya que hasta el momento sólo se ha encontrado una referencia de *Blastocystis* spp en bivalvos, que frecuentemente se consumen crudos y podrían ser un reservorio para infectar al humano (Campos *et al.*, 2018). Cuando una persona se infecta por la ingestión de quistes, éstos se transforman en el tracto digestivo hasta alcanzar el colon donde adoptan la forma vacuolar y ésta se divide por fisión binaria (Chacón y Durán, 2017).

Existen 17 subtipos de *Blastocystis* spp dependiendo de la especie animal que parasitan, los subtipos del 1 al 9 se encuentran en humanos y algunos los comparten con otros animales, mientras que, del subtipo 10 al 17 se encuentran en animales como primates, roedores, aves, reptiles, serpientes (Wawrzyniak *et al.*, 2013).

### ***Entamoeba histolytica***

*Entamoeba histolytica* es uno de los protozoos más frecuentes en México. La primera descripción de *Entamoeba histolytica* se atribuye a Lambl en 1860. En 1994 se propuso la clasificación, incluyendo el género *Entamoeba* en el phylum Rhizopoda y la clase Entamoebidae, en el orden Entamoebida y la familia Entamoebidae (Ximénez *et al.*, 2007). Sólo una

especie del género *Entamoeba* produce infección en el humano: *Entamoeba histolytica* (Tanyuksel y Petri, 2003). Existen además otras amebas intestinales comensales que se pueden aislar pero que no son patógenas, como lo es *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii* y *Entamoeba coli* (Rivero, 2013).

*Entamoeba histolytica* presenta dos formas en su ciclo vital: la fase de quiste y de trofozoíto. Los quistes son estructuras redondeadas de 10 a 16  $\mu\text{m}$ , con una cubierta gruesa y que presenta en su interior 1 a 4 núcleos. El trofozoíto tiene un diámetro de 20 a 40  $\mu\text{m}$  y es móvil, gracias a su ectoplasma que le permite emitir pseudópodos; su núcleo presenta un cariosoma compacto central y cromatina en gránulos uniformes en tamaño y localización (Tanyuksel y Petri, 2003). Se ha confirmado la ausencia de mitocondrias *Entamoeba histolytica*, pero se sabe que la conversión de energía se realiza en el citosol y el ATP se genera sólo por la fosforilación a nivel de sustrato en el citoplasma (Jeelani y Nozaki, 2014).

El ciclo de vida inicia con la ingestión de un quiste infeccioso, el cual por acción de los jugos digestivos libera trofozoitos en el intestino grueso, donde puede desarrollar infección invasora. Al reblandecerse la pared del quiste, se libera el trofozoíto donde termina su proceso de división y da lugar a cuatro trofozoitos metaquísticos, si el trofozoíto continúa avanzando por el colon, inicia su proceso de enquistamiento con la formación de un prequiste mononuclear, esto permite que se inicie un proceso de división celular que da lugar a un quiste tetranuclear y con esto termina la formación de la pared del quiste, el cual es expulsado en la materia fecal (Tanyuksel y Petri, 2003).

### ***Giardia lamblia***

*Giardia lamblia* es un protozoo flagelado cosmopolita que puede manifestarse como un síndrome diarreico agudo, crónico o intermitente (Monis *et al.*, 2009). El primer dibujo microscópico de las características morfológicas que identificaban a *Giardia* fue del médico Vilém Dusan Lambl en 1859, analizó las muestras de materia fecal de un niño y realizó dibujos que tienen una gran similitud con las fotografías modernas de *Giardia Lamblia* (Lipoldová, 2014). Durante mucho tiempo se pensó que era un comensal humano, es en los años 60 cuando existen los primeros reportes que mencionan la capacidad de este protozoario de producir diarreas y síndrome de malabsorción en el hombre (Núñez, 2011).

*Giardia lamblia* es un protozoo flagelado perteneciente al orden Diplomonadida, familia Hexamitidae. Actualmente, se reconocen 6 especies de *Giardia* con distinta especificidad de hospedadores (Molina y Basualdo, 2008). *Giardia lamblia* es una especie que presenta una gran variabilidad genética, utilizando herramientas moleculares se han caracterizado siete genotipos que se indican con letras (A-B-C-D-E-F-G); se ha demostrado que los genotipos A y B de *Giardia lamblia* producen infección en humanos (Adam, 2001). Este parásito constituye uno de los principales agentes etiológicos de infecciones intestinales del hombre y está presente en forma endémica aun en países desarrollados (Núñez, 2011).

Después de la ingestión de quistes del protozoo y mediante la acción de jugos digestivos se reblandece la pared del quiste liberado a los trofozoitos en el intestino delgado, que permanecen fijados a la mucosa hasta que se produce su bipartición, posteriormente, se forman quistes que caen a la luz intestinal y son eliminados con las heces (Barrón *et al.*, 2010).

### ***Cryptosporidium* spp**

*Cryptosporidium* spp produce una infección intestinal en humanos, en personas de todo el mundo, los más susceptibles son los sujetos inmunocomprometidos (Gómez y Aguirre, 2017). En 1907, Tyzzer fue el primero en descubrir el género *Cryptosporidium* al que describió como un organismo similar a un protozoario intracelular llamado *Coccidiasina* (Tyzzer, 1907). Actualmente, *Cryptosporidium* se clasifica como perteneciente a la familia Cryptosporidiidae, suborden Eimeriorina y orden Eucoccidiorida (Levine, 1984). Se han descrito 20 especies dentro del género *Cryptosporidium*, pero *Cryptosporidium parvum* es la especie que se asocia a enfermedad humana, aunque también puede encontrarse en otros hospedadores, ya que no existe una completa especificidad de hospedero (Rodríguez y Royo, 2000).

*Cryptosporidium parvum* es un protozoo esférico de 4-6  $\mu\text{m}$  de diámetro y es considerado un parásito oportunista con forma esférica o elíptica (Gómez y Aguirre, 2017).

El mecanismo de transmisión es fecal-oral, el parásito tiene un ciclo de vida complejo que incluye etapas asexuales y sexuales; comienza tras la ingestión de agua o alimentos contaminados por ooquistes que viajan a través del tracto digestivo hasta el intestino delgado superior, en donde ocurre la desenquistación y libera esporozoitos, los que penetran en la capa de mucosa y se adhieren a los enterocitos cercanos, formando una vacuola alrededor del parásito, que luego se diferencia en un trofozoíto (Leitch y He, 2011).

La división mitótica del parásito, en este punto, da como resultado un meronte tipo I y la producción de merozoitos. Los merozoitos se parecen a los esporozoitos, éstos se escapan de la vacuola del meronte tipo I y se unen a los enterocitos cercanos, estableciendo ciclos infecciosos asexuales amplificados (Bouزيد *et al.*, 2013).

Alternativamente, la infección por merozoitos puede dar como resultado un meronte tipo II y la producción de merozoitos tipo II. Al igual que con los merozoitos que se originan a partir del meronte tipo I, los merozoitos tipo II escapan para infectar los enterocitos cercanos, produciendo un macrogameto (hembra) o un microgameto (macho), se liberan microgametocitos del microgameto, y cada uno puede fertilizar un macrogameto para formar un cigoto diploide, que se diferencia en un ooquisto (Leitch y He, 2011). Esto constituye el ciclo sexual, cuyo producto final es un ooquiste de pared delgada que se excreta dentro del hospedero y produce autoinfección o un ooquiste de pared gruesa que se excreta en el entorno (Rossle y Latif, 2013).

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión que analice los métodos para la identificación y diagnóstico de las infecciones causadas por protozoarios intestinales.

## Métodos para el diagnóstico de protozoarios intestinales

Los métodos para la búsqueda de *Blastocystis* spp, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium* spp son: métodos microscópicos, moleculares e inmunológicos (Dacal *et al.*, 2020; Balsalobre y Alrcón, 2017). La metodología utilizada desde el siglo XIX fue la microscopia; los métodos moleculares como PCR se empezaron a utilizar en la década de los noventa, y los métodos inmunobiológicos son los más recientes, a partir de los inicios del siglo XIX.

### Métodos Microscópico

El método más utilizado para detección en muestras de materia fecal es el examen Coproparasitoscópico (CPS), con éste se da un acercamiento en la búsqueda de infecciones parasitarias causadas por parásitos protozoarios como: *Blastocystis* spp, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*; en el caso de *Cryptosporidium* spp se utiliza la tinción de Ziehl-Neelsen y tinción de Kinyoun.

En el caso de las amibas, las especies más encontradas son *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*, especies morfológicamente idénticas. Una característica diagnóstica de

*Entamoeba histolytica* es la presencia de eritrocitos intracitoplasmáticos, los eritrocitos no siempre son visibles por lo que en ausencia de esta característica diagnóstica se deben reportar como *Entamoeba histolytica / dispar*.

Primero se realiza un CPS en búsqueda de quistes de 10 a 16  $\mu\text{m}$  que posean en su interior 4 núcleos para el caso de quistes maduros, y de 1 a 3 núcleos para quistes inmaduros. Posteriormente se puede realizar tinción tricrómica para identificar trofozoitos de *Entamoeba histolytica / dispar*; los trofozoitos tienen un diámetro de 20 a 40  $\mu\text{m}$  y se identifican por las siguientes características morfológicas: poseen proyecciones citoplasmáticas (pseudópodos), tienen un núcleo, cromatina uniformemente distribuida en la membrana nuclear con un cariosoma central pequeño y el citoplasma es finamente granular con bacterias o desechos (Chávez, 2008).

Para *Blastocystis spp*, a partir del CPS, se realiza una búsqueda de formas vacuolares o de quistes; la forma vacuolar es la más encontrada e identificada, puede medir de 5  $\mu\text{m}$  a 60  $\mu\text{m}$  y está constituida por una gran vacuola central que ocupa una gran porción del espacio intracelular; este cuerpo además refracta ante el microscopio lo cual hace que sea una manera de identificarlo. Los quistes es otra forma de identificar a *Blastocystis spp* a través de CPS, pero requiere mucha experiencia por parte del analista, ya que son cuerpos muy pequeños que miden de 3 a 6  $\mu\text{m}$  y pueden ser confundidos fácilmente entre la materia orgánica en la muestra de la materia fecal (Villalobos *et al.*, 2015).

Para la identificación morfológica de *Giardia lamblia* se realiza una búsqueda de trofozoitos, por lo general son cuerpos que permanecen fijados a la mucosa intestinal y forman quistes que caen a la luz intestinal que son eliminados con las heces, por lo que generalmente lo que se encuentra en un CPS son quistes de *Giardia lamblia* y en ocasiones trofozoitos (Guerrero, 2008).

Para el caso de *Cryptosporidium spp* se realiza la búsqueda de ooquistes en materia fecal, el método microscópico más utilizado es a través de tinción de Kinyoun o Ziehl-Neelsen, éstas se utilizan para poder diferenciar entre ooquistes de *Cryptosporidium spp* y de levaduras presentes en las materias fecales, esto se logra ya que *Cryptosporidium spp* es ácido-alcohol resistentes a diferencia de las levaduras que no lo son (Sánchez *et al.*, 1998).

Para la búsqueda de parásitos protozoarios en muestras de agua es necesario primero realizar filtraciones al agua o floculación, por lo que los autores proponen métodos de filtración y floculación para el estudio de parásitos protozoarios en agua. Posteriormente, a la filtración o floculación se utilizan los métodos microscópicos ya citados dependiendo del parásito que se busca (Hemmati *et al.*, 2015; Gallego *et al.*, 2014).

Existen otros métodos como: sedimentación por centrifugación por flujo continuo, sistema de filtro espumoso comprimido y ultrafiltración sistema filtro de fibra horadada; estos métodos se agruparon ya que están enfocados para una posterior identificación de protozoarios intestinales mediante técnicas inmunobiológicas, a diferencia de los métodos de filtración y floculación que son mencionados por autores que posteriormente identificaron con técnicas microscópicas y moleculares.

El método de filtración de agua consiste en recolectar de 15 a 20 litros de agua, que se filtran a través de un filtro de acetato de celulosa, posteriormente debe ser lavado con *Tween* 80, se vuelve a filtrar por gasas, se centrifuga y al sedimento se coloca solución salina para después realizar análisis microscópicos o métodos moleculares. El método de floculación consiste en una combinación de reactivos que aumentan la densidad de los parásitos de manera que éstos precipiten, lo que permite análisis microscópicos e inmunobiológicos (Gallego *et al.*, 2014). Los reactivos que se utilizan son cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), ajustando el pH a 10 (Mora *et al.*, 2010).

## Métodos moleculares

Los métodos moleculares han innovado el diagnóstico parasitológico ya que representan un método alternativo a los métodos convencionales y poseen la ventaja que tienen una elevada sensibilidad y especificidad (Balsalobre y Alarcón, 2017).

El primer paso para los métodos moleculares es obtener el material genómico de los microorganismos presentes en una muestra, para esto es necesario realizar extracción de DNA, éste es un paso previo importante para la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), debido a que entre más material genómico y de mejor calidad se extrae hay probabilidades de obtener mejores resultados en los análisis por PCR (Yoshikawa *et al.*, 2011). De tal manera que es necesario seleccionar el método de extracción más adecuado para cada tipo de muestra, ya sea fecal, de agua o de alimentos. En el caso de muestras de materia fecal y de agua hay métodos de extracción en los que se utilizan equipos o kits comerciales, diseñados por diferentes distribuidores. También hay métodos de extracción generales como el de fenol-cloroformo, pero con modificaciones en el amortiguador de lisis, estos métodos de extracción se organizan por tipo de muestra y autor en la Tabla 1.

Tabla 1. Métodos para la extracción de DNA en muestras fecales y de agua

Tipo de muestra	Método	Autor
Heces fecales	Método de fenol – cloroformo con modificaciones en el buffer	Rivera <i>et al</i> , 1996
	Kit ZR Fecal DNA (Zymo Research) QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen)	Yoshikawa <i>et al</i> , 2011
	Método de fenol – cloroformo – alcohol isoamílico	Cardona <i>et al</i> , 2013
	Método de fenol – cloroformo Kit de DNA IQTM Casework Sample	Sandoval, 2014
	Método de arena	Karasartova <i>et al</i> , 2018
Agua	Kit UltraClean Water DNA Isolation	Leelayoova <i>et al</i> , 2008
	Método de CTAB/PVP con modificaciones	Muñiz <i>et al</i> , 2009
	Método de fenol – cloroformo	Hemmati <i>et al</i> , 2015

Hay una gran variedad de kits comerciales para la extracción de DNA en muestras de materia fecal. Se han evaluado los cinco kits comerciales mas utilizados para la extracción de DNA en muestras de materia fecal: QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen), MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche), ZR Fecal DNA Kit (Zymo Research), QuickGene SP Kit DNA (FujiFilm), NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel), éstos se evaluaron por la cantidad de muestras positivas por PCR que obtuvo cada kit.

Los kits que obtuvieron mayor número de muestras positivas por PCR fueron: ZR Fecal DNA Kit (Zymo Research) con 94% de muestras positivas, seguido de QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) con 48% de muestras positivas (Yoshikawa *et al.*, 2011).

La técnica de fenol-cloroformo es un método que se utiliza con mayor frecuencia para la extracción de DNA en muestras materia fecal, sin embargo, se han realizado modificaciones, principalmente en el contenido de la solución de lisis (Rivera *et al.*, 1996), utilizando un amortiguador de lisis con las siguientes concentraciones: EDTA 5 mM, proteinasa K 0.3 mg/ml, Tris-base 50 mM, SDS 1% a pH 8. Este buffer permite una mayor eficiencia en los resultados obtenidos en la extracción de DNA en muestras de materia fecal, a los que posteriormente se les realizará búsqueda de protozoarios intestinales por PCR (Rivera *et al.*, 1996).

En el caso de las muestras de agua, no hay descripción en la literatura de algún método o kit comercial que tenga mayor especificidad, no obstante, diferentes autores han utilizado los métodos de fenol-cloroformo, CTAB/PVP (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio / polivinilpirrolidona), con modificaciones y el kit UltraClean Water DNA Isolation (MO BIO Laboratories), mostrando resultados positivos en la detección por PCR (Rivera *et al.*, 1996).

La PCR permite la identificación de parásitos, al amplificar una secuencia específica de DNA. Existe una amplia variedad de métodos de PCR para la detección de protistas entéricos, como PCR convencional, anidadas, semianidadas, multiplex, en tiempo real, asociada al análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) y basadas en mecanismos de amplificación isotérmica (PCR-LAMP) (Dacal *et al.*, 2020).

Las PCR anidadas y semianidadas se utilizan tanto para la detección, como para la genotipificación de patógenos protozoarios. La PCR multiplex, debido a la rapidez, están diseñadas para fines diagnósticos para laboratorios clínicos (Balsalobre y Alarcón, 2017).

El método de amplificación isotérmica mediada por un loop (LAMP), inicialmente fue diseñada para emplearse como técnica para estudios epidemiológicos bajo condiciones adversas y no suele ser una opción práctica en el laboratorio clínico (Dacal *et al.*, 2020).

La PCR convencional suele ser utilizada en laboratorios de investigación, algunos primeros utilizados en PCR convencional (Villalobos *et al.*, 2015) permiten la genotipificación, en este caso de *Blastocystis* spp por los subtipos 1, 2, 3 y 7, pero generalmente para una genotipificación más específica es necesario secuenciar los amplicones y, a través de métodos bioinformáticos, se puede genotipificar al parásito en estudio (Pestechian *et al.*, 2014; Hemmati *et al.*, 2015).

Diferentes autores (Haque *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2004) han utilizado PCR multiplex con resultados favorables, utilizaron primers para diferentes genes dependiendo

del protozoo, a diferencia de otros que utilizaron primers para el gen 18S rDNA, pero seleccionando una región específica por protozoo (Jeong *et al.*, 2016).

La PCR multiplex es un método práctico y rápido, ya que puede diagnosticar varios protozoos por PCR (Haque *et al.*, 2007). En la modalidad PCR multiplex en tiempo real se agrega una secuencia con fluoróforos, lo que permite cuantificar los resultados, esto permite realizar la amplificación y la detección en un mismo paso, ya que correlaciona el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia (Jeong *et al.*, 2016).

La PCR multiplex posee características como alta especificidad, amplio rango de detección y rapidez en la visualización del producto (Haque *et al.*, 2007).

En el caso de muestras de agua, primero se debe realizar el método de filtración, posteriormente la extracción de DNA y finalmente la PCR convencional o multiplex. Cuando hay que analizar diferentes tipos de muestras, como alimentos o suelo contaminado es recomendable utilizar PCR convencional, acompañado de un análisis bioinformático previo para conocer si los primers no se cruzan con secuencias encontradas en una nueva muestra por analizar, esto se corrobora realizando un alineamiento por el método de BLAST (Herramienta básica de búsqueda de alineación local), el cual se puede realizar en plataformas como NCBI y softwares como MEGA, Clustalx o SeaView. Este análisis permite obtener resultados de porcentaje de identidad entre las secuencias alineadas.

Si se tiene cuidado de estas características la PCR convencional puede ser el método molecular más accesible para laboratorios de investigación y diagnóstico.

## Métodos inmunobiológicos

En los últimos años, se han realizado importantes avances en el estudio de la respuesta inmune, que ha permitido el avance en los sistemas de detección inmunobiológicos, entre ellos los métodos de detección de coproantígenos (Rodríguez y Rivera, 2011).

Los coproantígenos son productos específicos de un parásito que se eliminan en las heces del paciente y que son susceptibles de ser detectados por técnicas inmunobiológicas, las que se basan en la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo. La inmunodetección de coproantígenos utiliza anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen específicamente los productos eliminados por los parásitos que invaden el intestino del humano (Balsalobre y Alarcón, 2017). En la Tabla 2 se muestran las técnicas inmunobiológicas más citadas en el diagnóstico de protozoarios intestinales.

No hay reportes de métodos inmunobiológicos que permitan tipificar parásitos protozoarios, ya que aún no se profundiza la investigación de antígenos particulares por subtipo de parásito.

**Tabla 2. Pruebas inmunobiológicas para el diagnóstico de *Blastocystis* spp, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium* spp**

Método	Protozoo	Kit	Autor
ELISA	<i>Blastocystis</i> spp	Copro ELISA Blastocystis (Eagle Biosciences)	Dogruman <i>et al.</i> , 2015
	<i>Entamoeba histolytica</i>	CELISA Path (Cellabs)	García y Rodríguez, 2007
	<i>Giardia lamblia</i>	Giardia 2nd Generation ELISA (AccuDiag)	Rivera, 1996
	<i>Cryptosporidium</i> spp	Cryptosporidium microplate assay (IDEXX)	Mohammed <i>et al.</i> , 2018
Inmunofluorescencia	<i>Blastocystis</i> spp	Blasto-Fluor (Antibodies Inc.)	Dogruman <i>et al.</i> , 2015
	<i>Cryptosporidium</i> spp	Giardia-CEL (Cellabs)	McHardy <i>et al.</i> , 2014
	<i>Giardia lamblia</i>	Crypto-CEL (Cellabs)	

## CONCLUSIONES

Las técnicas que se utilizan para el estudio de los parásitos intestinales se van renovando a través del tiempo, de tal manera que cada vez son más sensibles. El conocimiento de estas técnicas permite mejorar el estudio de protozoarios.

El estudio de los parásitos a través de microscopia de luz es un método que no es muy sensible, requiere de experiencia por parte del analista, sin embargo, representan el primer acercamiento para conocer y aprender sobre la morfología de los parásitos intestinales.

Los métodos moleculares son técnicas que se han vuelto indispensables para el estudio de las parasitosis intestinales, por lo que generar información nueva y organizar la información ya existente permite identificar cuál es la técnica que se deberá implementar dependiendo del tipo de muestra.

Los métodos inmunobiológicos son técnicas sensibles que pueden mejorar los diagnósticos en los laboratorios clínicos. En un laboratorio de investigación su uso es favorable como método de detección rápida, además que pueden apoyar como prueba control de los resultados de la microscopía y la PCR.

El análisis genético de *Blastocystis spp*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium spp* ha arrojado nueva información respecto a su ubicación taxonómica, subclasificación y epidemiología, incluyendo modos de transmisión y prevalencia. Por lo que los métodos propuestos pueden confirmar la persistencia de las parasitosis intestinales como un importante problema de salud pública y contribuir a la comprensión de diferentes factores ambientales que participan en su transmisión.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev*, (14): 447- 475.
- Balsalobre, L. Alarcón T. (2017). Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 53(6): 367-376.
- Barrón, M. P., Rodríguez, R. G. Quiñones, Y. (2010). Inhibición del crecimiento de *Giardia Lamblia* por acción del extracto acuoso y metanólico de semillas de *Cucurbita Pepo*. *Rev Iber Inv Des Educ*, 1(1): 1- 17.
- Bouzig, M., Hunter, P. R., Chalmers, R. M. Tyler, K. M. (2013), *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev*, 26(1): 115-134.

- Campos, J. M., Bustos-Martínez, J., Martínez, I., Monroy, M. C., Hamdan-Partida, A. (2018). Detection and typing of *Blastocystis* spp. in oysters (*Crassostrea virginica*) collected in Actopan River, Chachalacas, Veracruz. *Int J Fish Aquat Stu*, 6(2): 511-514.
- Cardona, E., Castañeda, S., Álvarez, M. E., Pérez, J. E., Rivera, F. A., López, G. A. (2014). Comparación de métodos convencionales y moleculares para la detección de *Giardia lamblia* en heces humanas. *Rev Luna Azul*, 1(38): 159-170.
- Chacón, N., Durán, C., de la Parte M. A. (2017). *Blastocystis* sp. en humanos: actualización y experiencia clínico-terapéutica. *Bol Ven de Infectol*, 1(28): 5-14.
- Chávez, E. (2008). Diagnóstico de protozoarios intestinales frecuentes en niños. *Rev. Soc Boliv Pediatr*, 47(3): 169-177.
- Dacal, E., Köster, P. C., Carmena, D. (2020). Diagnóstico molecular de parasitosis intestinales. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 38(1): 24-31.
- Dhurga, D. B., Suresh, K. G., Tan, T. C. Chandramathi, S. (2012). Apoptosis in *Blastocystis* spp. is related to subtype. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 106(1): 725-730.
- Dogruman, F., Turk, S., Adiyaman, G., Hananel, A., Levi, L., Kopelowitz, J., Babai, O., Gross, S., Greenberg, Z., Herschkovitz, Y., Mumcuoglu, I. (2015). A novel ELISA test for laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in human stool specimens. *Parasitol Res*, 114(2): 495-500.
- Gallego, L. M., Heredia, H. L., Salazar, J. J., Hernández, M., Naranjo, M. M., Suárez, B. L. (2014). Identificación de parásitos intestinales en agua de pozos profundos de cuatro municipios. Estado Aragua, Venezuela 2011-2012. *Rev Cubana Med Trop*, 66(2):164-173.
- García, L., Rodríguez, M. (2007). Técnica de ELISA para la detección de *Entamoeba histolytica* en heces. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 25(10): 655-658.
- Gómez, J. N., Aguirre, M. (2017). Criptosporidiosis. *Rev Ciencia*, 68(1): 22-25.
- Guerrero, M. T., Hernández, Y., Rada, M. E. Aranda, A., Hernández, M. I. (2008). Parasitosis intestinal y alternativas de disposición de excreta en municipios de alta marginalidad. *Rev Cub Salud Publica*, 34(2): 1-10.
- Guillen, A., González Gallego, L., Suárez, B., Heredia, H. L., Hernández, T., Naranjo, M., Salazar, J. C. (2013). Presencia de protozoarios intestinales en agua de consumo en la comunidad 18 de mayo. Estado Aragua-Venezuela, 2011. *Bol Malariaol Salud Ambient*, 53(1): 29-36.
- Haque, R., Roy, S., Siddique, A., Mondal Rahman, S., Mondal, D., Houpt, E., Petri, W. (2007). Multiplex real-time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, and *cryptosporidium* spp. *Am J Trop Med Hyg*, 76(4): 713-717.

- Hemmati, A., Hooshmand, E., Hosseini, M. J. (2015). Identification of *Entamoeba histolytica* by Molecular Method in Surface Wate of Rasht City, IranIran. *J Public Health*, 44(2): 238-243.
- Jeelani, G., Nozaki, T. (2014). Metabolic analysis of Entamoeba: applications and implications. *Curr Opin Microbiol*, 1(20): 118-124.
- Jeong, E., Hyun, S., Jung, S., Hee, J., Pal, S., Yil, J., Wook, D., Geun, M. (2016). Multiplex Real-Time PCR Assay Targeting Eight Parasites Customized to the Korean Population: Potential Use for Detection in Diarrheal Stool Samples from Gastroenteritis Patients. *Plos One*, 11(11): 1-14.
- Karasartova, D., Gureser, A.S., Gokce, T., Celebi, B., Yapar, D., Keskin, A. (2018). Bacterial and protozoal pathogens found in ticks collected from humans in Corum province of Turkey. *PloS Negl Trop Dis*, 12(4): 223.
- Lacoste, E., Rosado, F. M., Núñez, F. A., Rodríguez, M. S., Medina, I. C., Suárez, R. (2012). Aspectos epidemiológicos de las parasitosis intestinales en niños de Vegón de Nutrias, Venezuela. *Rev Cubana Hig Epidemiol*, 50(3): 330-339.
- Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Thathaisong, U., Naaglor, T., Taamasri, P., Piyaraj Mungthin M. (2008). Drinking Water: A Possible Source of *Blastocystis* spp. Subtype 1 Infection in Schoolchildren of a Rural Community in Central Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 79(3): 401-406.
- Leitch, G. J., He, Q. (2011). Cryptosporidiosis-an overview. *J. Biomed. Res*, 25(1): 1-16.
- Levine, N. D. (1984). Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). *J Protozool*, 31(1): 94-98.
- Lipoldová, M. (2014). Giardia and Vilém Dusan Lambl. *Trop Dis*, 8(5): 1-4.
- Muñiz, H., Mondragón, F. (2009). Toxoplasma gondii, un patógeno Asesino re-emergente. *Rev Educ Bioquímica*, 28(2): 52-58
- McHardy, I. H., Wu, M., Shimizu, R., Courturier Humphries, R. M. (2014). Detection of intestinal protozoa in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*, 2(3): 712-720.
- Menocal, L. T., Caraballo, Y. I. (2014). Importancia de la vigilancia sanitaria de los parásitos en la calidad del agua, según su uso. *Rev Cubana Hig Epidemiol*, 52(2): 196-209.
- Mohammed, H. Y., Magboul, A. M., Suliman, M. A. (2018). Investigation of *Cryptosporidium* Species Antigen by ELISA Method in Stool Specimens Obtained from patients with Diarrhoea in Kosti Teaching Hospital, White Nile State, Sudan. *Eur J Acad Res*, 6(1): 11-22.
- Molina, N. B., Basualdo, J. A. (2008). *Temas de Zoonosis IV*. Buenos Aires, Argentina: Ed Asociación Argentina de Zoonosis Buenos Aires.

- Monis, P. T., Caccio, S. M., Thompson, R. A. (2009), Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol*, 25(2): 93-100.
- Mora, L., Martínez, I., Figuera, L., Segura, M., Del Valle, G. (2010). Protozoarios en aguas superficiales y muestras fecales de individuos de poblaciones rurales del municipio Montes, estado Sucre, Venezuela. *Rev Invest Clin*, 51(4): 457-466.
- Muhammad, D. A., Mohamed, A., Wahid, Y.A., Usman, M. (2013). Crypto-*Giardia* antigen rapid test versus conventional modified Ziehl-Neelsen acid fast staining method for diagnosis of cryptosporidiosis. *Asian Pac J Trop Dis*, 6(3): 212-215.
- Núñez, F. (2011). *Giardia lamblia*. En: *Microbiología y Parasitología Médicas* (31-38). 1a ed. Cuba: Editorial de Ciencias Médicas.
- Pérez, G., Rosales, M. J., Valdez, R. A., Vargas, F., Cordova, O. (2008). Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. *Rev Perú Med Exp*, 25(1): 144-148.
- Pestechian, N., Rasekh, H., Rostami, M., Ali, H., Hosseini, A. (2014). Molecular identification of *Giardia lamblia*; is there any correlation between diarrhea and genotyping in Iranian population? *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 7(3): 168-172.
- Rivera, W. L., Tachibana, H., Silva, M. A., Uemura, H., Kanbara, H. (1996). Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* DNA from cysts present in stool specimens by polymerase chain reaction: its field application in the Philippines. *Parasitol Res*, 82(7): 585-589.
- Rivero, Z. (2013). Detección de *Entamoeba moshkovskii* en humanos: un nuevo problema diagnóstico en la amibiasis. *Kasmera*, 41(1): 42-49.
- Rodríguez, C., Rivera, M. (2011). ELISA y técnica de sedimentación espontánea para el diagnóstico de infección por *Giardia lamblia* en muestras fecales de niños de Perú. *Salud Pública de Mex*, 53(6): 516-519.
- Rodríguez, J. C., Royo, G. (2000). *Cryptosporidium* y criptosporidiosis. Control Calidad SEI-MC, 1-7. Recuperado de: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/crypto.pdf>. (Consultado: 19/09/2020).
- Romero J., López, M. A. (2020). Parasitosis intestinales. AEPED. Recuperado de: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/parasitosis.pdf> (Consultado: 19/09/2020).
- Rossle, N. F., Latif, B. (2013). Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(11): 916-924.
- Sandoval, M. (2014). Evaluación prospectiva de linajes de *Trypanosoma cruzi* octodondegus naturalmente infectados. Recuperado de: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131909>

- Sánchez, M., Rodríguez, J., Canut, A., Dovigo, C. (1988). The detection of *Cryptosporidium* spp. In the feces of a preschool population: a comparison of 5 staining methods. *Rev Clin Esp*, 192(2): 63-66.
- Shirley, D. T., Farr, L., Watanabe, K., Moonah, S. (2018). A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis. *Open Forum Infect*, 5(7): 1-9.
- Tanyuksel, M., Petri, W. (2003). Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin Microbiol Rev*, 16(4): 713-729.
- Tyzzer, E. (1907). A sporozoon found in the peptic glands of the common mouse. *Proc Soc Exp Biol Med*, 5(1): 12-13.
- Villalobos, D., López, A., Frutos, J. (2015). Estudio comparativo de tres métodos coproparasitológicos en el diagnóstico de parasitosis intestinales. *Rev San mil Mex*, 69(4): 330-335.
- Walter, Q. B., Querales, L. J. (2008), Parásitos protozoarios entéricos en ambientes acuáticos: Métodos de concentración y detección. *Interciencia*, 33(6): 418-423.
- Wang, Z., Vora, G. J., Stenger, D. A. (2004). Detection and genotyping of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* by oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol*, 42(7): 3262-3271.
- Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Dionigia, M., Texier, C., Delbac, F., Alaoui, H. (2013). *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis*, 1(5): 167-178.
- World Health Organization (WHO). (2007). *Guidelines for drinking water quality. Addendum: Microbial agents in drinking water*. 2a. ed., Switzerland.
- Ximénez, C., Morán, P., Ramos, F. (2007). Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Med Int Mex*, 23(5): 398-407.
- Yoshikawa, H., Dogruman, F., Turk, S., Kustimur, S., Balaban, N., Sultan, N. (2011). Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitol Res*, 4(109): 1045-1050.

