

ARTÍCULO

Tipos morfológicos, número de parásitos por campo y carga parasitaria de *Blastocystis sp* proveniente de pacientes sintomáticos y asintomáticos

Ana Karina Hernández¹, Emilia Elena Barrios², Sánchez Lissette², Wolfan Araque², Víctor Delgado²

RESUMEN

El papel patógeno de *Blastocystis sp* es controversial, por lo que es importante definir criterios diagnósticos que permitan dilucidar tal rol. Se evaluó la morfología de *Blastocystis sp*, número de parásitos por campo y por gramo de heces, en sujetos con sintomatología general y portadores sanos. El estudio fue descriptivo y el diseño no-experimental. La observación y conteo al microscopio se hizo en diez campos consecutivos de 40X y en relación al peso de las heces en gramos, en parásitos teñidos con lugol. Se encontró 77% de muestras positivas para *Blastocystis sp*, 52% provenientes de pacientes con síntomas como flatulencia 6 (24%), dolor abdominal 5 (20%), náuseas 2 (8 %), diarrea 6 (24%) y estreñimiento 6 (24%). Los rangos de parásitos por campo más frecuente en sintomáticos fueron 0-3 (74%) y 10-12 (26%), mientras que 100% de los pacientes asintomáticos presentaron *Blastocystis sp* en el rango 0-3. Los pacientes asintomáticos presentaron menor número de parásitos por gramo de heces, en el rango de 0-3 y el rango 7-10 con altas cargas parasitarias sólo fue observado en sintomáticos. Se encontró menor cantidad de formas granulares en ambos grupos, en el rango 0-3 en sintomáticos: 85% vacuolares y 15% granulares; 76% vacuolares y 24% granulares, en asintomáticos. En el rango 10-12, 98% vacuolares y 2% de granulares, en sintomáticos. En conclusión, el estudio de las morfologías, el reporte de la cuantificación diferencial de formas por campo y la cuantificación del número de parásitos por campo pueden contribuir a optimizar el diagnóstico y el manejo quimioterapéutico del paciente.

Palabras clave: *Blastocystis sp*, diagnóstico coproparasitológico, morfología, síntomas.

ABSTRACT

Morphological types, number of parasites per field and parasite load of *Blastocystis sp* from symptomatic and asymptomatic patients

The pathogenicity of *Blastocystis sp* is controversial, therefore, it is important to define diagnostic criteria for its determination. We evaluated the morphology of *Blastocystis sp*, number of parasites per field and per gram of faeces in patients with general symptoms and in healthy carriers. The study was a descriptive and non-experimental design. The microscopic observation and counting was done in ten consecutive fields in relation to 40X and stool weight in grams. We found 77% of samples positive for *Blastocystis sp*, 52% from patients with symptoms such as flatulence 6 (24%),

abdominal pain 5 (20%), nausea 2 (8 %), diarrhea 6 (24%) and constipation 6 (24%). The ranges of parasites per field more frequent in symptomatic patients were 0-3 (74%) and 7-10 (26%); and in the asymptomatic group 100% of the patients were in the 0-3 range. In the 0-3 range asymptomatic patients had a lower number of parasites per gram of feces, while in the 7-10 range high parasite loads were observed only in symptomatic patients. Less granular forms in relation to vacuolar ones were found in both groups, in the 0-3 range of the symptomatic group, 85% vacuolar and 15% granular, and 76% vacuolar, and 24% granular in the asymptomatic. In conclusion, the study of the morphologies, the quantification of differential forms by field and the quantification of the number of parasites per field contributes to the technical optimization of routine coproparasitology.

Key words: *Blastocystis sp*, coproparasitology diagnosis, morphology, symptoms.

INTRODUCCIÓN

El protozooario polimórfico *Blastocystis sp* se ubica dentro del grupo de parásitos emergentes, caracterizado por su alta prevalencia en nuestro país (60%) (1). La infección es transmitida principalmente vía fecal-oral, y se encuentra asociada a síntomas en 61,6% de los casos, mientras que en 41,6% no existe tal asociación (2,3). La identificación en el laboratorio clínico se realiza a través de una preparación húmeda con solución salina fisiológica y lugol (4), en la cual se observan cuatro morfologías: las formas vacuolar, granular, ameboide y quística, a pesar de que en la literatura se describen hasta seis morfologías del parásito (5). Sin embargo, el empleo de las coloraciones Giemsa, Hematoxilina-Eosina, Wright y tricrómica permite realizar una evaluación más detallada del parásito y hacer un diagnóstico más confiable (4).

La forma vacuolar o de cuerpo central es observada en aproximadamente 98% de los casos, en heces frescas y constituye la principal forma diagnóstica (5), presenta 2-200 µm de diámetro y también es frecuentemente observada en cultivo. La forma granular es similar a la vacuolar excepto que presenta gránulos en su citoplasma y en la vacuola central (6,5-80 µm) y es observada en cultivos no-axenizados y en heces (6). La forma ameboide, raramente reportada en pacientes con diarrea, presenta uno o dos pseudópodos; las formas medidas en cultivo presentaban entre 10 y 15 µm (6). La forma quística es la morfología más pequeña (2 a 5 µm) por lo que puede ser confundida con detritus en las heces, pueden ser ovales o esféricas y se encuentra protegida por una pared quística multilaminar, su citoplasma puede contener de 1 a 4 núcleos y pequeñas vacuolas (5,6). Además, con menor frecuencia se pueden observar las formas avacuolares (aproximadamente 5 µm) y multivacuolares (5-8µm) (7). La gran variabilidad

¹Departamento de Ciencias Morfológicas y Forenses, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas.

²Laboratorio de Helmintología del Instituto BioMolP, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

Autor de Correspondencia:
e-mail: barrios.emilia@gmail.com

Recibido: Noviembre 2011 **Aprobado:** Julio 2012

observada en medios de cultivo determina que los resultados provenientes de estos ensayos pueden dar origen a interpretaciones erróneas de la biología celular de este protozoo (6).

El parásito es considerado un patógeno controversial que ocasiona manifestaciones gastrointestinales y generales inespecíficas, las cuales parecen estar asociadas a los siguientes factores: (a) número de parásitos, (b) inmunosupresión y pacientes inmunocomprometidos, (c) relación con sintomatología gastrointestinal (diarrea, dolor abdominal, distensión abdominal, flatulencia, cólico, estreñimiento, prurito perianal, malestar o molestias intestinales, tenesmo, esteatorrea y leucocitos en heces) y no intestinales como: náuseas, mareos, pérdida de peso, vértigo, anorexia y fiebre (6-10). Adicionalmente, en casos severos se presentan complicaciones como rash cutáneo y colitis, entre otros (5, 7, 8). Por otra parte, en pacientes infectados con *Blastocystis sp* con síndrome diarreico se encontró asociación con artritis reactiva y manifestaciones alérgicas (9, 8). Sin embargo, otros pacientes no presentan sintomatología específica (10).

Por tal razón, algunos investigadores sugieren que pudieran existir distintas variantes del parásito que determinan la patogenicidad (11), posiblemente asociadas a enzimas producidas por éste (12). Actualmente se encuentran establecidos diez subtipos de *Blastocystis sp* basado en el análisis de los genes de la subunidad de ADN ribosomal (13). Sin embargo, la capacidad de producir sintomatología en ratas infectadas sólo fue detectada en 4 subtipos. Cambios de moderados a severos fueron encontrados en las ratas infectadas con aislados provenientes de pacientes sintomáticos. El subtipo 1 ocasionó patología grave, mientras que los subtipos 3 y 4 correspondieron a aislados patógenos y no-patógenos, respectivamente (14). En aislados humanos sintomáticos el subtipo 3 fue predominante y parece estar relacionado a la transmisión de humano a humano (15).

Los hallazgos obtenidos en modelos experimentales y en humanos infectados evidencian la necesidad de caracterizar morfológicamente a *Blastocystis sp* provenientes de pacientes con síntomas y en portadores sanos, a fin de optimizar el reporte diagnóstico en función del comportamiento patogénico o comensal del parásito, identificando y cuantificando las morfologías predominantes en cada grupo de pacientes. En el presente estudio se evaluó la morfología de *Blastocystis sp* con relación al número de parásitos por campo y por gramo de heces, así como con la sintomatología presente en el paciente.

MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra estuvo conformada por heces obtenidas de voluntarios del municipio Naguanagua, estado Carabobo-Venezuela, que asistieron al laboratorio de Helmintos del Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP) o al Departamento de Estudios Clínicos, escuela de Bioanálisis (Universidad de Carabobo) y estuvo representada por un total de 119 pacientes, evaluadas de forma descriptiva no experimental y seleccionadas de forma intencional. A fin de cumplir principios bioéticos, un formato de consentimiento informado fue llenado por los

representantes de los pacientes menores de edad o por los pacientes adultos, a fin de documentar su conformidad con que las muestras fueran empleadas en el desarrollo de este trabajo de investigación. Las muestras de sujetos referidos con síntomas generales (diarrea, náuseas, vómito, estreñimiento, dolor abdominal, dolor de cabeza y flatulencia) por el médico tratante o asintomáticos fueron examinadas microscópicamente para la detección de *B. hominis* empleando examen directo con Solución Salina Isotónica 0,85 % p/v (SSI) y lugol, y para la identificación y descarte de huevos, larvas y coccidios, Kato, Baerman y Kinyoun, respectivamente.

Semi-cuantificación y cuantificación de *Blastocystis sp*. A las muestras positivas únicamente para *B. hominis*, se les realizó un conteo de formas parasitarias por campo de 400X, en diez campos consecutivos y luego se obtuvo el promedio por tipo morfológico. Seguidamente, las heces se pesaron en una balanza digital (Acculab VII-600), se resuspendieron en 50 mL de SSI y se tomaron 20 µL de la suspensión para contar las formas de *Blastocystis sp* en forma diferencial empleando objetivo de 40X, contando toda la superficie cubierta por la lámina cubreobjetos, en muestras por triplicado a fin de determinar el número de parásitos por gramo de heces. Para ello, el conteo promedio de cada muestra (correspondiente a 20 µL de la muestra resuspendida) se multiplicó por el volumen en el que fue resuspendida la muestra de heces, y este valor fue dividido entre los 20 µL que fueron tomados para contar. El valor obtenido se dividió entre el peso de las heces en gramos, para obtener la carga parasitaria por gramos de heces.

Análisis de los datos. La frecuencia de pacientes sintomáticos y asintomáticos evaluados en el estudio, bajo los criterios referidos previamente, signos y síntomas predominantes en cada grupo se expresaron en porcentaje. Los *Blastocystis sp* totales en las muestras de heces fueron expresados como el promedio $\pm$ la desviación estándar de parásitos por gramo de heces. La semi-cuantificación del número de parásitos por campo se expresó en rangos de parásitos observados en diez campos consecutivos del microscopio (Nikon E600) con objetivo de 40X. El recuento diferencial de formas vacuolares y granulares se expresó en porcentaje.

RESULTADOS

Inicialmente fueron analizadas 119 muestras, de las cuales 92 (77%) fueron positivas sólo para *Blastocystis sp* y de éstas se emplearon 48 (52,2%) adecuadas en cantidad para el conteo. Las muestras positivas provenientes de pacientes sintomáticos fueron 25 (52%). Entre los síntomas estuvieron: flatulencia 6 (24%), estreñimiento 6 (24%), diarrea 6 (24%), dolor abdominal 5 (20%) y náuseas 2 (8 %). Dos de los pacientes presentaron dolor de cabeza asociado con otros síntomas, entre ellos flatulencia y diarrea. En cuanto a la consistencia de las heces, 12% de los pacientes sintomáticos y 4,3% de los asintomáticos presentaron heces blandas.

Al estimar el número de parásitos por campo se encontró que los rangos más frecuentes en pacientes sintomáticos

fueron los rangos 0-3 (74%) y 10-12 (26 %). Mientras que en los asintomáticos 100% de los parásitos se encontró en un rango de 0-3. Al relacionar la carga parasitaria con el número de parásitos por campo, se observó que en el rango de 0-3 el número de parásitos por gramo de heces fue 514142 ± 260870 en sintomáticos, y 192922 ± 115826 en asintomáticos, lo que corresponde a un número de 2,7 veces más parásitos en sintomáticos con respecto a asintomáticos. Mientras que el rango 10-12 parásitos por campo sólo se observó en pacientes sintomáticos y correspondió a 839618 ± 418228 parásitos por gramo de heces y corresponde a 4,4 más carga parasitaria en comparación con la carga en el rango 0-3 de pacientes asintomáticos.

En la identificación de las morfologías de *Blastocystis sp* en heces, se observó una menor cantidad de formas granulares en relación con las vacuolares, en ambos grupos de pacientes donde los rangos 0-3 mostraron un promedio de 421596 (82%) de formas vacuolares y 92546 (18%) de formas granulares en los pacientes sintomáticos. En el mismo rango, los asintomáticos presentaron 146621 (76%) formas vacuolares y 16792 (24%) formas granulares. En el rango 10-12, presentes sólo en sintomáticos, se observó de manera similar predominio de formas vacuolares: 822826 (98%) de vacuolares y 16792 (2%) de formas granulares.

DISCUSIÓN

En humanos y modelos experimentales se demostró que *Blastocystis sp* no invade la mucosa del colon, pero es capaz de alterar la permeabilidad, inducir inflamación y apoptosis en linajes celulares (16, Poirier et al 2012). En el presente estudio se evaluó la morfología de *Blastocystis sp*, número de parásitos por campo y por gramo de heces, y su relación con la sintomatología presente en el paciente, y se observó una tendencia a una relación entre consistencia de las heces y presencia del parásito. En este sentido, previamente se ha demostrado la relación entre la presencia de *Blastocystis sp* y sintomatología gastrointestinal, así como del predominio de síntomas como flatulencia, dolor abdominal, diarrea (16, 17).

La presencia de rangos con menos de tres parásitos por campo y menos del doble de parásitos por gramo de heces, en los pacientes asintomáticos, así como rangos superiores a nueve parásitos por campo y altas cargas parasitarias por gramo de heces en los sintomáticos, indica que existe cierta tendencia a la concordancia entre el reporte de parásito por campo y la carga parasitaria del paciente; por tanto, es recomendable que de forma rutinaria se reporte tal valor, corroborando lo encontrado por otros autores, quienes señalan que existe relación entre la presencia de cinco *Blastocystis sp* o más por campo y sintomatología intestinal, por lo que concluyen que no es necesario grandes cantidades del protozoario para ocasionar sintomatología, pero sí para que ésta sea más severa (9,10,11). Sin embargo, los valores deben ser analizados en forma cuidadosa porque observamos que en los pacientes asintomáticos también existe una carga parasitaria alta en el rango de 0-3, aunque menor a la de los pacientes sintomáticos, lo que pudiera indicar que el número de parásitos podría no ser predictivo del desarrollo de síntomas en los pacientes en ese rango, como se ha

demostrado previamente, ya que pacientes con baja carga parasitaria pueden presentar síntomas gastrointestinales. Por tanto, la presencia de infecciones leves no excluiría la posibilidad de presentar sintomatología (14) y ésta podría relacionarse a otros factores independientes del número de parásitos, como son el tipo de morfología o la capacidad del parásito para producir sintomatología (17). Resulta interesante que el rango 10-12 sólo se observó en los pacientes sintomáticos, lo que pudiera indicar que a medida que aumenta la carga parasitaria se evidencia una relación directa entre los contejes por campo y la carga parasitaria. Desde un punto de vista práctico, en la rutina del laboratorio clínico, la aparente concordancia entre el conteje por campo y la carga parasitaria por gramo de heces es un aporte sustancial, puesto que los contejes por campo y por gramo de heces más altos no fueron observados en sujetos sin sintomatología, lo cual podría ser útil como criterio de patogenicidad de éste protozoario tan controversial.

El predominio de formas vacuolares en ambos grupos de pacientes corrobora que la forma vacuolar es la forma más frecuente en las heces (5), mientras que las diferencias en cuanto a cantidad referidas en los contejes por campo o en base al número de estas formas por gramo de heces confirma lo descrito previamente en cuanto a que las formas vacuolares se encuentran siempre asociadas a sintomatología (1)

En relación a las morfologías de *Blastocystis sp* en las heces existen opiniones encontradas. Recientemente se demostró que las formas ameboides aisladas de heces de pacientes sintomáticos mantenidas en cultivo poseen capacidad de multiplicación y signos de actividad metabólica, por lo que los autores proponen que esta morfología debe ser considerada un indicativo de patogenicidad (7, 17), en especial si se presentan cinco o más parásitos por campo, en ausencia de otro patógeno que pueda ser responsable de las manifestaciones clínicas (17, 18, 19). En el presente estudio en pacientes sintomáticos en el rango 10-12 parásitos por campo, encontramos la morfología vacuolar casi exclusivamente, sin embargo, es importante recordar que estudios del ciclo de vida de este protozoario refieren que las formas ameboides encontradas en cultivo *in vitro* proceden de la división binaria de formas vacuolares (21).

Se concluye, que el estudio de las morfologías, la cuantificación diferencial de formas por campo y la cuantificación del número de parásitos por campo en las heces en sujetos con y sin sintomatología, en ausencia de otros agentes patógenos, contribuye en la optimización del protocolo de trabajo para el diagnóstico de *B. hominis*, empleando las técnicas coproparasitológicas rutinarias de diagnóstico directo.

REFERENCIAS

1. Devera R, Angulo V, Amaro E, Finali M., Franceschi G, Blanco Y, Tedesco R., Requena I, Velásquez V. Parásitos intestinales en habitantes de una comunidad rural del Estado Bolívar, Venezuela. Rev Biomed 2006; 17:259-268.

2. Rondón L, Vargas M. *Blastocystis hominis*: Estudio propectivo, sintomatología y factores epidemiológicos asociados. *Rev Gastroenterol* 2003; 23: 29-35.
3. Suresh K, Ramachandran NG, Ho L, Yap E, Singh M. In vitrol encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 1993; 79: 456-460.
4. Moe K, Singh M, Howe J, Ho L, Tan S, Chen X, Yap E. Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitol Res* 1996; 82(5): 439-444.
5. Tan KSW. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21 (4): 639-665.
6. Stenzel DJ, Boreham FL. *Blastocystis hominis* Revisited. *Clin Microbiol Rev* 1998; 9(4): 563-584.
7. Devera RA, Velásquez VJ, Vásquez M, Azacón B, Jiménez M. *Blastocystis hominis*: criterios de patogenicidad. *Saber* 2000; 12:23-28.
8. Barahona L, Maguiña C, Náquira C, Terashima A, Tello R. Sintomatología y factores epidemiológicos asociados al parasitismo por *Blastocystis hominis*. *Parasitol Latinoam* 2002; 57: 96-102.
9. Lakhanpal S, Cohen S, Fleischmann R. Reactive arthritis from *Blastocystis hominis*. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 251-253.
10. Gúzman 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 Soc Venezol Microbiol* 2008; 28: 66-71.
11. Domínguez V. Heterogeneidad genética de *Blastocystis hominis*: implicaciones patogénicas. Universidad de Valencia, Tesis Doctoral 2003; p 113-118. Consultado el 30 de mayo del 2008. Disponible en: <http://www.tdx.cat/TDX-0707104-142804>.
12. Barrios E, Hernández A, Peña N, Villanueva J, Pinto V, Delgado V, Araque W. *Blastocystis hominis*: patrones de isoenzimas en aislados humanos. *Salus* 2009; 13: 39-42.
13. Santín M, Gómez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp from humans and animal 2011. Consultado el 20 de abril de 2012. Disponible en: DOI 10.1007/s00436-010-2244-9.
14. Hussein EM, Hussein AM, Eida MM, Atwa MM. Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis*. Egyptian isolates in experimentally infected rats. *Parasitol Res* 2008; 102: 853-860.
15. Meloni D, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, Chabé M, Delhaes L, Dei-Cas E, Delbac F, Fiori PL, Di Cave D, Viscogliosi E. Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. Isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitol Res* 2011; 109: 613-619.
16. Poirier P, Waerzyniak I, Vivarés CP, Delbac F, El Alaoui H. New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLOS Pathogens* 2012; 8(3). Consultado el 27 de Julio de 2012. Disponible en: <http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1002545>.
17. Barahona L, Maguiña C, Náquira C, Terashima A, Tello R. Sintomatología y factores epidemiológicos asociados al parasitismo por *Blastocystis hominis*. *Parasitol Latinoam* 2002; 57: 96-102.
18. Boreham P, Stenzel D. *Blastocystis* in humans and animals: Morphology, biology and epizootology. *Adv Parasitol* 1993; 32: 1-70.
19. Hussain Q, Ghadeer A, Fouad A. Clinical significance of *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol* 1989; 27(11): 2047-2049.
20. Eymael D, Schuh GM, Giacomelli Tavares R. Padronização do diagnóstico de *Blastocystis hominis* por diferentes técnicas do coloração. *Rev Soc Brás Med Trop* 2010; 43(3). Consultado el 21 de abril de 2012. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000300019>.
21. Singh M, Zurres K, Ho LC, Yap EH. Elucidation of the cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 1995; 81: 446-450