

## ARTICULO

**Mantenimiento y transporte del *Blastocystis sp.* en condiciones de vitalidad**Emilia Barrios<sup>1,2</sup>, Stanisfel Castillo<sup>1</sup>, Eurimar Goitia<sup>1</sup>, Olga Ojeda<sup>1</sup>, Wolfan Araque<sup>1</sup>, Víctor Delgado<sup>1</sup><sup>1</sup> Laboratorio de Helmintología del Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMolP).<sup>2</sup> Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional, Escuela de Bioanálisis. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.**Correspondencia:** Emilia Barrios**E-mail:** barrios.emilia@gmail.com.

## RESUMEN

El *Blastocystis sp* es un protozooario con alta prevalencia en Venezuela. Es controversial por su papel patógeno y su gran variabilidad genética, relacionada con la dificultad de mantenerlo en condiciones de viabilidad fuera del hospedador. Se evaluó la utilidad de los medios de cultivo *in vitro* RPMI1640, TB1, MBD y MBDM para mantener la viabilidad del *Blastocystis sp*. Se seleccionaron 97 muestras de heces, 43 (44%) de las cuales resultaron positivas solo para *Blastocystis sp* y de 15 de ellas se purificaron los *Blastocystis sp* mediante gradiente (ficoll-diatrizaoato de sodio). En cada medio de cultivo y en solución salina 0,85% (SSI) se inoculó  $1 \times 10^3$  parásitos por paciente y se evaluó la viabilidad mediante coloración con azul de tripano a las 24, 48 y 72 horas. Los resultados mostraron porcentajes de viabilidad a las 24 h: en SSI de 2%, en RPMI1640 5%, en TB1 5%, MBD 24% y MBDM 40%. A las 48 h: en SSI de 3%, en RPMI1640 4%, en TB1 4%, MBD 17% y MBDM 21%. A las 72 h: en SSI 2%, en RPMI1640 2%, en TB1 2%, MBD 15% y MBDM 16%. Se observaron diferencias estadísticamente significativas después de las 24 h, entre los medios TB1, MBD y MBDM

comparado con SSI. Se concluye que el medio MBDM es el que ofrece las mejores condiciones para mantener viable a *Blastocystis sp* por 72 h.

**Palabras clave:** *Blastocystis sp*, cultivo *in vitro*, gradiente de concentración.

## ABSTRACT

**Maintenance and transport *Blastocystis sp* in conditions of vitality**

The protozoan *Blastocystis sp* is a high prevalence in Venezuela. Its role is controversial pathogen and its wide genetic variability related to the difficulty of keeping it in a position outside the host viability. We evaluated the utility of *in vitro* culture media RPMI1640, TB1, and MBDM MBD to maintain the vitality of *Blastocystis sp*. They selected 97 stool samples, 43 (44%) of which were positive for *Blastocystis sp* and only 15 of them were purified by gradient *Blastocystis sp* (ficoll-sodium diatrizaoato). In each culture medium and 0.85% saline (SSI) is inoculó  $1 \times 10^3$  parasites per patient and viability was assessed by trypan blue staining after 24, 48 and 72 hours. The results showed viability percentage at 24 hours: in SSI of 2%, 5% RPMI1640 at TB1 5%, 24% and MBDM MBD 40%. After 48 h: SSI 3% in RPMI1640 4%, 4% TB1, MBD MBDM 17% and 21%. After 72 h: SSI 2% in RPMI1640 2%, 2% TB1, MBD 15% and 16% MBDM. Statistically significant differences were observed after 24 h, between TB1 media, compared MBDM MBD and SSI. We conclude that the medium is MBDM which offers the best conditions for maintaining viable *Blastocystis sp* for 72 h.

**Key words:** *Blastocystis sp*, *in vitro* culture, the concentration gradient

## INTRODUCCION

El *Blastocystis sp* es un parásito pleomórfico común en el tracto intestinal humano (1). Caracterizado por presentar tres morfologías principales: vacuolada, que posee una gran vacuola central, y escaso citoplasma que contiene organelas y varios núcleos. Generalmente es esférica, midiendo entre 2 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, aunque en algunos cultivos axénicos se han descrito formas gigantes de 400  $\mu\text{m}$ . La granulada, que posee

una gran cantidad de mitocondrias, lo que le confiere el aspecto granular. Y la forma vacuolada que en tamaño es parecida a la granular, caracterizada por la presencia de granulaciones citoplasmáticas y dentro de la vacuola, funciones metabólicas y reproductivas variables, y es frecuentemente observada en cultivos con antibióticos o que no han sido axenizados. La forma amebode, caracterizada por su capacidad de emitir 1 ó 2 pseudópodos involucrados principalmente en la fagocitosis de bacterias más que en la motilidad del parásito, es esporádicamente encontrada en heces diarreicas. La forma quística es la de menor tamaño 2 a 5  $\mu\text{m}$ , de forma ovoidea o esférica y con una pared de múltiples capas que puede presentar, o no, otra cubierta laxa. En su interior se observan varios núcleos, pequeñas vacuolas y otras organelas. Son las formas más resistentes, pudiendo permanecer viables un mes a 25 °C y 2 meses a 4 °C, son las responsables de la transmisión que genera la infección de manera fecal-oral o por medios de agua o alimentos contaminados con heces infectadas (2, 3, 4).

En cuanto a la frecuencia de aparición, las formas con cuerpo central o vacuolada y las formas granulosas son las más frecuentes en las heces de personas asintomáticas, aunque se han encontrado diferencias significativas en el número y formas observadas en las heces entre las personas sintomáticas y asintomáticas.

Los quistes se encuentran principalmente en las heces de personas asintomáticas, la forma amebode solamente se ha visto en individuos sintomáticos. Todas estas variantes morfológicas también se observan en los cultivos. Además se ha demostrado asociación entre la alta carga parasitaria y la morfología encontrada para apreciar síntomas como diarrea, dolor abdominal, anorexia, fatiga, vómitos y flatulencia (1, 5, 6).

La re-emergencia de la infección por *Blastocystis sp* en humanos y su controversial rol patógeno ha despertado el interés de definir la taxonomía del parásito, debido a su controversial ubicación en el phylum Stramenophila (7), y a los muchos organismos similares a *Blastocystis sp* encontrados en una variedad de animales, incluyendo mamíferos, aves, reptiles y en raras ocasiones, los insectos. A pesar que *Blastocystis sp* ha sido aceptado como la especie aislada de humanos, los parásitos provenientes de otros huéspedes son reportados bajo la misma denominación o seguido el nombre de la especie de procedencia (7).

No obstante, *Blastocystis sp* es morfológica y genéticamente un organismo polimórfico y el hecho de observar diferencia morfológicas podría no significar que sea una nueva especie. La descripción de diferentes perfiles proteicos, cariotipos y zimodemas combinados con otros aspectos como condiciones de crecimiento, tipos de células y secuencias de genes constituyen pruebas de la posible existencia de poblaciones morfológicamente idénticas, que quizás estén dotadas de un potencial patogénico diferente. Sin embargo, existen pruebas de que estos criterios no se correlacionan entre sí, y por lo tanto la especiación en el género *Blastocystis* sigue siendo controversial (7).

Actualmente, se considera que existen 9 subtipos y se ha propuesto la eliminación de la nomenclatura *Blastocystis hominis* y reemplazarla por la de *Blastocystis sp*, seguida de la indicación del subtipo de 1 a 9 en los aislamientos de aves y mamíferos (8). El subtipo 1 se asocia a var. ... amíferos y aves, el subtipo 2 está asociado a primates y cerdos, el subtipo 3 es el genotipo más frecuentemente hallado en humanos, el subtipo 4 se asocia a roedores, el subtipo 5 está relacionado con el ganado vacuno y con cerdos, los subtipos 6 y 7

son frecuentemente aislados de aves; por último, los subtipos 8 y 9 están estrechamente vinculados con los subtipos 4 y 6, respectivamente (9). Adicionalmente, es posible la existencia de un subtipo 10 aislado en primates (9). Otros autores señalan la probable existencia de diferentes especies de este género, pasando el subtipo 3 a ser realmente *B. hominis* (10).

Este protozooario, constituyen un grupo de importancia dentro de los parásitos intestinales, variando su prevalencia y patogenicidad de acuerdo a ciertos factores propios del agente o del hospedador, y también es considerado actualmente un patógeno emergente o reemergente, reportándose con frecuencia en infecciones sintomáticas o asintomáticas (11).

Se ha demostrado que el *Blastocystis sp.*, no invade la mucosa del colon, pero conduce a perturbaciones en la barrera epitelial y permeabilidad, provocando infiltración de células inflamatorias en la mucosa, pero no en todos los huéspedes.

El efecto citopático de *Blastocystis sp* subtipo 4 en líneas celulares epiteliales de rata muestran que el parásito es capaz de producir enzimas hidrolasas que inducen apoptosis y aumento en la permeabilidad de la membrana epitelial, independientemente que el parásito entre en contacto con la membrana. El subtipo 1 se asocia a efectos pro-inflamatorios entre ellos secreción del IL-8 y el subtipo 7 con modulación de la respuesta humoral IgA, así como producción de cistein proteasas que favorecen la supervivencia del parásito (12).

El avance en diagnóstico, en la caracterización fenotípica y genotípica de otros protozoarios es resultado de técnicas que requieren una óptima obtención de estadios parasitarios, entre ellas el cultivo y mantenimiento *in vitro*, que en el caso de *Blastocystis sp* no se encuentran disponibles, a pesar de que se conoce que es

posible su cultivo. Esto hace difícil el estudio de la epidemiología molecular de la blastocitosis e incrementa la controversia en relación a sus características morfológicas, ciclo vital y rol como patógeno de *Blastocystis* (5,10).

Para ir más allá de las descripciones morfológicas o patológicas asociadas es necesario evaluar la utilidad de los medios de cultivos axénicos en el mantenimiento de la viabilidad del *Blastocystis sp.*, debido a su labilidad y difícil mantenimiento *in vivo* e *in vitro* (13).

En relación a *Blastocystis sp.*, el cultivo por 72 horas en medio Boeck-Drbohlav (MBD) reveló el marcado polimorfismo previamente descrito para este organismo, observándose las formas con cuerpo central, forma granulosa, forma amebode, y los quistes (14). En el medio Boeck-Drbohlav modificado (MBDM), La axenización se consiguió en 21 aislados, pero únicamente 18 lograron mantenerse viables *in vitro*, lo que supone un éxito de un 47,4%. Sin embargo, hasta los momentos no se dispone de un medio de transporte o mantenimiento estandarizado, que garantice la viabilidad, multiplicación y sobrevivencia de estos protozoarios (15).

Por su parte el medio TB1 medio de cultivo libre de suero resulto ser eficaz en el mantenimiento de trofozoitos de *Trichomonas vaginalis* manteniéndolos viables por un período de 7 días (16).

El objetivo de este estudio fue evaluar la utilidad de medios axénicos líquidos (RPMI1640) semi-sólidos (TB1) y bifásicos (MBD, MBDM), en mantener la viabilidad del *Blastocystis sp* basado en experiencias exitosas con este y otros protozoarios, a fin de la obtención óptima de formas parasitarias de *Blastocystis sp* a emplear en posteriores estudios, que permitan dilucidar papel patógeno, mejorar el diagnóstico microscópico,

serológico y molecular de pacientes con sintomatología e identificar portadores sanos

### MATERIAL Y METODOS

En el estudio se emplearon 15 aislados de *Blastocystis sp* obtenidas de pacientes infectados, provenientes del Edo. Carabobo y procesados en el Laboratorio de Helmintos del Instituto de Biología Molecular de Parásitos (Instituto BioMoIP). Los pacientes fueron informados de los objetivos de la investigación y una vez obtenido su consentimiento escrito de participar en el estudios y dadas las instrucciones adecuadas para la recolección de la muestra, las muestras de heces fueron procesadas. Se emplearon los métodos: directo con solución salina isotónica (0,85% P/V), Lugol, Baerman, Kato, además de la coloración Kinyoun, a fin de descartar la presencia de *Strongyloides stercoralis* y otros helmintos, coccidios (*Cyclospora sp*, *Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*), que puedan ocasionar sintomatología similar al *Blasctocystis sp*. Las muestras positivas sólo para *Blastocystis sp*, se les realizó un conteo de formas parasitarias por campo, utilizando el objetivo de 40X, en diez campos consecutivos.

Aquellas muestras con 5 o más parásitos por campo, fueron resuspendidas en Solución Salina Isotónica (SSI 0,85% p/v) y tamizadas para eliminar detritus celulares y restos alimenticios. Luego se resuspendió en SSI 0,85% p/v suplementada con antibióticos (100 µg de estreptomina/ml y 100 UI de penicilina /ml de SSI) y se realizaron cuatro lavados de 10 min a 3500 rpm, para eliminar bacterias.

Al finalizar los lavados, se resuspendió el sedimento con SSI hasta un volumen conocido, y se realizó un conteo diferencial por duplicado, con respecto a las morfologías encontradas de *Blastocystis sp* en 20 µl de la resuspensión, empleando objetivo de 40X.

Las muestras confirmadas con *Blastocystis sp* fueron fijadas con metanol para realizar la coloración May Grünwald – Giemsa.

**Aislamiento y Concentración de *Blastocystis sp*.** La separación de las formas parasitarias, de detritus alimenticios y el resto de las heces, se empleó el gradiente ficol (0,5% p/v)-diatrizoato de sodio (16% p/v) (17), después de centrifugación a 3000 rpm por 30 minutos, los parásitos en la interface (anillo) se colectaron y lavaron dos veces con solución salina isotónica (0,85% p/v) estéril, para proceder con el conteo de los parásitos que corresponde al tiempo 0 y ser inoculados en los medios y soluciones de cultivo. Una gota de esta suspensión se colocó sobre una lámina portaobjetos y se fijó con metanol para realizar la coloración May Grünwald – Giemsa, para ello se añadieron unas gotas de May-Grünwald a la lámina previamente fijada, se dejó actuar durante 10 minutos, pasado este tiempo, se lavó con tampón PBS (0,15M, pH 7,4) y se le añadió unas gotas de Giemsa diluida 1:5 en agua destilada, se dejó actuar durante 20 minutos, se lavó la lámina con PBS nuevamente y se secó a temperatura ambiente. Posteriormente, las láminas coloreadas se observaron al microscopio con objetivo de 100X y se hizo registro fotográfico en un fotomicroscopio Nikon E600 con cámara acoplada (Coolpix 995).

### Preparación de medios y soluciones de cultivo

**Solución de Locke.** Se preparó según protocolo por Lanuza *et al.* (14), para ello los componentes, cloruro sódico 1,6%, cloruro potásico 0,04%, fosfato de sodio 0,4%, bicarbonato sódico 0,08%, fosfato monopotásico 0,08%, glucosa 0,5%, cloruro cálcico 0,04% y cloruro de magnesio 0,002%, fueron disueltos en agua destilada y ajustados a pH: 7.2 con un peachimetro orion modelo 230

A y se esterilizaron en autoclave a 121°C, durante 20 minutos, excepto la glucosa que fue filtrada en Millipore 0,22 µm.

**Medio bifásico Boeck-Drbohlav modificado (MBDM).** La fase líquida consistió en la solución de Locke modificada suplementada con suero mientras que la fase sólida se preparó con una ovosuspensión en solución de Locke modificada 4:1 v/v emulsionada y luego coagulada en baño a 80°C, 30 minutos 80 en cuñas de 3 a 4 cm de longitud en tubos de vidrio de 16 x 160 mm. Los tubos se esterilizaron en autoclave (121°C, 15 minutos) y se almacenaron a 4°C, hasta su utilización (15).

**Medio bifásico de Boeck-Drbohlav modificado (BDM):** La fase sólida se preparó mezclando el huevo con sangre humana defibrinada, esterilizada a 80°C, y luego se adicionó solución Ringer estéril comercial (14).

**Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640):** Se empleó la fórmula desarrollada por Moore *et al.* (18), en Roswell Park Memorial Institute, de ahí el acrónimo RPMI comercializada (SIGMA) liofilizada suplementado con L-glutamina y bicarbonato de sodio, diluida en agua destilada ajustada pH a 7.0 esterilizada por filtración, se almacenó a 4 °C hasta su uso (18).

**Medio TB1:** Medio Semi-Sólido Compuesto por Tripticasa 1,5 %, extracto de carne 1,5 %, extracto de levadura 1,5 %, peptona 0,5%, hígado desecado 1,5%, glucosa 0,5 % , hierro 300 mg, y agua destilada (16).

#### **Inoculación de *Blastocystis* en los diferentes Medios de Cultivo.**

En cada medio o solución de cultivo se inoculó  $1,2 \times 10^4$  *Blastocystis sp* purificados y 100% viables, empleándose como condición control sin medio, solución salina isotónica (NaCl 0,85% p/v). La viabilidad de los parásitos fue

evaluada mediante el test del colorante, contando 20 µl de parásitos purificados con 10 µl de azul de tripan 0,2% p/v en PBS (0,15 M pH 7,2) y se realizó conteo de parásitos al microscopio. Los parásitos intactos sin colorante (viables), y los coloreados (muertos), para estimar el porcentaje de viabilidad. Los cultivos se incubaron a 37°C en atmósfera anaeróbica, obtenida mediante la adición de 1 ml de Agar al 2%. Una vez adaptado el parásito a las condiciones *in vitro* (13, 14).

**Determinación de la vitalidad de *Blastocystis sp* en medios y soluciones.** A las 0, 24, 48 y 72 horas, se tomaron 20 µl de cada medio de cultivo, adicionándole 10 µl de azul de tripano al 1% en PBS y se realizó conteo de parásitos al microscopio los parásitos intactos sin colorante (viables) y los coloreados (muertos), para estimar el porcentaje de vitalidad.

**Análisis de los resultados.** Se utilizó una prueba de normalidad para estimar la distribución de las variables. Los conteos promedios de las muestras antes y después del gradiente, fueron expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar ( $X \pm DE$ ) y en porcentaje (%). La viabilidad como el porcentaje promedio de parásitos que sobrevivieron a las 24, 48 y 72 horas en cada medio de cultivo, tomando el inóculo en el tiempo 0 como el 100%. La comparación de la viabilidad de los parásitos entre medios de cultivo se realizó mediante una prueba T. En el análisis estadístico se empleó el programa STATISTICA versión 8.0.

## **RESULTADOS**

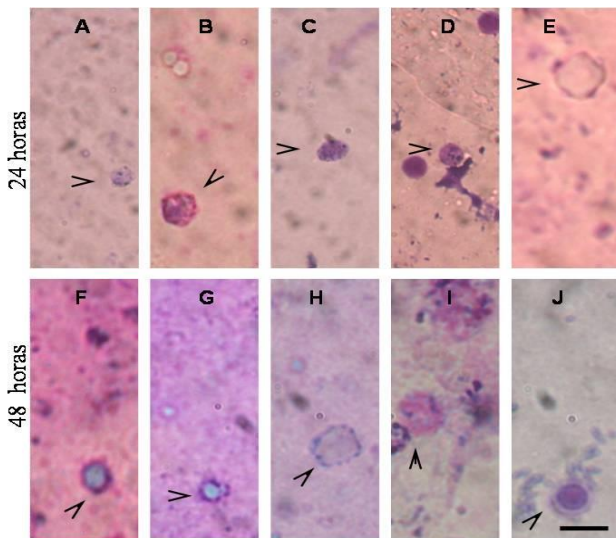
La infección mixta de *Blastocystis sp* con otros parásitos fue con *Endolimax nana* 7(7%), *Entamoeba coli* 4 (4%) y *Giardia lamblia* 3(3%). En las muestras exclusivamente positivas para *Blastocystis sp* se encontró que: 28 (65%) eran pastosa, 11 (26%) blandas, 3(7%) duras y sólo

un 2% era diarreica. Mientras que, las 15 muestras procesadas para cultivo *in vitro*, fueron: pastosas 8 (53,3%) y blandas 7 (46,6%).

En cuanto número y tipos morfológicos encontrados, el promedio de *Blastocystis sp* en las muestras incorporadas al estudio fue aproximadamente  $9,1 \times 10^6$  protozoarios por  $\mu\text{l}$ , de los cuales  $5,9 \times 10^6 \pm 3,1 \times 10^6$  (65,12%) correspondían a formas granulares y  $3,1 \times 10^6 \pm 2,8 \times 10^5$  (34,88%) a formas vacuolares. Luego de la purificación mediante gradiente se obtuvo  $1,2 \times 10^4$  *Blastocystis sp* por  $\mu\text{l}$ , de ellos  $6,5 \times 10^4 \pm 4,4 \times 10^4$  (59,25%) eran granulares y  $4,5 \times 10^4 \pm 2,2 \times 10^4$  (40,74%) vacuolares.

La coloración de May Grünwald-Giemsa empleada en la confirmación de la identificación morfológica, resultó satisfactoria, ya que se pudo diferenciar características morfológicas del parásito, como granulaciones, núcleos a la periferia y la vacuola central limitada por un citoplasma escaso.

Por lo cual se propone a esta coloración entre las adecuadas para la observación de *Blastocystis sp* (figura 1).

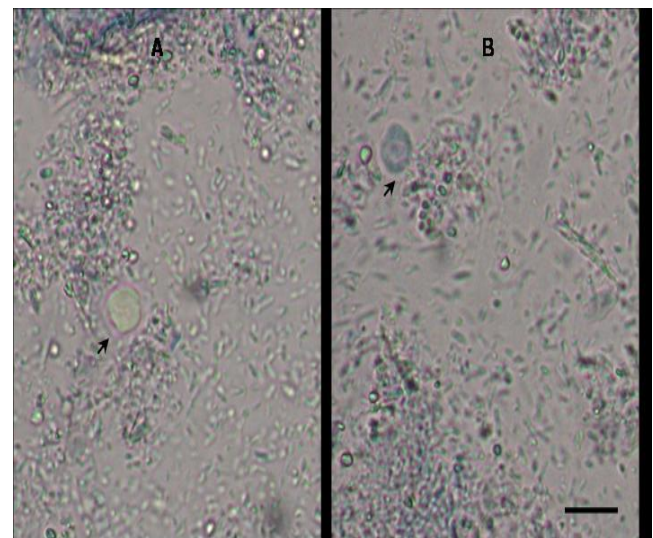


**Figura 1.** *Blastocystis sp.* Teñidos con May-Grünwald-Giemsa, formas granulares (cabeza de flecha, A-D, I) y vacuolares (E- H y J). Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

En el cultivo *in vitro* de *Blastocystis sp*, luego de 24 horas los contajes de viabilidad en SSI y los medios de cultivo (Figura 2, Tabla 1) mostraron que los medios RPMI1640 y TB1 en comparación con la SSI, solo lograron 3% más de viabilidad, mientras que en el MBD su capacidad de mantener viables los parásitos fue doce veces mayor a la SSI y aproximadamente cinco veces más en comparación con el RPMI1640 y el TB1.

Sin embargo, el medio MBDM resultó ser superior a todos los medios, no sólo fue diez veces mejor que la SSI y ocho veces mejor al RPMI1640 y TB1, sino que casi dos veces superior al MBD clásico, hasta las 48 horas. No obstante, todos los medios incluidos los medios bifásicos MBD y MBDM disminuyeron con el tiempo, su capacidad de mantener los parásitos viables.

Cabe resaltar que las diferencias fueron estadísticamente significativas entre TB1, MBD y MBDM en relación a SSI, a las 24 y 48 horas, mientras que a las 72 horas solo MBD y MBDM.



**Figura 2.** *Blastocystis sp.* Mantenidos en SSI por 24 horas y procesados con azul tripan, en A forma vacuolar viable y en B no viable. Barra: 25  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 1.** *Blastocystis sp* en solución salina y en medios de cultivo a las 24, 48 y 72 horas de cultivo, expresados en promedio±desviación estándar y en porcentaje de vitalidad en comparación con el inóculo inicial (0 horas).

Tiempo	Medio de cultivo	SSI	RPMI1640	TB1	MBD	MBDM
<b>0 horas</b>			12000±1043			
<b>24 horas</b>	Promedio	479	1067	1405	9787	11406
	DS	299	620	803	714	543
	% de viabilidad	2	5	5	24	40
	p	<b>0,09</b>	<b>*0,05</b>	<b>*0,02</b>	<b>*0,001</b>	
<b>48 horas</b>	Promedio	260	508	827	4021	4261
	DS	233	443	601	785	1200
	% de viabilidad	2	2	3	13	18
	p	<b>0,08</b>	<b>*0,03</b>	<b>*0,003</b>	<b>*0,002</b>	
<b>72 horas</b>	Promedio	183	334	600	2635	7188
	DS	143	273	540	443	4250
	% de viabilidad	2	2	2	15	16
	p	<b>0,1</b>	<b>0,09</b>	<b>*0,001</b>	<b>*0,003</b>	

### DISCUSIÓN

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. En el presente estudio se evaluó la utilidad de medios axénicos líquidos, semi-sólidos y bifásicos en mantener la vitalidad de *Blastocystis sp*.

Inicialmente en la fase de diagnóstico y selección de las muestras idóneas para cultivo *in vitro*, se encontró asociación con otros protozoarios, resultando interesante que a pesar de ello la consistencia de las heces predominante no fue diarreica, ya que otros autores relacionan una alta asociación entre *Endolimax nana* y *Blastocystis sp*, con diarrea en niños, cuando la infección se produce con una alta carga parasitaria (19), sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que *Blastocystis*

*sp* solo o asociado a *E. nana* en el tracto gastrointestinal puede prevalecer en gran número, sin generar algún cambio en la consistencia normal de las heces. En relación a la presencia de infección mixta, otros autores encontraron resultados similares a los del presente estudio, excepto que encontraron una asociación menor entre *Blastocystis sp* y *E. nana* (20).

De acuerdo a los resultados obtenidos al estimar el número de parásitos antes y después del gradiente, se mantiene la relación de formas vacuolares y granulares en los contajes pre y post gradiente, corroborando estudios previos de nuestro grupo de investigación en los que se demostró que el gradiente con Ficol-Diatrizoato no influye en la proporción de morfologías presentes en la muestra (21).

En cuanto al tipo de morfología predominante, otros autores reportan un predominio de 5 o más formas vacuolares por campo en pacientes

sintomáticos (22), contrario a lo observado en esta investigación. La discrepancia con los resultados de esta investigación pudiera relacionarse con la consistencia de las heces, en su mayoría pastosas, más que al número de parásitos encontrados, puesto que en otra investigación se observó en pacientes con infección única por *Blastocystis sp* y síntomas, que 68,4% presentaban 5 o más vacuolares por campo (23).

Los detalles morfológicos e intracelular observados en los *Blastocystis sp* con la tinción de May Grünwald-Giemsa sustenta un estudio previo (21) que demostró que este método de coloración puede ofrecer una alternativa a otras coloración la observación de *Blastocystis sp* (figura 1), por de simple ejecución y requerir menos grupos cromógenos en su preparación. Contrario a otros estudios enfatizan la necesidad de usar al menos cinco tipos de tinciones para diferenciar entre distintos morfologías de *Blastocystis sp.* y concluyendo que los mejores colorantes para identificarlo serían: Azul metileno- safranina y la de Zielhl - Neelsen modificada (24).

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 (24). No obstante, de los medios de cultivo empleados en el presente estudio, solo dos mostraron utilidad en mantener la viabilidad de *Blastocystis sp* hasta 72 horas, en condiciones de microaerofilia, sugiriendo que pueden ser empleados en estudios posteriores (epidemiología molecular, caracterización de antígenos para inmunodiagnóstico o estudios de la biología y pruebas con fármacos).

Es importante resaltar que en todos los experimentos fueron realizados sin reemplazar medio, para evitar que la que las distintas

consistencias de estos pudiesen producir variaciones en los contajes de los parásitos, lo cual podría haber contribuido a la disminución de la vitalidad a medida que transcurría el tiempo en cultivo, debido a agotamiento de los nutrientes en el medio. De igual forma, el empleo de una capa de agar para disminuir la tensión de oxígeno en el medio, no constituye un sistema de anaerobiosis estricta, que también pudiera haber afectado la supervivencia de los parásitos, de metabolismo anaerobio conocido(15). Quizás debido a ello, el medio MBDM resulto medianamente eficaz para mantener la viabilidad, pero no hubo multiplicación del parásito como se reporta en otros estudios, que establecen que los medios de cultivo idóneos para este parásito es el medio bifásico de Boeck- Drbohlav, inicialmente descrito para *Entamoeba histolytica*, proporcionaba un adecuado crecimiento para *Blastocystis sp.* Además, observaron mejores resultados en medios pre-reducidos durante 48 horas, con una fase líquida constituida por solución de Locke y suero inactivado (bovino, caballo, conejo o humano) al 30% e incubados a 37°C en atmósfera anaerobia (15).

Otros autores señalan que la incubación de *Blastocystis sp* a 37 °C en medios anaerobios pre-reducidos brinda un crecimiento óptimo del organismo aislado de humanos, para aumentar la sensibilidad del diagnóstico, pero no reportan tiempos de mantenimiento en cultivo, % de vitalidad ni de multiplicación del parásito (16,25).

Además de los medios de cultivo de Boeck y Drbohlav habitualmente usados, se han desarrollado con éxito el Iscove modificado y Dulbecco suplementado con suero equino al 10% (2, 14 ,15), no obstante, la mayoría de estos ensayos se han desarrollado en cultivos de *Blastocystis sp* establecidos, no con parásitos provenientes de heces humanas por



individual ni midiendo la capacidad de multiplicación o mantenimiento de los medios.

En relación al medio TB1, considerado como un medio de mantenimiento ideal para *Trichomonas vaginalis* puesto que alcanzó una tasa de crecimiento con niveles máximos de crecimiento a las 48 y 72 horas, después de la inoculación. Este medio podría utilizarse eficazmente en el aislamiento y mantenimiento del cultivo *in vitro* de *T. vaginalis*, pero resultó poco eficiente para el mantenimiento de *Blastocystis* sp (16,25).

Igualmente resulta contradictorio que un medio altamente enriquecido y ampliamente utilizado en el mantenimiento en cultivo de linfocitos, como el RPMI1640 (26) y de alto costo, mostró ser similar a la SSI para conservar la viabilidad del *Blastocystis* sp.

A pesar de que no se logró la multiplicación en cultivo, los resultados obtenidos con los medios ensayados demuestran que estos son capaces de mantener mayor número de parásitos viables en comparación con la SSI, por lo que representa una alternativa para el transporte y mantenimiento de los *Blastocystis* dentro de las 24 horas, y representan una primera aproximación a la estandarización del cultivo *in vitro*, puesto que optimizando el reemplazo de nutrientes y tensión de oxígeno, podrían aumentar el tiempo de viabilidad y favorecer la multiplicación.

En conclusión, los medios bifásicos MBD y MBDM constituyen los más adecuados para el mantenimiento de transporte de *Blastocystis* sp proveniente de muestras de heces de pacientes infectados.

**AGRADECIMIENTO.** Este trabajo se realizó con el financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo a través del Proyecto de Inversión Menor CDCH-UC-AM # 0466-10.

## REFERENCIAS

1. Eymael D, Schuh G, Tayares R. Standarizacion of *Blastocystis hominis* diagnóstico using different staining techniques. Rev Soc Bras Med Trop 2010; 43(3) 309-312.
2. Salinas J, Gonzales H. Infección por *Blastocystis*. Rev Gastroenterol 2007; 27(3) 264-274.
3. Velarde L, Mendoza M. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en menores de 12 años de una población mexicana urbana. Rev. Cubana Pediatr 2006 disponible en línea: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75312006000400006](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312006000400006)
4. Kozubsky L, Archelli S. Algunas consideraciones acerca de *Blastocystis* sp, un parásito controversial. Acta Bioquím Clín Latinoam 2010; 44(3): 371-6.
5. Stensvold C, Arendrup M, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen H. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007; 59(3):303-7.
6. Guzmán R, Vethencourt C, Galindo M, Chacón M, Wagner N, Nessi C, Paduani A. Comportamiento Biológico de *Blastocystis hominis* en Pacientes Tratados con Secnidazol Unidazol Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2008; 28 (1) 66-71.
7. Yoshikawa H, Morimoto K, Wu Z, Singh M, Hashimoto T. Problems in speciation in the genus *Blastocystis* TRENDS in Parasitology 2004; 20 (6): 251-5.
8. Stensvold C, Suresh G, Tan K, Thompson R, Trau R, Viscogliosi E, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes-a consensus. Trends Parasitol 2007; 23 (3):93-6.
9. Hoevers J, Holman P, Logan K, Hommel M, Ashford R, Snowden K. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis hominis* isolates from geographically diverse human hosts. Parasitol Res 2000; 86(1): 57-61.

10. Requena I, Hernández Y, Ramsay M, Salazar C, Devera R. Prevalence of *Blastocystis hominis* among foodhandlers from Caroni municipality, Bolivar State, Venezuela. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(6):1721-1727.
11. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès C, Delbac F, Alaoui H. New Insights into *Blastocystis* spp. A Potential Link with Irritable Bowel Syndrome. *PLoS Pathog* 2012; 8(3): 002545.
12. Graham C, Diamond L. Methods for cultivation of luminal parasitic protozoa of clinical importance. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(3): 329–341.
13. Domínguez V. Heterogeneidad genética de *Blastocystis hominis*: implicaciones patogénicas. Universidad de Valencia, Tesis Doctoral 2003; p 113-118. Recuperado el 30 de mayo de 2008. Disponible en línea: <http://www.tdx.cat/handle/10803/10099>
14. Guzmán C, Archedera H, Pérez E. Ultraestructura de *Blastocystis hominis* y su enquistamiento en cultivo polixénico. *VITAE* 2007. Disponible en línea: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=15&n=382&m=3&e=602>
15. Moore G, Gerner R, Franklin H. Culture of Normal Human Leukocytes. *JAMA*, 2007; 199:519-524.
16. Limoncu M, Kilimcioğlu A, Kurt Ö, Östan İ, Özkütük N, Özbilgin A. Two novel serum-free media for the culture of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* 2007; 100 (3):599–602.
17. Weber R, Juranek D, Bryan R. Improved stool concentration procedure for Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol* 1992; 30:2869-2873.
18. Zhang X, Qiao J, Zhou X, Yao F, Wei Z. Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and in vitro. *Parasitol Res.* 2007; 101(1):43-51.
19. Graczyk T, Shiff C, Tamang L, Munsaka F, Beitin A, Moss W. The association of *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* with diarrheal stools in Zambian school-age children. *Parasitol Res* 2005; 98(1):38-43.
20. Carrero S, Carrero M, Pérez M, Carrero J. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en Pacientes sintomáticos. *Med-ULA* 1999; 5(1-4): 48-55.
21. Sánchez L, Barrios E, Sardina A, Araque W, Delgado V. Infectividad y virulencia de aislados humanos de *Blastocystis hominis* en ratones inmunosuprimidos. *Kasmera* 2012; 40: 67-77.
22. Tan K S W. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21 (4): 639–665.
23. Chourio L, Díaz I, Casas M, Sánchez M, Torres L, Luna M, Corzo G. Epidemiología y patogenicidad de *Blastocystis hominis* 1999; 27(2):77-102.
24. Weber, R., Juranek, D., Bryan, R. Improved stool concentration procedure for Detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol* 1992; 30:2869-2873.
25. Suresh K, Smith H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 509–511.
26. Solís M, Alvarado M, Ruiz E, Carrillo J, Navarrete M, Sánchez G, et al. Citogenética y citoquímica de pacientes con leucemia en dos hospitales neotropicales. *Rev boil trop* 2000; 48: 2-3.