

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Coinfección por *Entamoeba histolytica* y *Blastocystis*
spp. diagnosticada por PCR en pacientes con
criptosporidiosis**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

TODO-LO-ILUMINAN

Que Para Obtener el Título de
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta

Luis Andrey Gómez Vázquez

1942

Hermosillo, Sonora

Diciembre 2017

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Luis Andrey Gómez Vázquez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Presidente

Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Secretario

M.C. Manuel Isaac Villegas Gómez
Vocal

M.C. María Lucila Rascón Durán
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó con el financiamiento del proyecto No. 258454 titulado “Caracterización molecular e inmunológica de genotipos de *Cryptosporidium* spp. en pacientes sintomáticos y asintomáticos” aprobado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A mis padres, hermanos y toda mi familia, por apoyarme en cada decisión y por su paciencia al esperarme siempre en casa con los brazos abiertos.

A María Elisa, por acompañarme y soportarme durante todo este proceso. Por preocuparse y darme siempre lo mejor.

A todos mis amigos por nunca abandonarme, aun cuando me he tenido que alejar por mis obligaciones.

A Maru, por impulsarme durante toda la carrera, aconsejarme y recordarme lo importante que es seguir adelante.

A la Doctora Olivia Valenzuela y a todo su equipo de trabajo, por confiar en mí y hacer este proyecto posible.

A Dios, por acompañarme y bendecir a mi familia en todo momento. Por darme la fe y fuerza necesaria para cumplir cada meta.

DEDICATORIA

A mis padres. Por su imparable lucha por sacarnos adelante. Este logro les pertenece más a ustedes que a mí.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
OBJETIVOS	IX
Objetivo General	IX
Objetivos Particulares	IX
RESUMEN.....	X
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
<i>Cryptosporidium</i> spp.	3
Ciclo de Vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.	5
Criptosporidiosis	8
<i>Entamoeba histolytica</i>	8
Amibiasis	13
<i>Blastocystis</i> spp.	14
Ciclo de Vida de <i>Blastocystis</i> spp.	14
Blastosistosis.....	18
Factores de Riesgo a Parasitosis.....	18
Edad y Género en Relación a la Zona Geográfica.....	19
Estado Inmune del Huésped.....	19
Contacto con Animales.....	20
Higiene y Nivel Socioeconómico.....	20
Impacto de la Coinfección con Patógenos Entéricos.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Diseño del Estudio	22
Criterios de Inclusión.....	22
Consideraciones Bioéticas	22
Amplificación del Gen de la Subunidad Pequeña Ribosomal (SSU rDNA) de <i>Blastocystis</i> spp. y de la Región Intergénica SQ de <i>Entamoeba histolytica</i> Mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	22
Revelado Mediante Electroforesis de los Amplicones Productos de PCR	25
Análisis Estadístico	25
RESULTADOS	26
Edad y Género de los Participantes	26

Coinfección de los Casos con Criptosporidiosis	26
Características Clínicas de los Casos Coinfectados con <i>Blastocystis</i> spp.....	26
Características Clínicas de los Casos Monoinfectados.	26
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS.....	42
Anexo 1. Protocolo de Extracción de ADN Utilizado en un Estudio Previo.	42
Anexo 2. Consentimiento Informado Presentado a los Tutores de los Pacientes Participantes.	43

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Mezcla de reacción para la amplificación del gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rDNA) de <i>Blastocystis</i> spp. y de la región intergénica SQ de <i>Entamoeba histolytica</i>	23
2.	Condiciones del termociclador para la amplificación del gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rDNA) de <i>Blastocystis</i> spp. y de la región intergénica SQ de <i>Entamoeba histolytica</i>	24
3.	Secuencia de los iniciadores utilizados en las reacciones de PCR para la amplificación del gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rDNA) de <i>Blastocystis</i> spp. y de la región intergénica SQ de <i>Entamoeba histolytica</i>	24
4.	Características clínicas de niños con criptosporidiosis y coinfección con otros parásitos	28

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Ooquistes de <i>Cryptosporidium</i> spp. teñidos con Ziehl-Neelsen modificado	4
2.	Imagen representativa del ciclo de vida de <i>Cryptosporidium</i> spp.	7
3.	Quiste de <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> en observación directa con lugol.	9
4.	Trofozoíto de <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> en observación directa con lugol.	10
5.	Imagen representativa del ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	12
6.	Estadios morfológicos de <i>Blastocystis</i> spp.	16
7.	Imagen representativa del ciclo de vida de <i>Blastocystis</i> spp.	17
8.	Electroforesis en gel de agarosa (1.2%), del producto de la amplificación de una región polimórfica del gen SSU rDNA de <i>Blastocystis</i> spp.	30
9.	Electroforesis en gel de agarosa (1.2%), del producto de la amplificación de la región intergénica SQ de <i>Entamoeba histolytica</i> .	31

OBJETIVOS

Objetivo General

Diagnosticar la coinfección por *Entamoeba histolytica* y *Blastocystis* spp. mediante PCR, en pacientes con criptosporidiosis.

Objetivos Particulares

Diagnosticar la coinfección de *Blastocystis* spp. en pacientes con criptosporidiosis mediante la amplificación de una región polimórfica del gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rDNA) de *Blastocystis* spp. a partir del ADN genómico obtenido de heces.

Diagnosticar la coinfección de *Entamoeba histolytica* en pacientes con criptosporidiosis mediante la amplificación de la región intergénica SQ de *Entamoeba histolytica* a partir del ADN total obtenido de heces.

RESUMEN

Las infecciones por protozoarios intestinales como criptosporidiosis, amibiasis y blastocistosis representan un grave problema de salud pública, ya que cada una de ellas cuenta con una alta morbilidad reconocida a nivel mundial. Entre los factores de riesgo se contemplan la edad, género, sistema inmune, hábitos alimenticios, nivel socioeconómico, higiene y el contacto con los animales, entre otros. Recientemente se han caracterizado lectinas de éstos parásitos y su afinidad por determinados carbohidratos presentes en las células del hospedador y en la mucosa intestinal; lo que lleva a pensar que existan personas susceptibles a aquellos parásitos que compartan la afinidad de dichas lectinas. En el grupo de investigación de la Dra. Olivia Valenzuela se cuenta con 42 muestras de ADN extraído de heces de pacientes con criptosporidiosis, todos ellos ≤ 9 años de edad. El 52% de los casos son del género masculino. La gastroenteritis aguda fue la manifestación clínica más frecuente ya que se presentó en el 77% de los sujetos de estudio, seguido de fiebre (33%), desnutrición (28%) y deshidratación (18%); estas manifestaciones clínicas son propias de la infección con *Cryptosporidium* spp. En el 7% (3/42) de los casos en estudio se encontró coinfección con *Blastocystis* spp. y en ningún caso se logró amplificar la región intergénica SQ del gen de *Entamoeba histolytica*. Dos de los sujetos coinfectados fueron de género masculino (6 y 7 años de edad) y una niña de 7 años de edad. No se logró asociar la coinfección con aumento en la severidad de los síntomas reportados en estos tres casos; ya que uno de ellos no se cuenta con reportes clínicos. El otro caso es de un paciente que además de presentar coinfección con estos dos parásitos presentaba 3 infecciones más (HIV, HV, candidiasis).

INTRODUCCIÓN

Las infecciones parasitarias son consideradas un problema de salud pública en todo el mundo, presentándose con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo siendo los niños la población más vulnerable (El Safadi y col., 2016; Osman y col., 2016). En particular, las infecciones causadas por los protozoarios intestinales *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* y *Blastocystis* spp. cuentan con una alta prevalencia a nivel mundial (Haider y col., 2012)

Cryptosporidium spp. es un parásito emergente considerado a nivel mundial como la segunda causa de muerte asociada a diarrea en niños menores de 5 años, solamente después de rotavirus (Collaborators, 2016). La criptosporidiosis representa hasta el 20% de todos los casos de diarrea infantil en los países en desarrollo y es una complicación potencialmente mortal en los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Mosier y Oberst, 2000). *Entamoeba histolytica* es la segunda causa de muerte por infección parasitaria después de la malaria (Ali y col., 2012). A nivel mundial, se ha estimado que anualmente se presentan 50 millones de casos de disentería y abscesos extra intestinales ocasionados por *Entamoeba histolytica*, resultando de 40,000 a 100,000 muertes (Kato y col., 2015). A pesar de que existen reportes que asocian la infección con *Blastocystis* spp. con manifestaciones clínicas, principalmente el Síndrome de Intestino Irritable (El Safadi y col., 2016; Osman y col., 2016), aun no hay consenso sobre su papel como patógeno, sin embargo, es bien sabido que es el protozoario intestinal más frecuente encontrado en muestras de heces humanas en todo el mundo (Hameed y col., 2011; Thompson y Smith, 2011) y, su prevalencia puede alcanzar el 30% en los países industrializados y más del 70% en los países en desarrollo (Mohamed y col., 2017).

Considerando la alta prevalencia de *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* y *Blastocystis* spp. a nivel mundial, diversos estudios se han enfocado a determinar los factores de riesgo asociados a las infecciones parasitarias causadas por ellos (Kiani y col., 2016). Los factores más comunes incluyen principalmente la falta de higiene personal, bajo nivel de educación, bajo nivel socioeconómico, ingestión de frutas, verduras, agua y alimentos contaminados con los estadios infectivos, edad, género, estado nutricional e inmune del huésped y el contacto con animales infectados (Kiani y col., 2016; Osman y col., 2016); las parasitosis intestinales sobre todo en niños genera un estado de desnutrición y retraso en el crecimiento físico y cognitivo (Berkman y col., 2002; Checkley y col., 1998; Valenzuela y col., 2014); sin embargo, los reportes realizados al respecto han asociado la presencia de cierto parásito con estas afectaciones, por lo que es de suma importancia determinar si existe coinfección en casos

en donde se ha determinado un proceso infeccioso y así determinar si el impacto en la salud se debe a una mono infección o coinfección.

La transmisión antroponótica (de humano a humano) es un factor común tanto para *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* y *Blastocystis* spp. (Ryan y col., 2014; Tan, 2008; Tanyuksel y Petri, 2003). La transmisión zoonótica (de animales a humano) se ha reportado en el caso de *Cryptosporidium* spp. y *Blastocystis* spp. Identificándose en una amplia gama de animales, tales como mamíferos, aves, anfibios y reptiles (Ryan y col., 2014; Tan, 2008). La vía fecal oral se considera el principal modo de infección de estos parásitos mediante el consumo de alimentos o agua contaminada con los estadios infecciosos (quistes y ooquistes) (El Safadi y col., 2016). Cuando ocurre el desenquistamiento en el intestino delgado y el parásito alcanza la mucosa intestinal y las células blanco, este se adhiere mediante lectinas de superficie que reconocen residuos de Gal/GalNAc en el caso de *Cryptosporidium* spp. y *Entamoeba histolytica* (Singh y col., 2016). Debido a la especificidad de unión de las lectinas a ciertos carbohidratos (Gal/NAcGal), éstas median las interacciones célula-célula y desempeñan un papel en la adhesión de los protozoarios y la citotoxicidad de las células huésped, por lo que son fundamentales para fisiopatología del parásito (Singh y col., 2016).

Hasta la fecha, no existen reportes referentes a las lectinas que se encuentran en la superficie de *Blastocystis* spp., como medio de adhesión e invasión. Sin embargo, su alta prevalencia a nivel mundial se suma a la idea de que los factores descritos en este estudio representen un alto riesgo de susceptibilidad a coinfección entre *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica* y *Blastocystis* spp.

El diagnóstico convencional de estos protozoarios se basa principalmente en el examen microscópico de muestras de heces, Sin embargo, la microscopía está limitada por una baja sensibilidad (60%) y especificidad (70%) (Boughattas y col., 2017). El análisis coproparasitológico es incapaz de distinguir entre las especies *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* ya que son morfológicamente idénticos entre si, así como las diferentes especies de *Cryptosporidium* spp. y los subtipos de *Blastocystis* spp. (Boughattas y col., 2017). Para ello se ha recurrido a técnicas moleculares que mejoran el estudio y el diagnóstico de estos protozoarios.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Cryptosporidium spp.

La primera descripción de *Cryptosporidium* spp. la realizó Tyzzer en 1907, el cual encontró al parásito en las criptas gástricas de un ratón. En 1910, Tyzzer propuso *Cryptosporidium muris* como un nuevo género y en 1912 reportó a una nueva especie "*Cryptosporidium parvum*". En 1976, se describió por primera vez en humanos inmunosuprimidos; los primeros casos reportados en humanos fueron en Estados Unidos e Inglaterra (Méndez Editores, 2000). Posteriormente, a raíz de un brote en Milwaukee en 1993 comenzaron a aparecer informes que describen la criptosporidiosis en una amplia gama de mamíferos, aves y reptiles a nivel mundial (Mac Kenzie y col., 1994). En la década de los 90, la aplicación de técnicas moleculares para la identificación de aislados de *Cryptosporidium* spp. aportó mayor comprensión de las especies y la especificidad del huésped (Fayer, 2004).

Cryptosporidium spp., son protozoarios intracelulares patógenos cuyo género pertenece al Phylum Apicomplexa, clase Coccidia, orden Eucoccidiorida y familia Cryptosporidiidae (Del Coco y col., 2009). Los ooquistes de *Cryptosporidium* spp. son altamente infectivos incluso antes de salir del hospedero (autoinfección), lo que difiere de otros coccidios cuyos ooquistes requieren un período de maduración fuera del huésped para convertirse en infeccioso. Su resistencia a condiciones adversas y a los tratamientos de potabilización del agua permiten su diseminación y persistencia en el ambiente (Del Coco y col., 2009; Fayer, 2004). Estos protozoarios infectan a diversas especies de animales incluyendo al hombre. Perros y gatos son infectados principalmente con *C. canis* y *C. felis* respectivamente. Mientras que los humanos son con mayor frecuencia infectados con *C. parvum* y *C. hominis* (Xiao y col., 2004). 27 genotipos del parásito morfológicamente indistinguibles han sido descritos en las últimas décadas (Fayer 2004).

La forma infectiva de *Cryptosporidium* spp. es el ooquiste, estadio de resistencia del parásito que permite la diseminación de la infección, el cual mide entre 4.5 y 5.9 μm de diámetro (Figura 1) y contiene en su interior 4 esporozoítos. Los esporozoítos son el estadio que participa en la adhesión e invasión de las células blanco (enterocitos), proceso mediado por proteínas del complejo apical el cual se encuentra en uno de los extremos de cada esporozoíto (Del Coco y col., 2009). El diámetro reportado para los esporozoítos de *Cryptosporidium* spp. oscilan entre 3.8 - 5.2 μm (Smith y col., 2005).

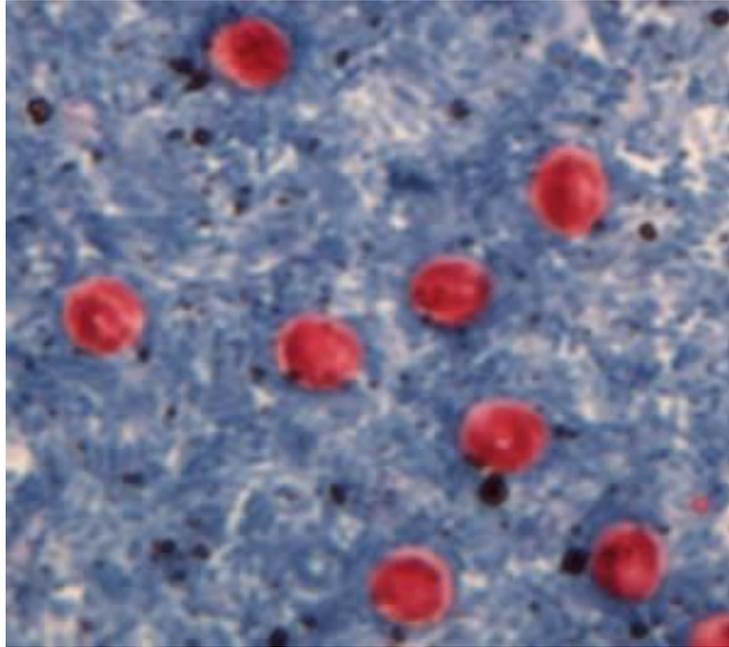


Figura 1. Ooquistes de *Cryptosporidium* spp. teñidos con Ziehl-Neelsen modificado. (CDC, 2016).

Ciclo de Vida de *Cryptosporidium* spp.

La fase infecciosa es el ooquiste, que contiene cuatro esporozoítos móviles. Los esporozoítos en forma de plátano se liberan a través de la sutura en la pared del ooquiste después de la exposición a la temperatura corporal, ácido estomacal, tripsina y sales biliares (proceso conocido como desenqistamiento) (Del Coco y col., 2009) y se unen íntimamente a la superficie de las células epiteliales que recubren el tracto gastrointestinal. Esta unión es mediada por las lectinas de superficie del esporozoíto que reconocen los residuos de Gal/GalNAc presentes en los enterocitos (Singh y col., 2016). Estas lectinas de superficie se unen a ligandos en las células huésped provocando el cambio de *Cryptosporidium* spp. de trofozoíto invasor a trofozoíto replicativo (Edwinson y col., 2016). La interacción de las lectinas superficiales de los esporozoítos específicas de Gal/GalNAc con la célula huésped explica la iniciación del proceso de infección y la remodelación adicional de actina en células huésped tras la invasión de *C. parvum*. a las células intestinales y epiteliales (Singh y col., 2016) . La lectina p30, aislada de *C. parvum* y *C. hominis*, se localiza en la región apical de los esporozoitos y se asocia con gp900 y gp40 (glicoproteínas de tipo mucina), que en conjunto median la infección (Singh y col., 2016). La lectina p30 existe como un homodímero u homotetrámero de aproximadamente 30 kDa, específica de Gal / GalNAc y está codificada por un gen que se conserva entre las dos especies principales de *Cryptosporidium*. (Bhat y col., 2007).

Los esporozoítos invaden a los enterocitos para iniciar el ciclo asexual de reproducción (Figura 2). Los esporozoítos y todas las etapas asexuales y sexuales endógenas subsecuentes se desarrollan dentro de una vacuola parasitófora intracelular. Los esporozoítos se diferencian en trofozoítos esféricos y la división nuclear da como resultado la producción del estadio multinucleado de esquizontes (esquizogonía). Los esquizontes tipo I contienen de 6 a 8 núcleos que maduran en merozoítos. Los merozoítos de los esquizontes tipo I pueden infectar células vecinas y someterse a un ciclo de multiplicación asexual similar al descrito para la etapa de trofozoíto, y producir progenie de merozoítos de tipo I, o desarrollarse en un esquizonte de tipo II. Cada esquizontes de tipo II maduro se desarrolla a cuatro merozoítos de tipo II que se cree que inician el ciclo sexual (Smith y col., 2005). En la multiplicación sexual, los merozoítos individuales producen microgametos (masculino) o macrogametos (femenino). La división nuclear en el microgameto conduce a la producción de numerosos microgametos que se liberan de la vacuola parasitófora y cada macrogameto es fertilizado por un microgameto.

El producto de la fertilización, el cigoto, se convierte en un ooquiste. El cigoto se diferencia a ooquistes de pared delgada los cuales participan en el proceso de autoinfección, sobre todo en personas con estreñimiento; estos ooquistes de pared delgada maduran a ooquistes de pared

gruesa que son los que se excretan en las heces fecales como ooquistes completamente esporulados (cada uno de ellos con cuatro esporozoítos), los cuales serán infecciosos para otros huéspedes susceptibles. En este ciclo de vida, tanto los merozoítos que participan en la generación de merontes tipo I (esquizontes tipo I) como la reinfección endógena de los ooquistes de pared delgada aseguran un gran número de ooquistes infecciosos (de paredes gruesas) se excreten en las heces (Smith y col., 2005).

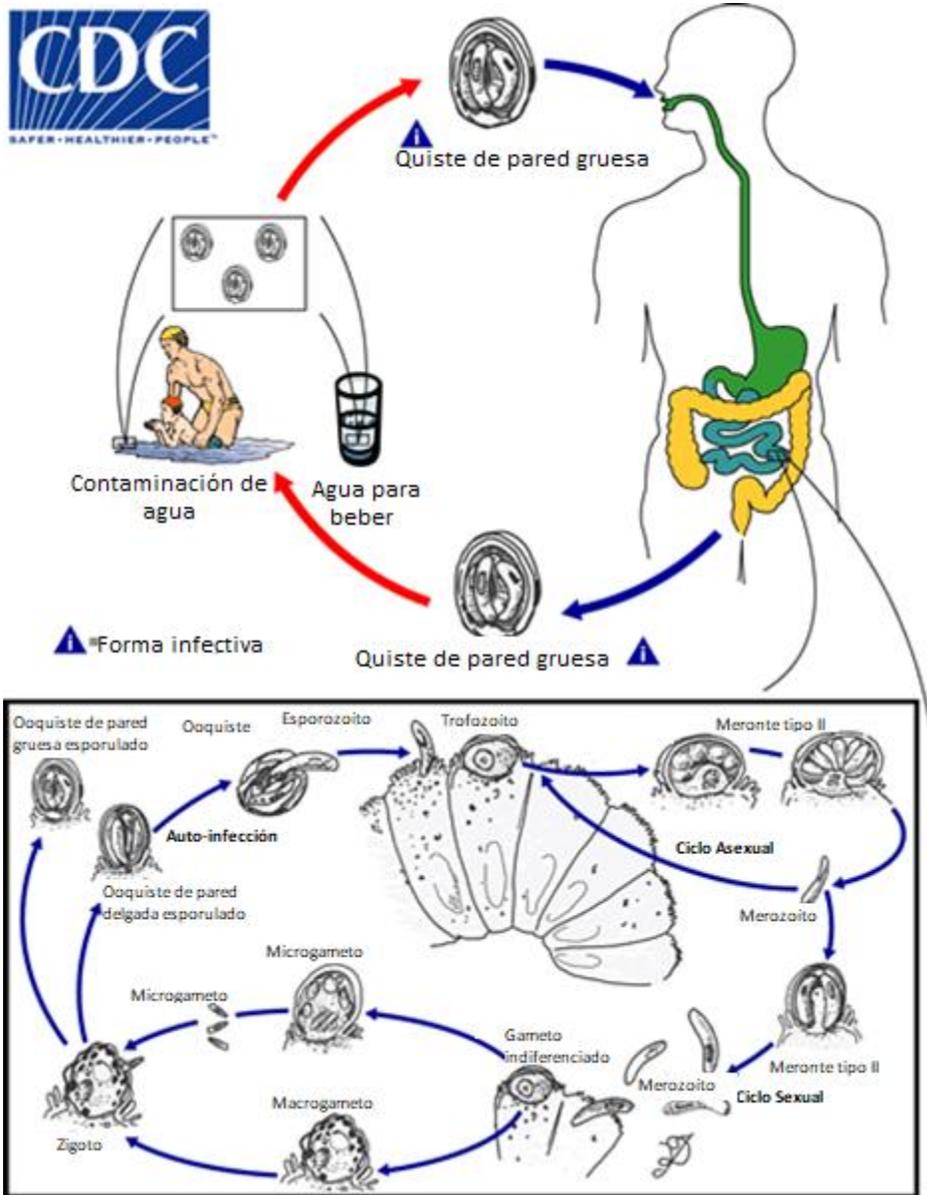


Figura 2. Imagen representativa del ciclo de vida de *Cryptosporidium* spp. (CDC, 2016).

Criptosporidiosis

La criptosporidiosis es una enfermedad ocasionada por genotipos del parásito *Cryptosporidium*. El cuadro clínico dependerá de características propias del hospedador, tales como especie, edad, estado inmunológico, así como de la especie parasitaria involucrada y la dosis infectiva (Del Coco y col., 2009). Afecta principalmente a niños y personas inmunocomprometidas, los cuales, generalmente presentan los signos y síntomas de la gastroenteritis aguda: diarrea, dolor abdominal y en algunos casos vómito y fiebre (Del Coco y col., 2009). En niños puede causar desnutrición y afectar permanentemente el crecimiento, resultando en una disminución funcional de la aptitud física y la capacidad cognitiva (Berkman y col., 2002; Checkley y col., 1998; Valenzuela y col., 2014).

Cryptosporidium spp. es altamente infeccioso, tan solo con la ingesta de treinta ooquistes pueden causar infección en personas sanas (Snelling y col., 2007). El Centro de Control de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) en Estados Unidos ha reportado infecciones extraintestinales de *Cryptosporidium* spp. incluyendo los pulmones, conductos biliares y la conjuntiva (CDC, 2016). Las manifestaciones clínicas y la aparición de complicaciones extraintestinales dependerán del recuento de linfocitos CD4+/mm³ (Del Coco y col., 2009). Cuando este número es superior a 200/mm³ la infección se autolimita. En pacientes con inmunodeficiencias y diarrea por *Cryptosporidium* spp. se ha descrito un promedio de 145 células/mm³ y la infección ocasiona cuadros clínicos más graves y prolongados, mientras que en pacientes inmunocompetentes el recuento promedio de células CD4+ es de 312 células/mm³ causando una infección asintomática o con un cuadro clínico de 9 a 15 días (Del Coco y col., 2009; Muthusamy y col., 2006).

El diagnóstico de criptosporidiosis intestinal se efectúa mediante la búsqueda e identificación de ooquistes en la materia fecal (Del Coco y col., 2009). Para la identificación de los ooquistes al microscopio óptico, suelen utilizarse las técnicas de coloración de Ziehl-Neelsen y Kinyoun modificadas. También pueden emplearse tinciones para microscopía de fluorescencia. En la actualidad se recurre a técnicas moleculares para identificar especies y genotipos de *Cryptosporidium* ya que las diferencias en los ooquistes son morfológicamente indetectables (Fayer, 2004).

Entamoeba histolytica

Entamoeba histolytica fue descubierta en el año 1875 por Lösch en Leningrado (antiguamente San Petersburgo), Rusia. Lösch encontró los trofozoítos del parásito en las heces de un enfermo

de disentería y las úlceras del colon al momento de la autopsia del mismo paciente; aunque no llegó a sospechar que fueran la causa de la enfermedad. Posteriormente, Kartulis (1886), de Hlava (1887) y Concilman (1891) dieron las pruebas de que dicha amiba era el agente causal de disentería y absceso hepático (Méndez Editores, 2000).

Entamoeba histolytica es un protozooario extracelular patógeno y es el agente etiológico de la amibiasis humana. Pertenece al subfilo Sarcodina, clase Lobosea, y familia Entamoebidae. Existe en dos estadios: el quiste infeccioso el cual es la forma resistente y mide de 10 a 15 μm de diámetro (Figura 3); y el trofozoíto que es la forma móvil y potencialmente patógeno que llega a medir de 10 a 60 μm de diámetro y de forma irregular (Figura 4) (Tanyuksel y Petri, 2003).

Existen dos especies que son idénticas morfológicamente, *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar*. Ambas especies se comportan de manera diferente en los huéspedes infectados ya que *Entamoeba dispar* no se considera patógena; aunque comparten ciclos biológicos, nichos ecológicos y mecanismos de transmisión en huéspedes humanos (Ramos, 2005). La morfología de estas especies ha complicado su diagnóstico diferencial (Ximénez y col., 2010). Por lo tanto, es posible obtener datos epidemiológicos más fiables y correctos basándose en características moleculares, bioquímicas e inmunológicas ya que estos permiten un mejor diagnóstico y tratamiento (Tanyuksel y Petri, 2003).



Figura 3. Quiste de *E. histolytica* / *E. dispar* en observación directa con lugol (CDC, 2016).



Figura 4. Trofozoíto de *E. histolytica* / *E. dispar* en observación directa con lugol (CDC, 2016).

Ciclo de Vida de *Entamoeba histolytica*

La fuente de infección y diseminación de *Entamoeba histolytica* es el humano. El parásito pasa de persona a persona propiciado por el fecalismo y la coprofagia humana. (Becerril, 2011) Las heces infectadas con la forma quística del parásito pueden contaminar alimentos, fomites y agua. La otra fuente común de transmisión es el contacto sexual oral-anal (Tanyuksel y Petri, 2003).

Los seres humanos son infectados por la ingestión de estos quistes, que viajan a través del tracto gastrointestinal y por efecto del pH, jugos gástricos y las enzimas hidrolíticas da inicio el proceso de desenquistamiento, mediante el cual se liberan los trofozoítos (íleon terminal). Los trofozoítos se adhieren mediante el uso de lectinas Gal/GalNAc al endotelio intestinal (Tanyuksel y Petri, 2003).

La lectina de *E. histolytica* reconoce y es inhibida por Gal/GalNAc; la cual participa en la adhesión del parásito a la célula huésped y la actividad citolítica del parásito. Por lo tanto desempeña un papel importante en la patogénesis de la amibiasis (Singh y col., 2016). La lectina Gal/GalNAc puede estimular la inducción de diversas citoquinas a partir de células epiteliales intestinales estimulando así a las células inmunes del huésped (Singh y col., 2016). La lectina Gal / GalNAc consiste en subunidades pesadas (Hgl), ligeras (Lgl) e intermedias (Igl). Esta lectina de 260 kDa es un heterodímero de glicoproteínas transmembrana (Hgl, 170 kDa) y

glicosilfosfatidilinositol (GPI, Igl, 150 kDa) ligadas a la subunidad ligera (Lgl, 35/31 kDa) unidas por enlaces disulfuro. Hgl contiene un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y es la molécula clave en la adherencia amebiana (Kato y col., 2015). A partir de ahí, los trofozoítos pueden migrar a otros órganos, causando infecciones extraintestinales (Tanyuksel y Petri, 2003) (Figura 5).

Los trofozoítos se mueven extendiendo proyecciones de citoplasma, llamadas pseudópodos. También utilizan estas proyecciones para rodear y envolver las partículas de alimentos. El trofozoíto de *E. histolytica* al sentir condiciones adversas, como cambio de pH, temperatura, o carencia de nutrientes inicia el proceso de enquistamiento, dando origen a los prequistes y los cuales maduran a quistes tetranucleados, proceso que se va dando mientras que el parásito migra a través del tracto gastrointestinal hasta ser excretado en heces fecales como quiste maduro o en casos de diarrea se pueden identificar incluso el estadio de trofozoíto. Los quistes pueden permanecer vivos fuera del huésped durante semanas o meses (Tanyuksel y Petri, 2003).

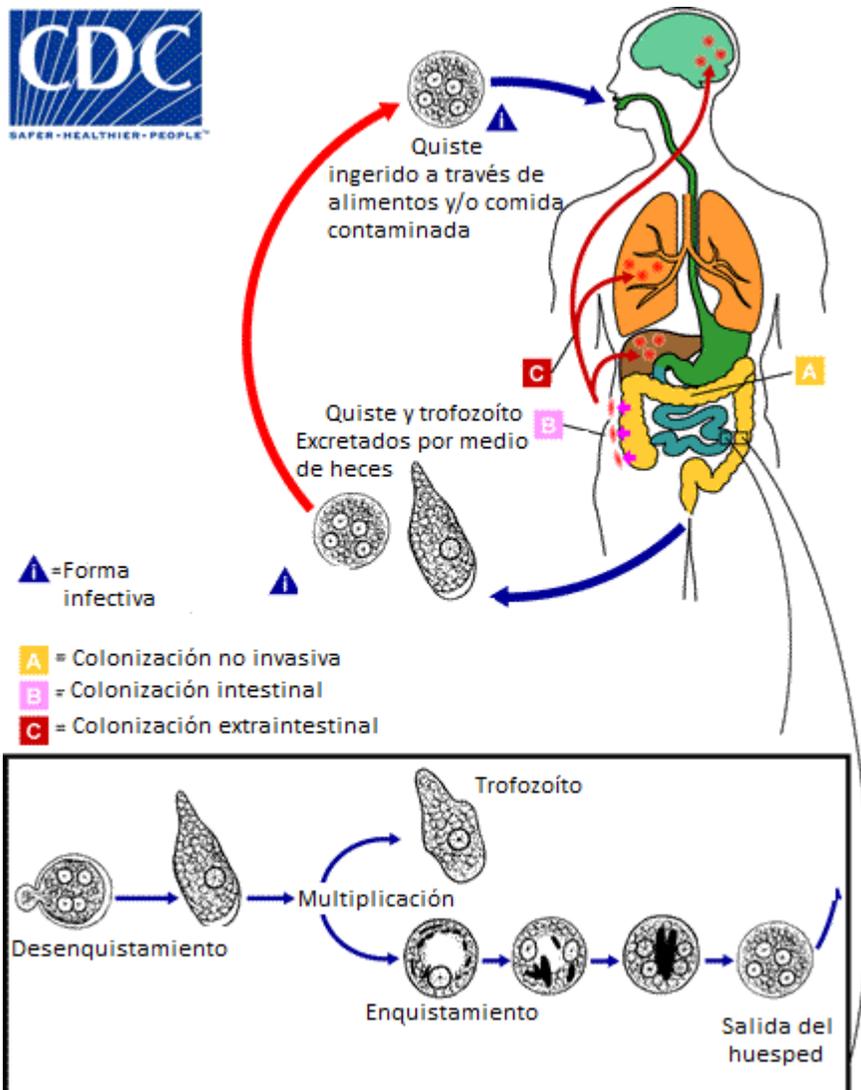


Figura 5. Imagen representativa del ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* (CDC, 2016).

Amibiasis

El período de incubación de la amebiasis intestinal generalmente es de 1 a 4 semanas (Tanyuksel y Petri, 2003). En el 90% de las infecciones por *E. histolytica*, cursan como portadores asintomáticos, mientras que el otro 10% presenta síntomas. Las principales formas clínicas de infección por *E. histolytica* son la disentería amebiana y el absceso hepático amebiano (AHA) (Becerril, 2011). En la disentería amebiana, los trofozoítos invaden la mucosa intestinal y se observa diarrea con moco y sangre (melena) y fiebre ocurre en un tercio de los pacientes (Tanyuksel y Petri, 2003). En AHA los trofozoítos invaden de manera extraintestinal, alcanzando el parénquima hepático; logrando identificar en algunos casos abscesos múltiples (Valenzuela y col., 2009). Las personas con absceso hepático amebiano pueden presentar los siguientes síntomas: dolor intenso en la región hepática y en hipocondrio derecho, fiebre y pérdida de peso (Valenzuela y col., 2009).

Durante la disentería amebiana, los sitios que con más frecuencia se infectan por *E. histolytica* en el intestino son el colon, ciego y recto (Becerril, 2011). En ellos, los trofozoítos causan necrosis al epitelio intestinal, penetran la mucosa y se extienden provocando una úlcera. Alrededor del sitio de penetración se produce un foco inflamatorio que conduce a edema redondeado con un centro necrótico lleno de tejido mucoide y algunas veces hay sangre. Estas úlceras miden entre 0.1 y 0.5 cm de diámetro (Becerril, 2011).

La infección hepática resulta de la migración de trofozoítos a través de la vena porta. En el absceso, el parénquima hepático está situado por restos necróticos con escasos trofozoítos y células inflamatorias. La lisis de los neutrófilos por las amibas libera productos tóxicos que contribuyen a la destrucción del tejido. El color del fluido puede variar de amarillento a café oscuro con apariencia pastosa (Becerril, 2011).

El diagnóstico clínico de amebiasis es difícil debido a la naturaleza inespecífica de los síntomas; se confunde fácilmente con shigelosis (*Shigella dysenteriae* y *S. flexneri*) y otras disenterías bacterianas (*Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli*) comunes en los países tropicales y subtropicales (Tanyuksel y Petri, 2003). La amibiasis se diagnostica con exámenes coproparasitológicos, mediante los cuales se identifican los estadios: trofozoítos y quistes. En casos de sospecha de amibiasis extraintestinal como AHA, se llevan a cabo pruebas serológicas en las que se detectan anticuerpos mediante técnicas inmunológicas como ELISA; junto con la evaluación del daño mediante tomografía y ultrasonidos (Becerril, 2011).

***Blastocystis* spp.**

Blastocystis spp. fue observado por primera vez desde el siglo XX en muchos animales, incluyendo aves, reptiles, roedores y cerdos; sin embargo, era ignorado o considerado como levadura hasta que, en 1912, Brumpt acuñó el término de *Blastocystis hominis* debido a sus trabajos realizados con heces humanas (Méndez Editores, 2000). No fue sino hasta el 2007 donde se realizó un consenso para proponer y estandarizar el nombre de *Blastocystis* debido a las confusiones entre los hallazgos en reptiles y anfibios con los de mamíferos y aves. Se propuso entonces utilizar el nombre *Blastocystis* spp. para evitar controversias (Stensvold y col., 2007).

Blastocystis spp. es un protozooario extracelular intestinal anaeróbico emergente, comúnmente identificado en las heces de varios animales, incluyendo humanos (Stenzel y Boreham, 1996). Presenta morfología de dimensiones variadas con un intervalo promedio de 5 y 200 μm ya que su ciclo de vida comprende numerosas formas: quiste, granular, multivacuolar, avacuolar, vacuolar y ameboides (Mohamed y col., 2017; Stenzel y Boreham, 1996). La forma vacuolar es la más comúnmente encontrada en muestras fecales.

Blastocystis spp. tiene un alto polimorfismo genético y se han identificado al menos 17 subtipos (ST) morfológicamente indistinguibles. Los ST1-ST4 son los más frecuentemente encontrados en humanos en todo el mundo (Villegas-Gómez y col., 2016).

Ciclo de Vida de *Blastocystis* spp.

El conocimiento del ciclo de vida y de la transmisión está aún bajo investigación, por lo que solo existe un ciclo de vida propuesto para *Blastocystis* spp. (CDC, 1016). Este se compone de seis estadios morfológicos (Figura 6):

Forma vacuolar: Es la forma que se encuentra con mayor frecuencia en las heces de pacientes infectados. La posición central está ocupada por una gran vacuola que contiene hidratos de carbono y lípidos, con funciones de reserva o de multiplicación celular. Esta forma mide de 5 a 15 μm , pero puede alcanzar 200 μm de diámetro y posee 1 a 4 núcleos.

Forma granular: Esta forma mide entre 2 y 40 μm , posee 1 a 4 núcleos y presenta gran cantidad de gránulos en el citoplasma y dentro de la vacuola. Estas granulaciones tienen varias funciones en la célula y se clasifican en 3 grupos funcionales: metabólicos, reproductivos y lipídicos.

Forma ameboide: Esta forma muestra una morfología irregular. El citoplasma puede albergar a una o a múltiples vacuolas, contiene 1 a 2 núcleos y mide entre 3 y 8 μm . La presencia de partículas ingeridas (bacterias o detritos celulares) sugiere un papel en la nutrición parasitaria.

Forma quística: Los quistes son esféricos u ovoides, miden de 2 a 40 μm y están rodeados por una pared celular multilaminar. El contenido celular incluye múltiples vacuolas y depósitos de glucógeno y lípidos. El número de núcleos puede variar de 1 a 4, sin embargo, los quistes aislados son con frecuencia binucleados.

Formas multivacuolar y avacuolar: Estas formas miden alrededor de 8 μm , aunque pueden alcanzar los 200 μm tienen 1 a 2 núcleos y carecen de cápsula. Se han detectado ambas formas en heces frescas y observaciones recientes han sugerido que son las formas predominantes in vivo.

El quiste de pared gruesa presente en las heces es responsable de la transmisión externa, a través de la ingestión de agua o alimento contaminado. El desenquistamiento se produce en el intestino grueso del hospedador infectando las células epiteliales del tracto digestivo y multiplicándose asexualmente. Las formas vacuolares del parásito dan origen a las formas multivacuolar y ameboide. La forma multivacuolar se convierte en un pre-quiste que da origen a un quiste de pared delgada, que se cree responsable de la autoinfección. La forma ameboide da origen a un pre-quiste, que se convierte en un quiste de paredes gruesas (Figura 7). Los quistes de pared gruesa se excretan en las heces y son capaces de sobrevivir durante un mes a temperatura ambiente y 2 meses a 4°C; no obstante, esta forma es sensible a las temperaturas extremas y a los desinfectantes comunes (CDC, 2016).

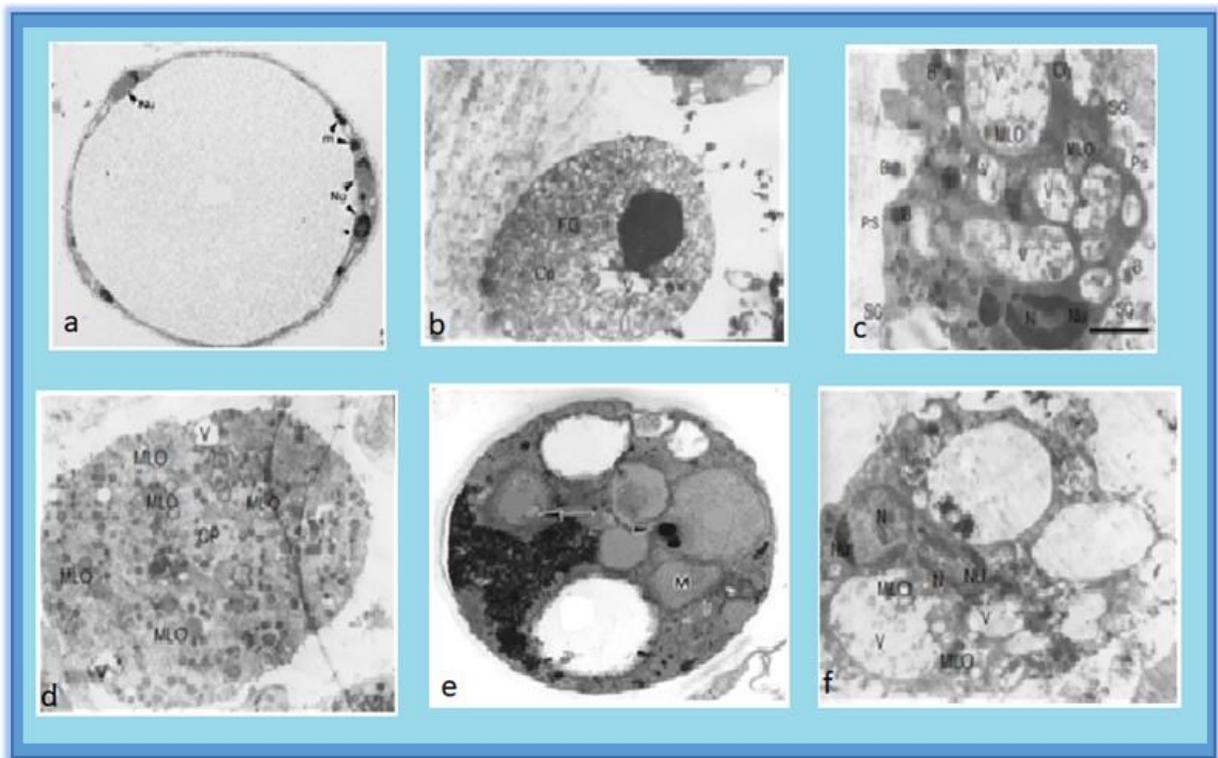


Figura 6. Estadios morfológicos de *Blastocystis* spp. a) Vacuolar; b) Granular; c) Ameboide; d) Avacuolar; e) Quistica; f) Multivacuolar (Zhang y col., 2011).

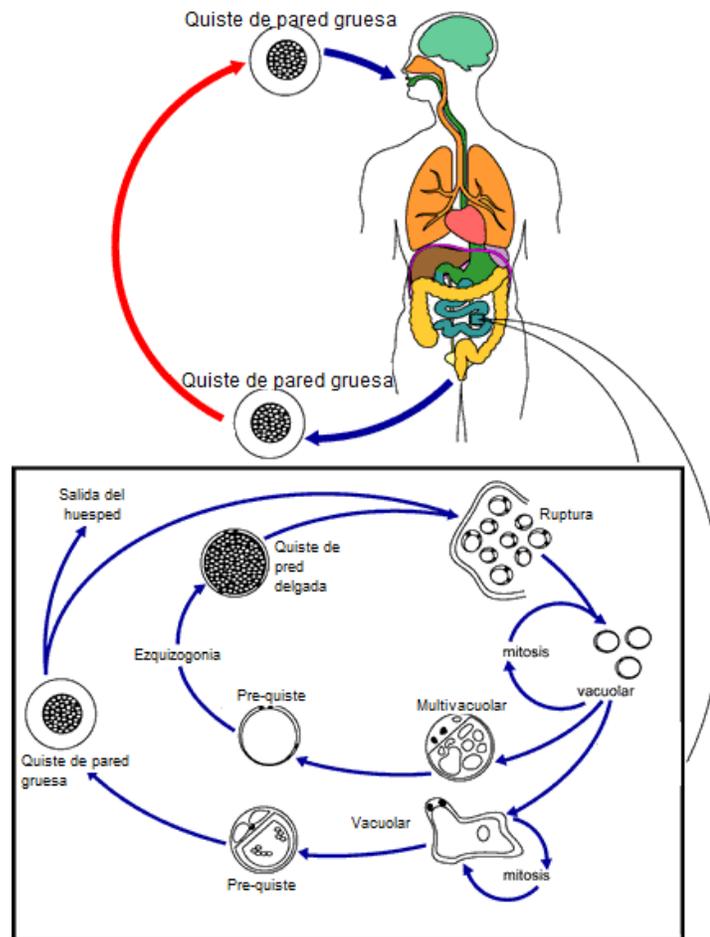


Figura 7. Imagen representativa del ciclo de vida de *Blastocystis* spp. (CDC, 2016).

Blastosistosis

Blastocystis spp. es el protozoario intestinal más frecuente encontrado en muestras de heces humanas en todo el mundo (Hameed y col., 2011; Thompson y Smith, 2011), sin embargo su papel como patógeno no está definido hasta ahora; a pesar de esto, se han reportado las características clínicas de la infección con este parásito, las cuales incluyen síntomas gastrointestinales como náuseas, anorexia, flatulencia y diarrea aguda o crónica (Osman y col., 2016) y se asocia al síndrome del intestino irritable (El Safadi y col., 2016). La prevalencia de los diferentes subtipos (ST) varía de un país a otro y entre diferentes regiones dentro del mismo país (Villegas-Gómez y col., 2016). La amplia gama de respuestas a la infección por *Blastocystis* spp. podría estar relacionada con la diversidad genética de los especímenes morfológicamente indistinguibles (Santín y col., 2011).

La investigación sobre *Blastocystis* spp. se ha incrementado en la última década, no obstante, aunque se han descrito factores de virulencia que se asocian con la patogenicidad del parásito (Denoeud y col., 2011), su papel patogénico continúa siendo controversial ya que ha sido identificado en individuos asintomáticos y sintomáticos en los cuales es el organismo causal de la enfermedad; las bases moleculares y celulares para su patogenicidad tampoco han sido completamente dilucidadas y, además, la falta de modelos animales adecuados para su investigación ha impedido que los postulados de Koch para este parásito se hayan cumplido hasta la fecha (Ajjampur y col., 2016).

El diagnóstico parasitológico de rutina se basa en la observación de los elementos parasitarios en las heces en forma directa, con agregado de lugol, o teñidos con Giemsa. El polimorfismo que demuestra este parásito puede dificultar su identificación microscópica. En la actualidad, el cultivo en medio axénico es considerado el estándar de oro para la detección de *Blastocystis* spp. Este método es más sensible que la microscopia, pero insume tiempo y no está disponible en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico. Los métodos moleculares son una herramienta rápida y altamente sensible para la identificación del parásito y la detección de subtipos (Del Coco y col., 2016).

Factores de Riesgo a Parasitosis

Los animales, incluyendo humanos, han desarrollado una gama de mecanismos de defensa en contra de parásitos, las más conocidas son aquellas que previenen infección o controlan la proliferación del parásito, es decir, los mecanismos que aumentan la resistencia del huésped

(mucosa epitelial, péptidos antimicrobianos, células fagocíticas) (Raberg, 2014); sin embargo, también existe otro tipo de mecanismo de defensa que limita el daño de los parásitos, a esto se le conoce como tolerancia (genes de reparación de tejidos y eliminación de toxinas) (Raberg, 2014). La diferencia crucial es que la resistencia reduce el riesgo de infección y/o la tasa de replicación del parásito en el huésped, mientras que la tolerancia no (Raberg, 2014). A pesar de esto, existen factores de riesgo que aumentan la posibilidad del desarrollo de la enfermedad.

Edad y Género en Relación a la Zona Geográfica

En cuanto a la edad de las personas con parasitosis, la mayoría de las investigaciones enfocadas a protozoarios intestinales reportan que los más propensos son los niños menores de 10 años (Haider y col., 2012; Osman y col., 2016) y esto lo asocian a su bajo nivel de ingresos económicos como causa de desnutrición y estilo de vida (Boughattas y col., 2017; Kau y col., 2011; Nithyamathi y col., 2016).

En cuanto al género, los reportes varían dependiendo de la región. En Francia, el género no representa un factor de riesgo potencial para la infección por *Blastocystis* spp. (El Safadi y col., 2016), mientras que en Pakistán se reportó que las mujeres eran mucho más propensas a infección por *Blastocystis* spp. que los varones (Haider y col., 2012); de manera similar, estudios recientes en Irán han reportado que el género no es un factor de riesgo importante para la infección con *Cryptosporidium* spp. (Mohaghegh y col., 2017); y estudios en otras partes del mundo difieren en que la prevalencia es mayor en mujeres (Laubach y col., 2004) o en varones (Adler y col., 2017). A nivel mundial la prevalencia de AHA ha mostrado una prevalencia de cuatro veces mayor en hombres que en mujeres (Valenzuela y col., 2007); sin embargo, la amibiasis se presenta con una prevalencia mayor en mujeres que en hombres (Ramos y col., 2005; Ximénez y col., 2010).

Estado Inmune del Huésped

En inmunocompetentes se ha visto que la respuesta a la infección por ciertos protozoarios intestinales causa que ésta sea autolimitada, como es en el caso de criptosporidiosis y blastocitosis (Del Coco y col., 2009). En personas inmunocomprometidas, ya sea por la presencia de virus (HIV) (Haider y col., 2012), o por desnutrición (Qian y col., 2017) incrementa el riesgo de contraer infección por protozoarios.

La desnutrición es el resultado de una discrepancia entre los requerimientos de energía-nutrientes y la ingesta de alimentos (Barni y col., 2017). Se considera que la desnutrición ocasiona hasta un tercio de las muertes infantiles en todo el mundo, lo que contribuye cerca de 3.7 millones de muertes por año entre los niños menores de 5 años de edad. La deficiencia de nutrientes aumenta la susceptibilidad y la gravedad de las enfermedades infecciosas incluyendo las parasitarias, ya que numerosos estudios le consideran como un factor muy importante como causa de deficiencia en el sistema inmune (Black y col., 2008; Caulfield y col., 2004; Ibrahim y col., 2014; Kau y col., 2011).

Contacto con Animales

La transmisión zoonótica es una de las más comunes en la infección con protozoarios. Se ha estimado que casi 450,000 casos de enfermedad por organismos entéricos pueden atribuirse al contacto con animales cada año (Todd, 2017). Estas infecciones pueden surgir individualmente o en brotes. La piel, el pelo, las plumas y la saliva pueden cargarse con organismos que pueden ser transferidos al tocar, acariciar y alimentar a los animales (Todd, 2017). El comer y beber en lugares cerca de animales puede incrementar el riesgo de contraer infecciones entéricas incluyendo a las causadas por protozoarios intestinales (Todd, 2017).

Higiene y Nivel Socioeconómico

El efecto del nivel socioeconómico en las infecciones parasitarias es de naturaleza compleja y está estrechamente asociado con un saneamiento ambiental deficiente, comportamiento personal y sanitario, hacinamiento y servicios de salud empobrecidos (Rajoo y col., 2017), así como la falta de educación al respecto (Ngui y col., 2011). Estudios han demostrado que en las comunidades pobres ésta red de factores de riesgo está significativamente asociada con la alta prevalencia de infecciones parasitarias entre estas comunidades (Ngui y col., 2011; Rajoo y col., 2017). Un ejemplo claro de esto es la presencia de letrinas o ausencia total de retretes, lo que fomenta a los habitantes de dichas comunidades a la defecación indiscriminada, ya sea cerca de sus casas o en los ríos, provocando la contaminación de suelo y agua (Rajoo y col., 2017).

Impacto de la Coinfección con Patógenos Entéricos

Se ha observado que la diarrea severa puede variar considerablemente debido a coinfección por patógenos entéricos, principalmente por la combinación de virus como *Rotavirus* de grupo A, *Norovirus* y *Adenovirus* (Zhang y col., 2016). Así mismo, la presencia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en algunas personas, las hace más vulnerables a coinfección y presentar complicaciones clínicas causadas por parásitos intestinales como *Cryptosporidium* spp. (Fregonesi y col., 2015).

La superficie del tracto gastrointestinal está cubierta por una capa de moco denso y viscoso compuesto principalmente por mucinas (Kissoon y col., 2013). Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular que actúan como el principal componente estructural del moco, dando lugar a sus propiedades poliméricas, viscoelásticas y protectoras (Wang y col., 2015). Se han identificado más de 20 tipos de mucina y se clasifican en: mucinas formadoras de gel (MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6); y mucinas transmembrana (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12 y MUC17) (Wang y col., 2017). Las defensas innatas del colon incluyen a la mucina MUC2 glicosilada como primer barrera frente a patógenos entéricos. Esta es secretada por las células caliciformes en el intestino (Cobo y col., 2017). Algunos protozoarios, como *Entamoeba histolytica* puede adherirse a los residuos de carbohidratos presentes en la capa de moco intestinal mediante la lectina Gal/GalNAc, posteriormente degrada el moco intestinal (MUC2) mediante la segregación de proteinasas (específicamente mucinasas) y, de esta manera, llegar hasta las células intestinales (Chadee y col., 1987; Cobo y col., 2017; Lidell y col., 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

Este es un estudio transversal descriptivo.

Criterios de Inclusión

Se analizaron las muestras de ADN total de heces de 42 pacientes con diagnóstico etiológico y clínico de criptosporidiosis; edad y género indistinto. Es importante mencionar que la extracción de ADN (Anexo 1), así como el estudio coproparasitoscópico (tinción de Kinyoun y lugol) se realizaron previo a este trabajo (Urrea-Quezada y col., 2017).

Consideraciones Bioéticas

El protocolo de investigación está aprobado por los comités de ética de las instituciones participantes: Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) y Centro Médico Dr. Ignacio Chávez (CMDICH). El consentimiento informado fue obtenido del tutor de cada participante infectado con *Cryptosporidium* spp después de una clara explicación de los objetivos de la investigación (Anexo 2).

Amplificación del Gen de la Subunidad Pequeña Ribosomal (SSU rDNA) de *Blastocystis* spp. y de la Región Intergénica SQ de *Entamoeba histolytica* Mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se etiquetó un tubo como mezcla de reacción para cada marcador molecular y se vació en él los reactivos por orden (Tabla 1). Se multiplicaron todos los reactivos por el total de muestras a amplificar con objeto de que al realizar esta mezcla se vaciara la cantidad exacta de los reactivos que conforman la mezcla de reacción y sea la cantidad adecuada para que se pueda llevar a cabo la amplificación. Se prepararon los tubos controles, los tubos muestra y se colocaron en el termociclador MyCycler™ (BIO RAD) se encendió y programó con las condiciones específicas según los iniciadores utilizados (Santín y col., 2011; Valenzuela y col., 2009) (Tabla 2).

Tabla 1. Mezcla de reacción para la amplificación del gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rDNA) de *Blastocystis* spp. y de la región intergénica SQ de *Entamoeba histolytica*.

	SSUrDNA de <i>Blastocystis</i> spp.	SQ de <i>Entamoeba</i> <i>histolytica</i>
Reactivo	Volumen	Volumen
Agua	28.1 µL	13.9 µL
Amortiguador (10X)	5.0 µL	2.0 µL
MgCl ₂ (25 mM)	3.0 µL	1.2 µL
Albúmina (10 mg/dL)	2.0 µL	–
Desoxinucleótidos (1.25 mM)	8.0 µL	1.6 µL
Iniciadores		
SSU rDNA 5' (10 µM)	1.3 µL	0.1 µL
SSU rDNA 3' (10 µM)	1.3 µL	0.1 µL
Taq polimerasa (2.5 U/ µL)	0.3 µL	0.1 µL
Muestra	1.0 µL	1.0 µL
Total	50.0 µL	20.0 µL

Tabla 2. Condiciones del termociclador para la amplificación del gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rDNA) de *Blastocystis* spp. y de la región intergénica SQ de *Entamoeba histolytica*.

	SSU rDNA		SQ	
	Temperatura	Tiempo (segundos)	Temperatura	Tiempo (minutos)
Inicial	94°C	180	95°C	10
35 ciclos	94°C	45	94°C	0.5
	55°C	45	59°C	0.5
	72°C	60	72°C	0.5
Final	72°C	420	72°C	8

Para amplificar una región polimórfica de ~480 pb del gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rDNA) de *Blastocystis* spp. se emplearon los siguientes iniciadores: SSU rDNA5' y SSU rDNA3' (Santín y col., 2011). Para amplificar una región intergénica del ARN de transferencia de *Entamoeba histolytica* se emplearon: SQ5' y SQ3' (Valenzuela y col., 2009) (Tabla 3); los cuales amplifican un segmento de 480 y 360 pb respectivamente.

Tabla 3. Secuencia de los iniciadores utilizados en las reacciones de PCR para la amplificación del gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rDNA) de *Blastocystis* spp. y de la región intergénica SQ de *Entamoeba histolytica*.

Iniciadores	Secuencia	Pares de bases (pb)
SSU rDNA5'	GGA GGT AGT GAC AAT AAA TC	480
SSU rDNA3'	TGC TTT CGC ACT TGT TCA TC	480
SQ5'	GTG GTC TAA GG CGT GTG ACT	360
SQ3'	GTG GGA CCA CTT TTT ATA CCT A	360

Revelado Mediante Electroforesis de los Amplicones Productos de PCR

Se preparó el gel de agarosa al 1.2%. Para lo cual pesaron 0.36 g de agarosa y se disolvieron en 30 mL de amortiguador TAE 1X con Sybersafe. Se calentaron los reactivos (Gel de agarosa y Buffer TAE 1X con Sybersafe) dentro del microondas en un frasco de vidrio por 25 segundos, se esperó a que enfriara y se dejó gelificar en el soporte para el gel. El gel se montó en la cámara de electroforesis y se agregó aproximadamente 300 mL de solución TAE 1X. En el primer pocillo del gel se agregaron 2 μ L del marcador de pares de bases TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (invitrogen; EUA) mezclado con 2 μ L de amortiguador de carga. Para los siguientes siete pocillos se mezclaron 7 μ L de amplicón y 2 μ L de amortiguador de carga. Se realizó la corrida electroforética con 80 volts por cincuenta minutos. Acabado el tiempo se escurrió el gel y se colocó en un fotodocumentador GelDoc™ XR+ (BIO RAD) para tomar la foto.

Análisis Estadístico

Para el análisis de resultados se determinó el porcentaje de coinfección en pacientes con criptosporidiosis en tablas del programa Excel.

RESULTADOS

Edad y Género de los Participantes

Se diagnosticó la coinfección de *Entamoeba histolytica* y *Blastocystis* spp. en 42 muestras de ADN extraído de pacientes con criptosporidiosis, todos ellos ≤ 9 años de edad. El 88.1% (37/42) de los niños fueron ≤ 4 años (Tabla 4). El 52.4% de los casos reclutados en el estudio son del sexo masculino (22/42).

Coinfección de los Casos con Criptosporidiosis

En el 7.14% (3/42) de las muestras de ADN analizadas se encontró coinfección con *Blastocystis* spp. y en ningún caso se identificó a *Entamoeba histolytica* (Tabla 4); sin embargo, es importante mencionar una discrepancia entre esos resultados y el resultado de la observación directa con lugol reportado en estudio previo; ya que se tenía reporte de un caso con *Blastocystis* spp. el cual resultó negativo por PCR. Además, los casos positivos a *Blastocystis* spp. por PCR se reportaron negativos a la tinción con lugol (Figura 8). No encontramos coinfección mediante PCR con *E. histolytica* (Figura 9); sin embargo, en el estudio previo se reportaron dos muestras con quistes de *E. histolytica* / *E. dispar*.

Características Clínicas de los Casos Coinfectados con *Blastocystis* spp.

Los tres casos de coinfección de *Cryptosporidium* spp. y *Blastocystis* spp. coincidieron con la especie infectante, la cual resultó ser *C. parvum*. Dos de ellos del sexo masculino (6 y 7 años de edad) y uno del sexo femenino (7 años de edad) (Tabla 4). Los niños de 7 años de edad provienen del Internado Cruz Gálvez y el niño de 6 años del Departamento de Infectología del HIES con diagnóstico VIH además de Herpes virus, gastroenteritis aguda, desnutrición severa, y candidiasis oral. Mientras que el segundo paciente masculino presentó flatulencias, dolor abdominal y náuseas. En el caso del paciente femenino no se lograron obtener datos de las manifestaciones clínicas ya que no se consiguió acceso a su expediente (Tabla 4).

Características Clínicas de los Casos Mono infectados.

La gastroenteritis aguda (GEA) se presentó en el 76.9% (30/39) de los casos mono infectados con *Cryptosporidium* spp., siendo el síntoma más frecuente seguido de fiebre con el 33.3% (13/39), desnutrición con el 28.21% (11/39), deshidratación 17.95% (7/39) y el 7.7% (3/39) presentó dolor abdominal sin diarrea (Tabla 4).

Los once casos con desnutrición estaban acompañados de GEA, de los cuales, el 63.6% (7/11) son niñas; tres de ellas presentaban desnutrición severa; seis eran menores de 1 año de edad y una de 3 años. De los cuatro niños con desnutrición, dos presentaron desnutrición severa (de 1 y 9 años de edad), uno desnutrición moderada (1 año de edad) y uno desnutrición leve (2 años de edad).

El 84.6 % (11/13) de los casos que presentaron fiebre eran menores de dos años de edad, y de ellos, el 76.9% (10/13) presentaban GEA. De los trece casos con fiebre solo tres presentaban otro tipo de infecciones como conjuntivitis y neumonía, otitis aguda e infección de vías urinarias respectivamente.

Tabla 4. Características clínicas de niños con criptosporidiosis y coinfección con otros parásitos.

ESPECIE	EDAD	GÉNERO	MANIFESTACIONES CLÍNICAS	COINFECCIÓN <i>Blastocystis</i> spp.		COINFECCIÓN <i>Entamoeba histolytica</i>	
				Lugol / PCR	Lugol / PCR	Lugol / PCR	Lugol / PCR
<i>C. hominis</i>							
S14	5 M	F	GEA, DL	-	-	-	-
S37	5 M	F	GEA, DS, F, CJ, NE	-	-	-	-
S3	9 M	M	GEA, DH	-	-	-	-
S4	9 M	F	GEA DL, DH, NE	-	-	-	-
S29	9 M	F	GEA	-	-	-	-
S2	1 A	M	DM, GEA, NE, EGP	-	-	-	-
S17	1 A	M	GEA	-	-	-	-
S30	1 A	M	GEA, DS	-	-	-	-
S31	1 A	F	GEA, DL	-	-	-	-
S32	1 A	M	GEA	-	-	-	-
S46	1 A	F	GEA, DL	-	-	-	-
S20	2 A	F	SD	-	-	-	-
S24	2 A	M	GEA	-	-	-	-
S15	3 A	F	GEA, DS	-	-	-	-
S18	3 A	M	GEA	-	-	-	-
S19	4 A	F	GEA	-	-	-	-
<i>C. parvum</i>							
S10	1 A	F	DC, GEA	-	-	-	-
S41	1 A	F	GEA	-	-	-	-
S42	1 A	F	GEA	-	-	-	-
S16	2 A	M	OA	-	-	-	-
S40	2 A	F	GEA	-	-	-	-
S44	2 A	M	DS	-	-	-	-
S47	2 A	M	AF, EII	+	-	+	-
S9	3 A	F	GEA	-	-	-	-
S13	3 A	M	GEA, DH	-	-	-	-
S23	3 A	F	GEA	-	-	-	-
S38	3 A	M	SD	-	-	-	-

S8	4 A	F	GEA	-	-	-	-
S11	4 A	M	GEA	-	-	-	-
S26	5 A	F	GEA	-	-	-	-
S27	5 A	M	GEA	-	-	-	-
S12	6 A	M	DS, GEA, VIH, HV, CO	-	+	-	-
S45	6 A	M	SD	-	-	-	-
S21	7 A	F	SD	-	+	-	-
S33	7 A	M	FL, DA, N	-	+	-	-
S43	8 A	F	IVU	-	-	-	-
S1	9 A	M	VIH, GEA, S, DS, CO	-	-	-	-
C. canis							
S39	1 A	M	SD	-	-	-	-
S22	2 A	M	DL	-	-	+	-
S25	2 A	M	DA, F	-	-	-	-
Sin Caracterización Molecular							
S48	4	F	DA, FL	-	-	-	-
S49	1	M	GEA	-	-	-	-

A, años; M, meses; GEA, gastroenteritis aguda; DS, desnutrición severa; DL, desnutrición leve; DM, desnutrición moderada; SD, sin diagnóstico; EII, enfermedad Inflamatoria Intestinal; AF, Anemia ferropénica; F, fiebre; FL, flatulencias; CJ, conjuntivitis; NE, neumonía; DH, deshidratación; EGP, enfermedad granulomatosa pulmonar; OA, otitis aguda; VIH, virus de inmunodeficiencia humana; HV, herpes virus; CO, candidiasis oral; DA, dolor abdominal; N, náuseas; IVU, infección en las vías urinarias; S, sepsis.

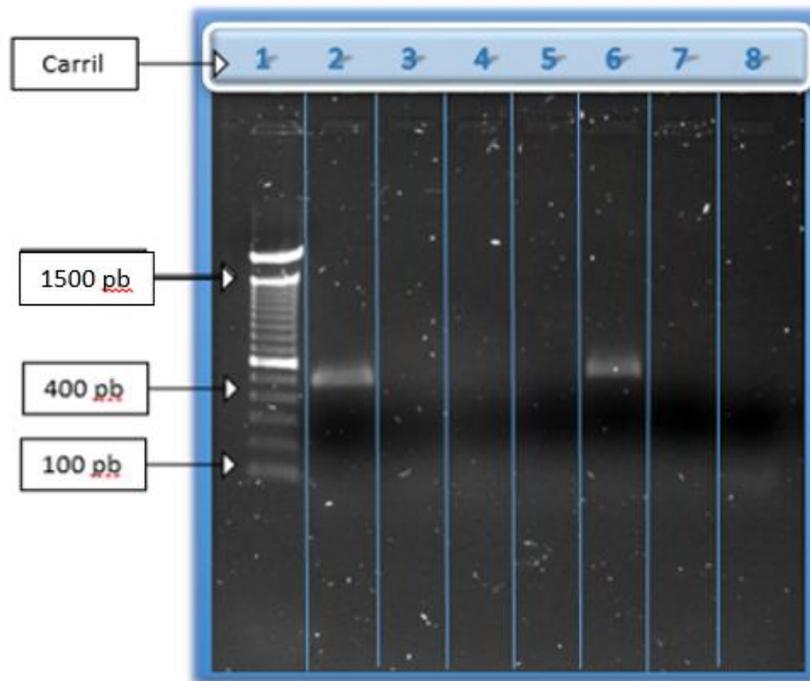


Figura 8. Imagen representativa de una electroforesis de la amplificación de una región polimórfica del gen SSU rDNA de *Blastocystis* spp. Carril 1: marcador de pares de bases TrackIt™ 100 bp ADN Ladder (invitrogen; EUA); carril 2: control positivo; carril 3: muestra S30; carril 4: muestra S31; carril 5: muestra S32; carril 6: muestra S33; carril 7: muestra S37; carril 8: control negativo.

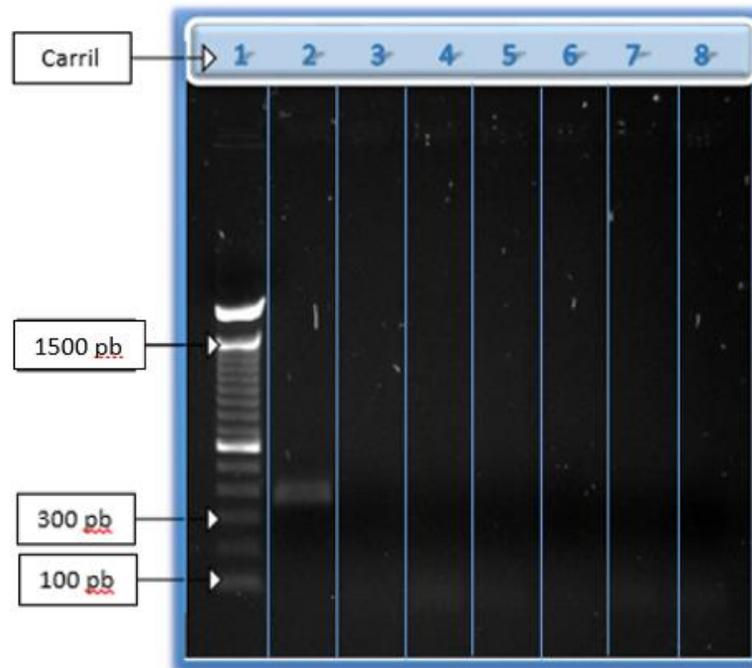


Figura 9. Imagen representativa de una electroforesis de la amplificación de la región intergénica SQ de *Entamoeba histolytica*. Carril 1: marcador de pares de bases TrackIt™ 100 bp ADN Ladder (Invitrogen; EUA); carril 2: control positivo; carril 3: muestra S25; carril 4: muestra S26; carril 5: muestra S27; carril 6: muestra S29; carril 7: muestra S30; carril 8: control negativo.

DISCUSIÓN

Comparando los resultados del diagnóstico etiológico de parásitos intestinales realizado anteriormente por observación directa con lugol y en el presente trabajo por biología molecular (PCR), respecto a los casos de *Blastocystis* spp., la discrepancia observada entre los resultados de ambos métodos puede deberse a la baja sensibilidad de la microscopía óptica. En el caso de *E. histolytica* se sabe que es morfológicamente indistinguible a *E. dispar*, y ya que al utilizar PCR para la identificación de *E. histolytica* se encontró un resultado negativo, podría indicar que lo que se identificó en dos casos anteriormente en la observación con lugol fuera *E. dispar*.

En la mayoría de los reportes de criptosporidiosis mencionan que solo en algunos casos los pacientes presentan fiebre atribuida a *Cryptosporidium* spp.; a pesar del alto porcentaje de los casos con fiebre y mono infectados del presente estudio (76.9%), no podemos considerar a *Cryptosporidium* spp. el causante de la misma, ya que es importante mencionar que dentro de las limitantes del estudio es que no se determinó la presencia de virus (rotavirus), los cuales son mayormente asociados a fiebre.

Ninguno de los casos de criptosporidiosis incluidos en este estudio resultaron coinfectados con *E. histolytica*, a pesar de que sabemos que las lectinas de ambos parásitos comparten afinidad por Gal/NAcGAL y que estamos en una zona endémica de amebiasis; sin embargo, debido a que solo se analizaron los pacientes en un momento dado (con criptosporidiosis) no podemos afirmar que estos pacientes tuvieron o vayan a tener amebiasis. La respuesta inmune que se monta hacia los parásitos intestinales depende del estado nutricional, factores genéticos, así como frecuencia de reinfección.

En el presente trabajo, identificamos coinfección en tres casos con *Blastocystis* spp. y *Cryptosporidium* spp.; sin embargo, no se logró realizar un análisis de resultados para determinar el impacto en el deterioro en la salud de los pacientes debido a la variabilidad del cuadro clínico en los tres casos. Aunque el papel como patógeno de *Blastocystis* spp., sigue siendo controversial, el impacto que se observa en los casos mono infectados con *Cryptosporidium* spp. es de importancia crítica, y pasó a segundo término la coinfección con *Blastocystis* spp.

De la revisión bibliográfica llevada a cabo para el marco teórico para este estudio, se encontraron escasos reportes del impacto de coinfección por protozoarios intestinales; la mayoría de los reportes discuten el impacto de la coinfección de los protozoarios y virus. En este estudio podemos notar que, aunque la coinfección entre estos protozoarios no fue frecuente, su análisis es imprescindible para determinar si las manifestaciones clínicas fueron propiamente causadas por *Cryptosporidium* spp.

En reportes publicados recientemente sobre coinfección de parásitos intestinales en pacientes con leishmaniasis visceral se determinó que estos no afectan ni la severidad clínica ni el resultado al tratamiento (Tajebe y col., 2017); así mismo en otro reporte no encontraron asociación estadísticamente significativa entre los casos coinfectados con *Blastocystis* spp. y parásitos intestinales con los síntomas, edad, género y características sociodemográficas (Ramírez y col., 2017).

Independientemente de que no se encontró un alto porcentaje de coinfección de *Blastocystis* spp. y *E. histolytica* en los casos de criptosporidiosis, esto impidió determinar la asociación de coinfección con la severidad de los síntomas y se notó que la monoinfección con *Cryptosporidium* spp. es suficiente para atender en tiempo y forma los casos que se identifican, ya que, si estos no se atienden pueden afectar impactantemente el desarrollo sobre todo en niños.

CONCLUSIONES

- Las manifestaciones clínicas presentadas en los cuarenta y dos pacientes son propias de la infección con *Cryptosporidium* spp. y los tres casos en los que se logró determinar coinfección con *Blastocystis* spp., no se pudo analizar si dicha coinfección fue determinante para que los signos y síntomas de los mismos fueran de mayor consideración.
- Se descartó la coinfección de *Entamoeba histolytica* y *Cryptosporidium* spp., a pesar de que estos parásitos comparten la misma afinidad de sus lectinas (Gal/NAcGAI); por lo que no pudimos determinar si la coinfección de estos dos protozoarios reconocidos por su virulencia, genera mayor problema de salud en los pacientes.
- Es importante determinar el o los agentes etiológicos en casos de gastroenteritis aguda, para poder brindar un tratamiento adecuado a los pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, S., Widerström, M., Lindh, J., y Lilja, M. 2017. Symptoms and risk factors of *Cryptosporidium hominis* infection in children: data from a large waterborne outbreak in Sweden. *Parasitol Res.* doi:10.1007/s00436-017-5558-z
- Ajjampur, S. S., Png, C. W., Chia W. N., Zhang, Y., y Tan, K. S. 2016. Ex vivo and in vivo mice models to study *Blastocystis* spp. Adhesion, colonization and pathology: Closer to proving Koch's postulates. *PLoS One*, 11(8), e0160458. doi:10.1371/journal.pone.0160458
- Ali, I. K., Haque, R., Alam, F., Kabir, M., Siddique, A., y Petri, W. A. 2012. Evidence for a link between locus R-R sequence type and outcome of infection with *Entamoeba histolytica*. *Clin Microbiol Infect.* 18(7), E235-237. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03826.x
- Barni, G. C., Forte, G. C., Forgiarini, L. F., Abrahão, C. L. O., y Dalcin, P. T. R. 2017. Factors associated with malnutrition in adolescent and adult patients with cystic fibrosis. *J Bras Pneumol*, 0. doi:10.1590/S1806-37562016000000319
- Becerril M. A. 2011. *Parasitología médica*. 3 ed. México, D.F. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES S.A. de C.V.
- Berkman, D. S., Lescano, A. G., Gilman, R. H., Lopez, S. L., y Black, M. M. 2002. Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet*, 359(9306), 564-571. doi:10.1016/S0140-6736(02)07744-9
- Bhat, N., Joe, A., PereiraPerrin, M., y Ward, H. D. 2007. *Cryptosporidium* p30, a galactose/N-acetylgalactosamine-specific lectin, mediates infection in vitro. *J Biol Chem*, 282(48), 34877-34887. doi:10.1074/jbc.M706950200
- Black, R. E., Allen, L. H., Bhutta, Z. A., Caulfield, L. E., de Onis, M., Ezzati, M., . . . Group, M. a. C. U. S. 2008. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet*, 371(9608), 243-260. doi:10.1016/S0140-6736(07)61690-0
- Boughattas, S., Behnke, J. M., Al-Ansari, K., Sharma, A., Abu-Alainin, W., Al-Thani, A., y Abu-Madi, M. A. 2017. Molecular Analysis of the Enteric Protozoa Associated with Acute Diarrhea in Hospitalized Children. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 343. doi:10.3389/fcimb.2017.00343
- Caulfield, L. E., de Onis, M., Blössner, M., y Black, R. E. 2004. Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria, and measles. *Am J Clin Nutr*, 80(1), 193-198.

- CDC Centro de Control de Enfermedades. 2016. Criptosporidiosis, presentación clínica. Estados Unidos 2016 disponible en <https://www.cdc.gov/dpdx/cryptosporidiosis/index.html>. (Fecha de acceso 2017).
- Chadee, K., Petri, W. A., Innes, D. J., y Ravdin, J. I. 1987. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest*, 80(5), 1245-1254. doi:10.1172/JCI113199
- Checkley, W., Epstein, L. D., Gilman, R. H., Black, R. E., Cabrera, L., y Sterling, C. R. 1998. Effects of *Cryptosporidium parvum* infection in Peruvian children: growth faltering and subsequent catch-up growth. *Am J Epidemiol*, 148(5), 497-506.
- Cobo, E. R., Kisson-Singh, V., Moreau, F., Holani, R., y Chadee, K. 2017. MUC2 Mucin and Butyrate Contribute to the Synthesis of the Antimicrobial Peptide Cathelicidin in Response to *Entamoeba histolytica*- and Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis. *Infect Immun*, 85(3). doi:10.1128/IAI.00905-16
- Collaborators, G. M. a. C. o. D. 2016. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388(10053), 1459-1544. doi:10.1016/S0140-6736(16)31012-1
- Del Coco, V. F., Córdoba, M. A., y Basualdo, J. A. (2009). [Cryptosporidiosis: an emerging zoonosis]. *Rev Argent Microbiol*, 41(3), 185-196.
- Denoeud, F., Roussel, M., Noel, B., Wawrzyniak, I., Da Silva, C., Diogon, M., . . . El Alaoui, H. (2011). Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biol*, 12(3), R29. doi:10.1186/gb-2011-12-3-r29
- Edwinson, A., Widmer, G., y McEvoy, J. 2016. Glycoproteins and Gal-GalNAc cause *Cryptosporidium* to switch from an invasive sporozoite to a replicative trophozoite. *Int J Parasitol*, 46(1), 67-74. doi:10.1016/j.ijpara.2015.09.001
- El Safadi, D., Cian, A., Nourrisson, C., Pereira, B., Morelle, C., Bastien, P., . . . Viscogliosi, E. 2016. Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* spp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infect Dis*, 16(1), 451. doi:10.1186/s12879-016-1776-8
- Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol*, 126(1-2), 37-56. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.004
- Fregonesi, B. M., Suzuki, M. N., Machado, C. S., Tonani, K. A., Fernandes, A. P., Monroe, A. A., . . . Segura-Muñoz, S. 2015. Emergent and re-emergent parasites in HIV-infected children: immunological and socio-environmental conditions that are involved in the transmission of

- Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. Rev Soc Bras Med Trop, 48(6), 753-758. doi:10.1590/0037-8682-0119-2015
- González-Díaz, M., Urrea-Quezada, A., Villegas-Gómez, I., Durazo, M., Garibay-Escobar, A., Hernández, J., . . . Valenzuela, O. 2016. *Cryptosporidium canis* in Two Mexican Toddlers. Pediatr Infect Dis J, 35(11), 1265-1266. doi:10.1097/INF.0000000000001287
- Haider, S. S., Baqai, R., Qureshi, F. M., y Boorom, K. 2012. *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., and *Entamoeba histolytica* exhibit similar symptomatic and epidemiological patterns in healthcare-seeking patients in Karachi. Parasitol Res, 111(3), 1357-1368. doi:10.1007/s00436-012-2972-0
- Hameed, D. M., Hassanin, O. M., y Zuel-Fakkar, N. M. 2011. Association of *Blastocystis hominis* genetic subtypes with urticaria. Parasitol Res, 108(3), 553-560. doi:10.1007/s00436-010-2097-2
- Ibrahim, M. K., Barnes, J. L., Osorio, E. Y., Anstead, G. M., Jimenez, F., Osterholzer, J. J., . . . Melby, P. C. 2014. Deficiency of lymph node-resident dendritic cells (DCs) and dysregulation of DC chemoattractants in a malnourished mouse model of *Leishmania donovani* infection. Infect Immun, 82(8), 3098-3112. doi:10.1128/IAI.01778-14
- Kato, K., Yahata, K., Gopal Dhoubhadel, B., Fujii, Y., y Tachibana, H. 2015. Novel hemagglutinating, hemolytic and cytotoxic activities of the intermediate subunit of *Entamoeba histolytica* lectin. Sci Rep, 5, 13901. doi:10.1038/srep13901
- Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L., y Gordon, J. I. 2011. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. Nature, 474(7351), 327-336. doi:10.1038/nature10213
- Kiani, H., Haghighi, A., Rostami, A., Azargashb, E., Tabaei, S. J., Solgi, A., y Zebardast, N. 2016. Prevalence, risk factors and symptoms associated to intestinal parasite infections among patients with gastrointestinal disorders in NAhavand, Western Iran. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 58, 42. doi:10.1590/S1678-9946201658042
- Kissoon-Singh, V., Moreau, F., Trusevych, E., y Chadee, K. 2013. *Entamoeba histolytica* exacerbates epithelial tight junction permeability and proinflammatory responses in Muc2(-/-) mice. Am J Pathol, 182(3), 852-865. doi:10.1016/j.ajpath.2012.11.035
- Laubach, H. E., Bentley, C. Z., Ginter, E. L., Spalter, J. S., y Jensen, L. A. 2004. A study of risk factors associated with the prevalence of *Cryptosporidium* in villages around Lake Atitlan, Guatemala. Braz J Infect Dis, 8(4), 319-323. doi:/S1413-86702004000400008
- Lidell, M. E., Moncada, D. M., Chadee, K., y Hansson, G. C. 2006. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective

- colonic mucus gel. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(24), 9298-9303. doi:10.1073/pnas.0600623103
- Mac Kenzie, W. R., Hoxie, N. J., Proctor, M. E., Gradus, M. S., Blair, K. A., Peterson, D. E., . . . Rose, J. B. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. N Engl J Med, 331(3), 161-167. doi:10.1056/NEJM199407213310304
- Méndez Editores, S.A de C.V. 2000. Parasitología Médica. 6 ed. Ed. Méndez Editores, S.A de C.V. México D.F.
- Mohaghegh, M. A., Hejazi, S. H., Ghomashlooyan, M., Kalani, H., Mirzaei, F., y Azami, M. 2017. Prevalence and clinical features of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients. Gastroenterol Hepatol Bed Bench, 10(2), 137-142.
- Mohamed, R. T., El-Bali, M. A., Mohamed, A. A., Abdel-Fatah, M. A., El-Malky, M. A., Mowafy, N. M., . . . Al-Harhi, S. A. 2017. Subtyping of *Blastocystis* spp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Makkah, Saudi Arabia. Parasit Vectors, 10(1), 174. doi:10.1186/s13071-017-2114-8
- Mosier, D. A., y Oberst, R. D. 2000. Criptosporidiosis. A global challenge. Ann N Y Acad Sci, 916, 102-111.
- Muthusamy, D., Rao, S. S., Ramani, S., Monica, B., Banerjee, I., Abraham, O. C., . . . Kang, G. 2006. Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* spp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. J Clin Microbiol, 44(2), 632-634. doi:10.1128/JCM.44.2.632-634.2006
- Ngui, R., Ishak, S., Chuen, C. S., Mahmud, R., y Lim, Y. A. 2011. Prevalence and risk factors of intestinal parasitism in rural and remote West Malaysia. PLoS Negl Trop Dis, 5(3), e974. doi:10.1371/journal.pntd.0000974
- Nithyamathi, K., Chandramathi, S., y Kumar, S. 2016. Predominance of *Blastocystis* spp. Infection among School Children in Peninsular Malaysia. PLoS One, 11(2), e0136709. doi:10.1371/journal.pone.0136709
- Osman, M., El Safadi, D., Cian, A., Benamrouz, S., Nourrisson, C., Poirier, P., . . . Certad, G. 2016. Prevalence and Risk Factors for Intestinal Protozoan Infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among Schoolchildren in Tripoli, Lebanon. PLoS Negl Trop Dis, 10(3), e0004496. doi:10.1371/journal.pntd.0004496
- Qian, B., Shen, S., Zhang, J., y Jing, P. 2017. Effects of Vitamin B6 Deficiency on the Composition and Functional Potential of T Cell Populations. J Immunol Res, 2017, 2197975. doi:10.1155/2017/2197975

- Rajoo, Y., Ambu, S., Lim, Y. A., Rajoo, K., Tey, S. C., Lu, C. W., y Ngui, R. 2017. Neglected Intestinal Parasites, Malnutrition and Associated Key Factors: A Population Based Cross-Sectional Study among Indigenous Communities in Sarawak, Malaysia. *PLoS One*, 12(1), e0170174. doi:10.1371/journal.pone.0170174
- Ramos, F., Morán, P., González, E., García, G., Ramiro, M., Gómez, A., . . . Ximénez, C. 2005. High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. *Am J Trop Med Hyg*, 73(1), 87-91.
- Ramírez, J. D., Flórez, C., Olivera, M., Bernal, M. C., y Giraldo, J. C. 2017. *Blastocystis* subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia. *PLoS One*, 12(2), e0172586. doi:10.1371/journal.pone.0172586
- Ryan, U., Fayer, R., y Xiao, L. 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, 141(13), 1667-1685. doi:10.1017/S0031182014001085
- Råberg, L. 2014. How to live with the enemy: understanding tolerance to parasites. *PLoS Biol*, 12(11), e1001989. doi:10.1371/journal.pbio.1001989
- Santín, M., Gómez-Muñoz, M. T., Solano-Aguilar, G., y Fayer, R. 2011. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res*, 109(1), 205-212. doi:10.1007/s00436-010-2244-9
- Singh, R. S., Walia, A. K., y Kanwar, J. R. 2016. Protozoa lectins and their role in host-pathogen interactions. *Biotechnol Adv*, 34(5), 1018-1029. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.06.002
- Smith, H. V., Nichols, R. A., y Grimason, A. M. 2005. Cryptosporidium excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends Parasitol*, 21(3), 133-142. doi:10.1016/j.pt.2005.01.007
- Snelling, W. J., Xiao, L., Ortega-Pierres, G., Lowery, C. J., Moore, J. E., Rao, J. R., . . . Dooley, J. S. 2007. Cryptosporidiosis in developing countries. *J Infect Dev Ctries*, 1(3), 242-256.
- Stensvold, C. R., Suresh, G. K., Tan, K. S., Thompson, R. C., Traub, R. J., Viscogliosi, E., . . . Clark, C. G. 2007. Terminology for *Blastocystis* subtypes--a consensus. *Trends Parasitol*, 23(3), 93-96. doi:10.1016/j.pt.2007.01.004
- Stenzel, D. J., y Boreham, P. F. 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev*, 9(4), 563-584.
- Tajebe, F., Getahun, M., Adem, E., Hailu, A., Lemma, M., Fikre, H., . . . Kropf, P. 2017. Disease severity in patients with visceral leishmaniasis is not altered by co-infection with intestinal parasites. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(7), e0005727. doi:10.1371/journal.pntd.0005727

- Tan, K. S. 2008. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev*, 21(4), 639-665. doi:10.1128/CMR.00022-08
- Tanyuksel, M., y Petri, W. A. (2003). Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev*, 16(4), 713-729.
- Thompson, R. C., y Smith, A. 2011. Zoonotic enteric protozoa. *Vet Parasitol*, 182(1), 70-78. doi:10.1016/j.vetpar.2011.07.016
- Todd, B. 2017. Preventing Enteric Infections from Contact with Animals. *Am J Nurs*, 117(8), 64-66. doi:10.1097/01.NAJ.0000521979.51286.cd
- Urrea-Quezada, A., González-Díaz, M., Villegas-Gómez, I., Durazo, M., Hernández, J., Xiao, L., & Valenzuela, O. 2017. Clinical Manifestations of Criptosporidiosis and Identification of a New *Cryptosporidium* Subtype in Patients From Sonora, Mexico. *Pediatr Infect Dis J*. doi:10.1097/INF.0000000000001762
- Valenzuela, O., González-Díaz, M., Garibay-Escobar, A., Burgara-Estrella, A., Cano, M., Durazo, M., . . . Xiao, L. 2014. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in children from Mexico. *PLoS One*, 9(4), e96128. doi:10.1371/journal.pone.0096128
- Valenzuela, O., Morán, P., Gómez, A., Cordova, K., Corrales, N., Cardoza, J., . . . Ximénez, C. 2007. Epidemiology of amoebic liver abscess in Mexico: the case of Sonora. *Ann Trop Med Parasitol*, 101(6), 533-538. doi:10.1179/136485907X193851
- Valenzuela, O., Morán, P., Ramos, F., Cardoza, J. I., García, G., Valadez, A., . . . Ximénez, C. 2009. Two different chitinase genotypes in a patient with an amoebic liver abscess: a case report. *Am J Trop Med Hyg*, 80(1), 51-54.
- Villegas-Gómez, I., Martínez-Hernández, F., Urrea-Quezada, A., González-Díaz, M., Durazo, M., Hernández, J., . . . Valenzuela, O. 2016. Comparison of the genetic variability of *Blastocystis* subtypes between human carriers from two contrasting climatic regions of México. *Infect Genet Evol*, 44, 334-340. doi:10.1016/j.meegid.2016.07.036
- Wang, H., Jin, S., Lu, H., Mi, S., Shao, W., Zuo, X., . . . Qi, G. 2017. Expression of survivin, MUC2 and MUC5 in colorectal cancer and their association with clinicopathological characteristics. *Oncol Lett*, 14(1), 1011-1016. doi:10.3892/ol.2017.6218
- Wang, H., Kim, J. J., Denou, E., Gallagher, A., Thornton, D. J., Shajib, M. S., . . . Khan, W. I. 2015. New Role of Nod Proteins in Regulation of Intestinal Goblet Cell Response in the Context of Innate Host Defense in an Enteric Parasite Infection. *Infect Immun*, 84(1), 275-285. doi:10.1128/IAI.01187-15
- Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., y Upton, S. J. 2004. *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin Microbiol Rev*, 17(1), 72-97.

- Ximénez, C., Cerritos, R., Rojas, L., Dolabella, S., Morán, P., Shibayama, M., . . . Silva, E. F. 2010. Human amebiasis: breaking the paradigm? *Int J Environ Res Public Health*, 7(3), 1105-1120. doi:10.3390/ijerph7031105
- Zhang, S. X., Zhou, Y. M., Xu, W., Tian, L. G., Chen, J. X., Chen, S. H., . . . Zhou, X. N. 2016. Impact of co-infections with enteric pathogens on children suffering from acute diarrhea in southwest China. *Infect Dis Poverty*, 5(1), 64. doi:10.1186/s40249-016-0157-2

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de Extracción de ADN Utilizado en un Estudio Previo.

Protocolo ZR Fecal DNA MiniPrep™

Agregar 500 µL en 100 mL de beta-mercaptoetanol al ADN Fecal Binding Buffer.

1. Agregue 150 mg de muestra de heces a un ZR BashingBead Lysis Tube. Añadir 750 µL de Lysis Solution al tubo.
2. Colocar en vórtex ZR BashingBead™ Lysis Tube a la máxima velocidad por 5 minutos.
3. Centrifugar el ZR BashingBead™ Lysis Tube en una microcentrífuga a $\geq 10,000$ x g durante 1 minuto.
4. Transferir 400 µL del sobrenadante a un filtro de Zymo-Spin™ IV Spin Filter (tapón naranja) en un tubo de colección y centrifugar a 7,000 rpm (~ 7,000 x g) durante 1 minuto.
5. Añadir 1,200 µL de Fecal DNA Binding Buffer para el filtrado en el tubo de colección del paso 4.
6. Transferir de 800 µL de la mezcla del paso 5 a Zymo-Spin™ IIC Column en un tubo de colección y centrifugar a 10,000 x g durante 1 minuto.
7. Descartar el tubo de colección y repetir el paso 6.
8. Añadir 200 µL de DNA Pre-Wash Buffer al Zymo-Spin™ IIC Column en un nuevo tubo de colección y centrifugar a 10,000 x g durante 1 minuto.
9. Añadir 500 µL de Fecal DNA Wash Buffer al Zymo-Spin™ IIC Column y centrifugar a 10,000 x g durante 1 minuto.
10. Transferir el Zymo-Spin™ IIC Column a un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio y añadir 100 µL DNA Elution Buffer directamente a la columna. Centrifugar a 10,000 x g durante 30 segundos para eluir el ADN.
11. Transferir el ADN eluido del paso 10 a Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter (centrifugar previamente a 8,000 x g por 3 minutos) (tapón verde) en un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio. Centrifugar exactamente a 8,000 x g durante 1 minuto.

**Anexo 2. Consentimiento Informado Presentado a los Tutores de los Pacientes
Participantes.**



UNIVERSIDAD DE SONORA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“Caracterización molecular e inmunológica de genotipos de *Cryptosporidium* spp.
en pacientes sintomáticos y asintomáticos”**

I. DATOS GENERALES.

1. NÚMERO DE FOLIO: _____

II. IDENTIFICACION.

2. NOMBRE DEL PACIENTE: _____

(Apellido paterno, materno y nombre)

3. EDAD: _____

4. SEXO: _____

5. LUGAR DE RESIDENCIA (COLONIA): _____

III. INDICE DE NIVEL SOCIOECONOMICO.

6. NÚMERO DE PERSONAS QUE HABITAN SU CASA: _____

7. NÚMERO DE CUARTOS EN LA VIVIENDA: _____

8. MATERIAL DE PISO DE LA VIVIENDA:

CON RECUBRIMIENTO (LOZETA, MOSAICO, MADERA): _____ CEMENTO: _____

TIERRA: _____

9. AGUA POTABLE:

ENTUBADA DENTRO: _____ ENTUBADA FUERA: _____ PIPA: _____ POZO: _____ OTROS:

10. ELIMINACION DE EXCRETAS:

EXCUSADO CON DRENAJE: _____ FOSA SEPTICA: _____ LETRINA: _____ OTROS:

11. ESCOLARIDAD: _____

12. CONTACTO CON ANIMALES:

DOMESTICOS: _____ PERROS _____ GATOS _____ AVES _____ ANIMALES DE
TRASPATIO _____ GRANJAS: _____ GALLINAS _____ CERDOS _____

13. SI LA RESPUESTA A LA PREGUNTA ANTERIOR ES AFIRMATIVA, ESPECIFIQUE
FRECUENCIA DE LIMPIEZA DE EXCRETAS: _____

14. PLAGAS EN LA VIVIENDA O COLONIA: _____ RATAS _____ CUCARACHAS
_____ MOSCAS _____ GARRAPATAS _____ GUINAS _____ CHINCH
ES _____ MOSQUITOS _____ GRILLOS _____ CORUCOS/GORGOJOS (HARINAS)
_____ OTROS (ESPECIFICAR) _____

15. LA VIVIENDA CUENTA CON MOSQUITERO: SI _____ NO _____

IV. HABITOS DE HIGIENE (MADRE O TUTOR).

16. SE LAVA LAS MANOS

a) ANTES DE COMER: SI _____ NO _____

b) ANTES DE PREPARAR LOS ALIMENTOS: SI _____ NO _____

c) DESPUES DE IR AL BAÑO: SI _____ NO _____

d) DESPUES DE ESTAR EN CONTACTO CON ANIMALES: SI _____ NO _____

17. PREPARA ALIMENTOS PARA CONSUMO FAMILIAR: SI _____ NO _____

18. CONSUME ALIMENTOS EN LA VIA PÚBLICA: SI _____ NO _____ EN OCASIONES

19. TOMA AGUA HERVIDA: SI _____ NO _____

V. ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS

20. ENFERMEDAD DIARREICA: SI _____ NO _____

21. SI LA RESPUESTA A LA PREGUNTA ANTERIOR ES AFIRMATIVA ESPECIFIQUE:

a) NUMERO DE EVENTOS POR AÑO: _____

b) FECHA DEL ULTIMO EPISODIO: _____

c) TIEMPO DE DURACIÓN _____

d) PRESENCIA DE MOCO Y SANGRE _____

e) COMPLICACIONES (HOSPITALIZACIÓN), _____

f) TRATAMIENTO. _____

VI. SITUACIÓN ACTUAL

22. PESO: _____

23. TALLA: _____

24. FECHA DE LA ÚLTIMA DESPARASITACIÓN: _____

25. TRATAMIENTO: _____ CULMINÖ SI _____ NO _____

26. CUADRO CLINICO ACTUAL DE PROBLEMAS GASTROINTESTINALES:

(Tiempo de duración, presencia de moco y sangre, complicaciones, hospitalización, tratamiento, dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza, náuseas, vómito, flatulencias).

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN PROYECTO

“Caracterización molecular e inmunológica de genotipos de *Cryptosporidium* spp. en pacientes sintomáticos y asintomáticos”

Responsable del Proyecto: Dra. Olivia Valenzuela Antelo

Sede donde se realizará el estudio: Universidad de Sonora, Departamento de Ciencias Químico Biológicas

Nombre del padre o tutor (fecha):

Se le invita a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted y su hijo/a, hábitos y antecedentes médicos, y sus respuestas serán incluidas en una base de datos para su análisis. Una vez que acepte participar se le pedirá que nos done 3 muestras de heces y una muestra de suero de su hijo/a. Todos los procedimientos diagnósticos serán por parte de la Universidad de Sonora y Usted será informado de los resultados obtenidos.

RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Este estudio está considerado como de bajo riesgo de acuerdo a la Ley General de Salud ya que sólo implica la recolección de muestras de heces y suero, **TOTALMENTE VOLUNTARIO**.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
 - No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
 - Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando el Investigador responsable no se lo solicite, informando las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
 - No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
 - No recibirá pago por su participación.
 - En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo al Investigador responsable.
 - La información obtenida en este estudio, puede ser publicada en revistas científicas de impacto nacional o internacional; sin embargo, la identidad de los participantes en el estudio, será mantenida con estricta confidencialidad.
- ES IMPORTANTE INFORMARLE QUE LA **SECRETARÍA DE SALUD DEL ESTADO** ESTÁ INFORMADA DEL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar esta Carta de Consentimiento Informado.

Dudas y/o aclaraciones:

Dra. Olivia Valenzuela Antelo. Email: valenzuela.o@gmail.com.

Teléfono: 2592163-2592164.