



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN
ISOTÉRMICA BASADA EN HORQUILLAS (LAMP) PARA EL
DIAGNÓSTICO DE *Blastocystis* EN NIÑOS DEL HOSPITAL
INFANTIL DE MORELIA**

TESIS

PRESENTA:

GUILLERMO GUTIERRÉZ TAPIA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DIRECTORES DE TESIS:

Q.F.B. GUADALUPE ERÉNDIRA OROZCO MOSQUEDA

D.C. JOSÉ PABLO MARAVILLA CAMPILLO

MORELIA, MICHOACÁN, FEBRERO 2018

AGRADECIMIENTOS

Toda persona debe mirar a lo largo de su vida en 5 direcciones:

Adelante para saber hacia dónde se dirige.

Detrás, para recordar de dónde viene.

Debajo, para no pisar a nadie.

A los costados, para ver quién te acompaña en todo momento.

Arriba, para saber que siempre alguien te mira y cuida de ti.

Javier Joison

A Dios, por la vida que me ha otorgado hasta hoy, la salud para poder desarrollarme satisfactoriamente, y la grandiosa gente que me ha permitido conocer.

Gracias a mis padres por siempre apoyarme, creyendo que tomo las mejores decisiones para mi futuro y para una sociedad mejor, por creer siempre en mí, por la confianza que siempre han depositado en todo momento sobre mi vida y por siempre impulsarnos a seguir estudiando y vivir nuestros sueños.

A mis hermanos, que sabemos que tenemos que ser modelos a seguir los unos de los otros, y para nuestros descendientes. Por soportar mi carácter, cualidades y defectos durante todo este tiempo.

A mis amigos, que siempre me han escuchado, aconsejado y apoyado. Gracias por estar siempre cuando los he necesitado.

A mi asesora de tesis, Química Ere muchas gracias por esta grandiosa oportunidad, por su gran compromiso, interés y dedicación a este trabajo. Por sumergirme en este maravilloso e inmenso mundo de la parasitología. Por compartir grandes experiencias y conocimientos a todos los que hemos sido sus estudiantes.

A todas las escuelas, facultades e institutos que me han formado y hoy se refleja en este trabajo. A la facultad de Químico Farmacobiología por enseñarme para lo que sé tengo vocación. A otro gran templo del saber, el Hospital Infantil de Morelia, en especial al Laboratorio de Investigación de Microbiología y Parasitología por permitirme ser su pasante, a las grandes químicas que día a día me enseñaron todo sobre sus áreas de trabajo, siempre les estaré agradecido por todo, además de siempre sentir gran orgullo y admiración del excelente equipo de trabajo que allí se aloja.

Al D.C. Pablo Maravilla, por permitirme incorporar a su grupo de investigación en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, por la oportunidad de realizar este trabajo y que aún no hemos finalizado. Gracias a todos por los conocimientos, consejos y experiencias compartidos, en especial a la D.C. Mirza Romero, D.C. Fernando Martínez y al D.C. Williams Arony. A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Agentes Patógenos, Biología Molecular e Histocompatibilidad.

Al CONACYT por la aprobación del proyecto 168619, por la subvención proporcionada para la compra de reactivos, insumos y pagos de secuenciación de esta investigación.

A los profesores Frroglio y Zanet Stefania de la Università degli Studi di Torino, Italia. A la Dra. Esther Shiraho del Kenya Medical Research Institute (KEMRI) de Nairobi, Kenia. Al Dr. De-Guo Wang de la Xuchang University, China y al Dr. Kentaro Nagamine del Eiken Chemical Co. Ltd. de Japón por los consejos para la estandarización de LAMP.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	3
MARCO TEÓRICO.....	4
I. Historia y Taxonomía.....	4
II. Morfología	5
III. Ciclo de vida	6
IV. Patogenia.....	8
V. Diagnóstico	11
A. Amplificación Isotérmica Basada en Horquillas (LAMP)	13
a) Características:.....	13
b) Diseño de <i>primers</i>	13
c) Puntos principales para el diseño de <i>primers</i>	14
d) Principio básico.....	15
B. Técnicas para la evaluación de amplicones de LAMP	19
a) Turbidez Post-Reacción	19
b) Electroforesis en gel de agarosa	19
c) Uso de colorantes fluorescentes	20
C. Sensibilidad y especificidad de LAMP	21
VI. Tratamiento.....	21
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	23
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVOS	26
I. Objetivo general.....	26
II. Objetivos específicos.....	26
MATERIAL Y MÉTODOS	26
I. Universo de estudio	26
II. Tamaño de la muestra.....	27
III. Definición de las unidades de observación.....	27
IV. Criterios de inclusión	27
V. Criterios de exclusión	27

VI. Criterios de eliminación	27
VII. Definición de variables y su medición	27
VIII. Selección de las fuentes, métodos y técnicas de recolección de la información.....	28
IX. Plan de procesamiento y presentación de la información	28
X. Prueba piloto	28
XI. Aspectos éticos.....	28
XII. Prevención de riesgos para el personal.....	29
ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	29
I. Recursos humanos.....	29
II. Recursos Financieros.....	29
RESULTADOS.....	30
I. Análisis estadístico	30
II. Diagnóstico por microscopía de luz	35
III. Confirmación del diagnóstico de <i>Blastocystis</i> por PCR en punto final.....	36
IV. Estandarización del método de Amplificación Isotérmica Basada en Horquillas (LAMP) para el diagnóstico de <i>Blastocystis</i>	42
DISCUSIÓN.....	63
CONCLUSIÓN.....	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS.....	71
I. Anexo 1 INDICACIONES DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	71
II. Anexo 2 EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO EN FRESCO	71
III. Anexo 3 TÉCNICA DE CONCENTRACIÓN POR SEDIMENTACIÓN MÉTODO DE RITCHIE O FORMOL-ÉTER.....	72
IV. Anexo 4 TÉCNICA DE CONCENTRACIÓN POR FLOTACIÓN MÉTODO DE SHEATHER O SACAROSA (FLOTACIÓN)	74
V. Anexo 5 MEDICIÓN MICROSCÓPICA DE PARÁSITOS.....	75
VI. Anexo 6 HOJA DE CONSENTIMIENTO	77
VII. Anexo 7 ENCUESTA.....	78
VIII. Anexo 8 EXTRACCIÓN DE DNA.....	79
IX. Anexo 9 PCR PUNTO FINAL	80

RESUMEN

Antecedentes: Con una distribución cosmopolita, *Blastocystis* es usualmente el parásito intestinal mayormente aislado en exámenes parasitológicos y está presente en un número diferente de especies. Se estima su colonización entre 1 y 2 billones de personas a nivel mundial, documentándose al menos 17 subtipos genéticos (STs) con base en la unidad 18S del RNA ribosomal, de los cuales del ST1 al ST9 se pueden encontrar en humanos. La forma más común de transmisión es la fecal-oral. Entre los síntomas más frecuentemente descritos están diarrea, dolor abdominal, flatulencia, vómito, estreñimiento, fatiga, náuseas, tenesmo, fiebre y distensión abdominal. La microscopía de luz es el método de diagnóstico empleado en la mayoría de los laboratorios clínicos, sin embargo, ha demostrado tener la más baja sensibilidad para la detección del parásito (48%), siendo los métodos moleculares, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, de las técnicas más sensibles. Recientemente se describió la Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP por sus siglas en inglés de *Loop Mediated Isothermal Amplification*), la cual se ha usado exitosamente para el diagnóstico de diversos patógenos; sin embargo, aún no se ha ensayado para el diagnóstico de *Blastocystis*.

Objetivo: Estandarizar la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas (LAMP) para el diagnóstico molecular de *Blastocystis* en muestras de niños procedentes del Hospital Infantil de Morelia.

Hipótesis: Es posible estandarizar la técnica de LAMP en un fragmento del gen de la subunidad pequeña del DNA ribosomal para el diagnóstico de *Blastocystis*.

Material y Métodos: Este fue un estudio de tipo descriptivo, experimental y prospectivo, se realizó en muestras de pacientes remitidos del servicio de Consulta Externa del Hospital Infantil de Morelia, las cuales se procesaron por exámenes coproparasitológicos en serie de tres por las técnicas de examen directo en fresco, de concentración por sedimentación (Método de Ritchie) y flotación por el método de Sheather. Se conformaron 4 grupos: a) muestras positivas exclusivamente con *Blastocystis*; b) muestras positivas con *Blastocystis* y con otros protozoarios o helmintos intestinales; c) muestras negativas a *Blastocystis* pero positivas a otros protozoarios y helmintos intestinales; d) muestras negativas a cualquier protozoario o helminto intestinal. Asimismo, se realizó la extracción del DNA de las muestras, analizándolas para confirmar la ausencia o presencia de *Blastocystis* por PCR en punto final, amplificando un fragmento del gen de la subunidad pequeña del DNA ribosomal (SSU rDNA), y en su caso, los STs se identificaron a través de la secuenciación de los amplicones, para posteriormente analizar las muestras con la nueva técnica diagnóstica de LAMP. Para la estandarización del método de LAMP se diseñaron 5 juegos de *primers*, 2 en el gen 18S y 3 en la región del espacio de transcripción interna (ITS).

Resultados: Para este estudio se analizaron 42 muestras, de las cuales el 45% (19) fue positivo y 55% (23) negativo a blastocistosis por microscopía de luz. Se confirmó el resultado por PCR en punto final, donde 45% (19) de las muestras mostraron un amplicón específico de *Blastocystis*, mientras que 55% (23) de las muestras fueron negativas. De las muestras positivas, el 36.8% corresponden al ST1, el 31.5% al ST2 y 31.5% para el ST3. A pesar de que se ensayaron diferentes protocolos y cinéticas de amplificación con el método LAMP, no se logró obtener una reproducibilidad confiable en los protocolos usados.

Conclusión: Esta es la primera vez, de nuestro conocimiento, que se ensaya el método de LAMP para el diagnóstico de *Blastocystis* y sus subtipos genéticos. Aunque se obtuvieron amplificaciones evidentes en los controles usados, inconsistencias en la reproducibilidad de los mismos sugieren que los marcadores de la SSU rDNA y de ITS no son adecuados para el diagnóstico de este microorganismo, probablemente debido a la naturaleza polimórfica del propio organismo y de las características innatas de los marcadores utilizados, tales como presentar diversas copias en tándem, así como un contenido bajo en la relación Guanina/Citosina. Por ello, es importante evaluar otros marcadores que puedan ser utilizados por la técnica de LAMP, y de esta manera proponer un diagnóstico sensible, específico y particularmente accesible en cualquier nivel de atención dentro de los Servicios de Salud.

Palabras clave: Parásito, *Blastocystis*, Diagnóstico Molecular, *Loop Mediated Isothermal Amplification*, Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas, LAMP.

ABSTRACT

Background: With a cosmopolitan distribution, *Blastocystis* is usually the intestinal parasite mostly isolated in parasitological tests and it is present in a different number of species. Its colonization is estimated between 1 and 2 billion people worldwide, documenting at least 17 genetic subtypes (ST) based on the 18S unit ribosomal RNA, which from ST1 to ST9 can be found in humans. The most common form of transmission is fecal-oral route. Among the most frequent symptoms are diarrhea, abdominal pain, flatulence, vomiting, constipation, fatigue, nausea, tenesmus, fever and abdominal distension. Light microscopy is the diagnostic method used in most clinical laboratories, however, it has had the lowest sensitivity for the detection of the parasite (48%), being the molecular methods, such as the reaction in the polymerase chain or PCR, the most sensitive techniques. The Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) has been described, which has been used successfully for the diagnosis of various pathogens; however, it has not yet been tested for the *Blastocystis* diagnosis.

Objective: To standardize the Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique for the *Blastocystis* molecular diagnosis in samples of children derived from the Children's Hospital in Morelia.

Hypothesis: It is possible to standardize the LAMP technique using a fragment of the gene on a small subunit of ribosomal DNA for the *Blastocystis* diagnosis.

Material and Methods: This was a descriptive, experimental and prospective study, was performed on samples of patients referred by the External Consultation Service of the Children's Hospital of Morelia, which were processed by coproparasitoscopic examinations in series of three by the techniques of direct examination in fresh, concentration by sedimentation (Ritchie method) and flotation by Sheather's method. Four groups were formed: a) positive samples exclusively with *Blastocystis*; b) positive samples with *Blastocystis* and with other protozoa or intestinal helminths; c) negative to *Blastocystis* but positive to other protozoa and intestinal helminths; d) negative samples to any protozoan or intestinal helminth. Likewise, the DNA extraction of the samples was performed, analyzing the absence or presence of *Blastocystis* by PCR, amplifying a fragment of the gene on the small subunit of the ribosomal DNA (SSU rDNA), and in its case, the STs were identified through the sequencing of the amplicons, to later analyze the samples with the new diagnostic technique LAMP. For the standardization of the LAMP method, 5 primers sets were designed, 2 in the 18S gene and 3 in the internal transcription space (ITS) region.

Results: For this study 42 samples were analyzed, 45% (19) was positive and 55% (23) negative to *Blastocystis* by light microscopy. The result was confirmed by PCR, where 45% (19) showed a specific *Blastocystis* amplicon, while 55% (23) were negative. Of the positive samples, 36.8% corresponds to ST1, 31.5% ST2 and 31.5% ST3. Although different protocols and amplification techniques were tested with the LAMP method, reliable reproduction of the articles used was not achieved.

Conclusion: This is the first time, to our knowledge, that the LAMP method for the *Blastocystis* diagnosis and its genetic subtypes. Although the tests are not suitable for the diagnosis of this microorganism, probably due to the polymorphic nature of the organism itself and the innate characteristics of the markers used, such as presenting copies in tandem, as well as a low content in the Guanine / Cytosine. Therefore, it is important that there are other data that can be used by the LAMP technique, and in this way, propose a sensitive diagnosis, and accessible in particular, at any level of care within the Health Services.

Keywords: Parasite, *Blastocystis*, Molecular Diagnosis, Loop Mediated Isothermal Amplification, Amplificación Isotérmica Mediada por Horquillas, LAMP.

ANTECEDENTES

La etimología de la palabra “parásito” proviene de las raíces griegas “para” (al lado) y “sitos” (alimento).¹ El parasitismo es una relación entre especies diferentes, una simbiosis, el resultado de un largo proceso filogenético. Los parásitos representan una historia de vida fascinante si se contempla su tremenda variabilidad de tamaño, localización, desarrollo en órganos diversos, con múltiples formas de reproducción.²

El impacto global de las enfermedades parasitarias en el mundo es muy importante ya que inciden de manera brutal sobre la salud, la esperanza de vida al nacimiento y la productividad de millones de personas. Su prevalencia está estrechamente vinculada a diferenciales climáticos, fenómenos demográficos y al desarrollo socioeconómico de las diferentes zonas del planeta. No es de extrañar que protozoos y helmintos patógenos sean parte de la vida cotidiana en los trópicos, aunque su presencia sea global.²

Debido a que las mayores incidencias de parasitosis convergen en las zonas mundiales con mayores desventajas socioeconómicas, su estudio, la implementación de medidas de prevención y de control, el desarrollo de fármacos y vacunas han representado poco interés para la sociedad civil, autoridades en salud y los gobiernos de los países.²

La vulnerabilidad social en salud expresa las desigualdades sociales de distintos grupos poblacionales, por lo que no corresponde a una condición natural ni predefinida. Los denominados “grupos vulnerables” no son vulnerables *per se*: son las condiciones sociales en que viven los indígenas, migrantes, mujeres, niños, ancianos, jóvenes y otros grupos, las que definen su condición de vulnerabilidad.³

Los parásitos intestinales afectan principalmente a niños y a personas de la tercera edad y son causados por inadecuados hábitos higiénicos. De todas las enfermedades gastrointestinales, en estos grupos de la población 80% se debe a dichos organismos.⁴

México, considerado país en desarrollo, sobrelleva una carga formidable por concepto de enfermedades parasitarias, aunada a desigualdades sociales y económicas que dificultan el control de las parasitosis y comprometen el éxito de los programas de salud.²

La importancia de las parasitosis intestinales en la población rural es particularmente enorme, con altas frecuencias de poliparasitismo en infecciones masivas. La falta de sanidad, educación, recursos económicos desiguales y la mala alimentación, combinadas con características ecológicas favorables para los parásitos, permiten que las enfermedades producidas por éstos sean comunes.²

Blastocystis es el parásito intestinal más frecuentemente encontrado en muestras fecales humanas, siendo este el más frecuente en países en desarrollo. Se estima su colonización entre 1 y 2 billones de personas a nivel mundial. En México, la información que se tiene sobre aspectos clínicos y epidemiológicos de la blastocistosis es escasa. Estudios coproparasitológicos en niños mexicanos residentes en zonas urbanas mostraron una prevalencia de 3-7%, mientras que un estudio de factores de riesgo realizado en comerciantes de alimentos de mercados establecidos en la delegación Xochimilco, Ciudad de México, mostró una prevalencia de 42% y una asociación estadística con el sexo masculino, con hábitos deficientes de higiene personal, antecedentes de haber alojado parásitos o de tener un familiar que hubiese estado parasitado. Tres estudios realizados en niños de comunidades rurales y suburbanas de

Guerrero mostraron frecuencias de 61-81%. Asimismo, estudios moleculares en nuestro país muestran que los subtipos 1 a 3 son los más frecuentes, así como la presencia de dos variantes genéticas del subtipo 1, lo que confiere a *Blastocystis* una gran importancia biológica, ya que fortalece la hipótesis sobre la existencia de variantes genéticas que son patógenas o comensales.^{5, 6}

MARCO TEÓRICO

I. Historia y Taxonomía

Las primeras observaciones del organismo se realizaron de forma independiente por Brittan y Swayne, mientras se estudiaba la epidemia del cólera en Londres en 1849. Se habían observado varios óvulos entonces desconocidos y quistes de parásitos, incluyendo a *Blastocystis*, y colectivamente etiquetados como cuerpos de cólera y se sugirió ser el agente causante del cólera.⁶ La primera descripción de la morfología que se realizó de este parásito, se cree que fue en el año de 1899, aunque los documentos no incluían ninguna imagen, se revelaron datos que hacen creer que se trataba de *Blastocystis*.⁷ Fue sólo en el año 1900 que el organismo se observó específicamente por Alexeieff y Emile Brumpt de forma independiente, quienes propusieron que eran levaduras saprofitas inofensivas del tracto intestinal. El nombre del género "*Blastocystis*" fue acuñado por Alexeieff mientras Brumpt proporcionó el nombre de la especie, "*hominis*." A lo largo de cinco décadas después, en 1967, se reclasificó el organismo como un protista basándose en sus propiedades morfológicas y fenotípicas tales como la presencia de uno o más núcleos, orgánulos celulares como las mitocondrias, aparato de Golgi y el retículo endoplásmico. Con la llegada de herramientas moleculares, la tarea de encontrar un hogar taxonómico para este organismo enigmático se llevó a cabo en el año 1996. Por el análisis molecular de la subunidad pequeña rRNA (SSU rDNA) y el factor de elongación 1 α . Se colocó el organismo bajo el phylum eucariota, Heterokontophyta.⁶

Esta situación taxonómica se consideró inicialmente controvertida por otros estudios, que demostraron la semejanza de *Blastocystis* de otros protistas, estudios posteriores utilizando múltiples datos de la secuencia molecular confirmaron que se trataba de un heterokontophyta, descartando la ambigüedad taxonómica. Hay más de 100 000 miembros en el phylum Heterokontophyta comúnmente llamado como Heterokonta o Stramenopiles que comprende a las algas, diatomeas, oomicetos y mohos del fango, mientras que *Blastocystis* forma el nuevo miembro de este grupo complejo de "Los protistas botánicos." Aunque esta clasificación parece satisfactoria, a nivel molecular hay una discrepancia en la morfología entre *Blastocystis* y otros Stramenopiles.⁶ El número de genes de *Blastocystis* (6,020) son reducidos en comparación con otros Stramenopiles.⁸ En general, Stramenopiles está rodeado de flagelos como mastigonemas, que es una característica ausente en *Blastocystis*. Por lo tanto, hay una propuesta de revisión de los cinco reinos y clasificar este organismo en un sexto reino separado llamado "Chromista". Anteriormente, el nombre de la especie se le dio basándose en el hospedero del que se aisló tal como *Blastocystis hominis* de los seres humanos.⁶

Posteriormente, *Blastocystis* se aisló de diversos hospederos y se observó la transmisión humano-animal. Estas observaciones justifican un cambio en los nombres específicos que provocó varios informes que tratan de clasificar las diferentes especies de *Blastocystis* en función de morfología. Se descubrió más tarde que la especificidad del hospedero y el

potencial patógeno de diferentes aislamientos se correlacionan con variaciones en la secuencia de la subunidad SSU rDNA. Sobre la base de estas variaciones, se clasificó al género en subtipos (STs), lo que ha permitido proponer que el género *Blastocystis* consiste de un complejo de especies crípticas.⁶

II. Morfología

Varios estudios de microscopía han permitido establecer que hay variaciones morfológicas en *Blastocystis*, siendo un parásito pleomórfico, entre las que se cuentan formas vacuolares, granulares, multivacuolares, avacuolares, ameboides y quísticas.^{6, 9, 10}

La forma vacuolar comprende una gran vacuola central que ocupa la mayor parte del espacio en la célula, lo que limita el citoplasma y otros componentes intracelulares en la periferia de la célula. Esta forma muestra amplias variaciones y sus dimensiones pueden ir desde 3 μm a 120 μm de diámetro. Las vacuolas son en realidad cuerpos unidos a la membrana contenidos desigualmente o distribuidos flocularmente, compuestos de un fino material granular compuesto de carbohidratos y lípidos (Figura 1-A).⁶

Las formas avacuolar y multivacuolar son pequeñas, midiendo de 5 a 8 μm en diámetro. La forma avacuolar carece de cuerpo central y cubierta celular, al pasar por el intestino y situarse en las células epiteliales se transforma en la forma multivacuolar. La forma multivacuolar posee múltiples vacuolas pequeñas de diferentes tamaños interconectadas una con otra en el citoplasma del parásito, además está rodeada de una gruesa capa celular y debajo de esta capa se forma la pared quística, aunque se cree que la capa se deshace y da origen a la forma quística (Figura 1-B,C).^{6, 7}

La forma granular se asemeja estructuralmente a la forma vacuolar excepto por la presencia de gránulos en el cuerpo central y en el citoplasma. Por medio de estudios de microscopía electrónica se ha identificado tres tipos de gránulos, nombrándolos como metabólicos, reproductores y gránulos lipídicos. Los gránulos reproductores se llegan a observar en el cuerpo central y se les atribuye un papel en la esquizogonia (Figura 1-D).⁶

La forma ameboide se observa frecuentemente menos que las formas vacuolares y granulares. Es de forma irregular y generalmente mide alrededor de 10 μm . Un rasgo característico de esta forma es la posesión de uno o dos pseudópodos, además de no poseer motilidad. El citoplasma puede contener una única vacuola grande como cuerpo central o bien múltiples pequeñas vacuolas. Se ha propuesto que el cuerpo central adquiere un forma ameboide intermediaria antes de la conversión a quiste, durante la cual se alimenta de bacterias para obtener los nutrientes para el enquistamiento.⁶ En un estudio realizado se pudo definir dos tipos de formas ameboides, las cuales sólo fueron encontradas en los pacientes sintomáticos, éstas formas eran irregulares y polimórficas con pseudópodos, pero se diferenciaban entre sí por el tamaño y ubicación de sus vacuolas, el primero presentaba una gran vacuola central llena de gránulos pequeños electrodensos y con actividad a nivel de los ácidos nucleicos y el segundo reveló múltiples vacuolas dentro de un cuerpo central, con un citoplasma que contenía filamentos de gránulos electrodensos que se asemejaban al retículo endoplásmico rugoso, lo que les permitió sugerir que presentaba una activa síntesis de proteínas. La superficie de la forma ameboide que rodeaba el parásito mostró un grosor desigual. Lo anterior permitió a los investigadores concluir que la forma ameboide podría ser un indicador de la patogenicidad de *Blastocystis* o contribuir a la patogenicidad y ser la responsable de los síntomas que adquieren los pacientes (Figura 1-E).^{6, 7}

La forma de quiste es esférica u ovoide y más pequeña que la forma granular y vacuolar. Los quistes que se han observado en humanos miden usualmente 10 μm de diámetro, pero no superando las 36 μm , mientras que los quistes de mayor tamaño se han aislado de animales. La característica de esta forma es la presencia de una gruesa pared de varias capas. El citoplasma se observa condensado, conteniendo variable número de mitocondrias y pequeñas vacuolas compuestas de lípidos o glucógeno (Figura 1-F).⁶

También se ha podido establecer que *Blastocystis* presenta diversas formas de replicación, observadas principalmente en medios de cultivo, como son fisión binaria, plasmotomia, esquizogonia o fisión múltiple, endodiogenia y endopoligenia, siendo la fisión binaria la más frecuente de todas y observable en materia fecal (Figura 1-G,H).⁹

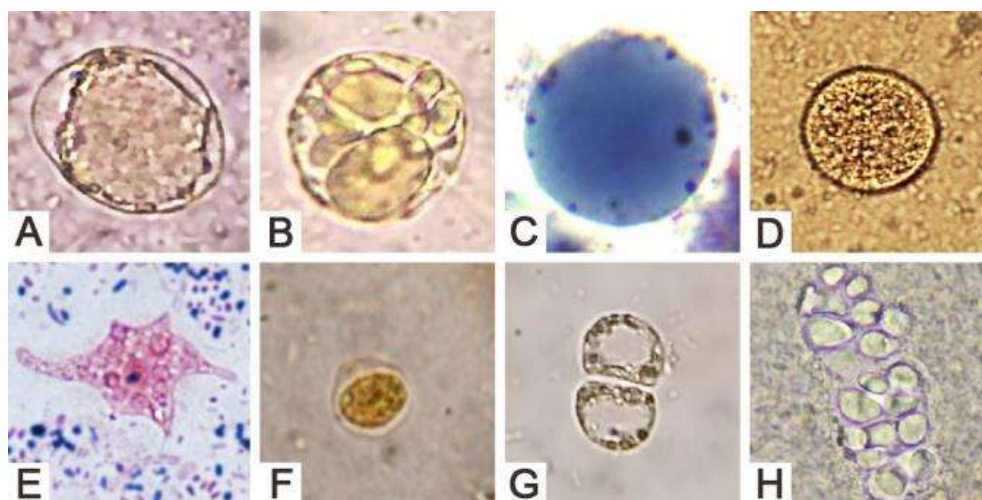


Figura 1. Formas morfológicas de *Blastocystis* A) Vacuolar, B) Multivacuolar, C) Avacuolar, D) Granular, E) Ameboide, F) Quiste. Formas de replicación de *Blastocystis* G) Fisión Binaria H) Esquizogonia. Tomadas de: A, B, C, F, G, H Laboratorio de Investigación de Microbiología y Parasitología, Hospital Infantil "Eva Sámano de López Mateos"; D, E Departamento de Ecología y Agentes Patógenos, Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

III. Ciclo de vida

Hasta la fecha no está esclarecido el ciclo de vida, pero sea cual fuere, éste debe tener presente los diversos reservorios animales y que los humanos son hospederos potenciales para diversos genotipos de origen zoonótico.^{9, 10} Se encuentran como subtipos propios del hombre, los subtipos 3 y 9, los subtipos 1, 2, 5 y 8 se pueden observar en el hombre y mamíferos (primates, cerdos, ganado vacuno y porcino), al igual que el subtipo 4 que se encuentra en humanos y roedores, y los subtipos 6, 7 y 8 se encuentran en poblaciones que conviven con aves. Es propio de los marsupiales los subtipos 12, 13 y 16, en elefantes el subtipo 11, en jirafas y ganado vacuno los subtipos 10, 12, 14 y 15, en roedores el subtipo 17 y en otros primates los subtipos 10, 13, 14 y 15.⁷ La vía de transmisión de este parásito es oro-fecal. Se han propuesto varios ciclos de vida debido a los diversos mecanismos reproductivos que muestra *Blastocystis* en cultivo, como son plasmotomia y endodiogenia. Sin embargo, solo se considera válida como mecanismo de reproducción la fisión binaria y se cree que las múltiples formas de división observadas se deben más al pleomorfismo que presenta el parásito y no a verdaderas formas de reproducción. Otros autores sugieren un ciclo de vida que comprende quistes de pared

delgada, los cuales inducen la autoinfección, y otros quistes de pared gruesa, que son importantes en la transmisión externa.⁹

El ciclo comienza cuando el hospedero ingiere quistes infectantes de pared gruesa de *Blastocystis*. Al pasar por el tracto digestivo, se desenquistan en el estómago, gracias a la acción de las enzimas y de los ácidos presentes en el mismo. En el intestino se observa una forma avacuolar sin envoltura o cubierta celular que al pasar por este y situarse en las células epiteliales se transforma en la forma vacuolar.⁷ Hay un estadio granular transitorio entre la forma quística y la vacuolar, y es ésta última la que sufre la fisión binaria.^{3,8} El siguiente estadio podría ser tanto la forma ameboide como la granular.⁸ La forma vacuolar también puede transformarse a forma ameboide y se propone que estas no pueden dividirse, por lo cual deben revertir a la forma vacuolar.³ La forma vacuolar está rodeada de una gruesa capa celular y debajo de esta capa se forma la pared quística, aunque se cree que la capa celular se deshace y da origen a la forma quística del parásito, la cual le confiere resistencia al medio y se considera la forma infectante en el ser humano.⁷ Entonces, la enquistación podría ocurrir durante su paso por el colon antes de excreción en la heces fecales. Por lo tanto, *Blastocystis*, vive en ambientes pobres de oxígeno y se caracteriza por la presencia de organelos rodeados de una doble membrana que presenta crestas alargadas, ramificadas y enganchadas llamadas organelos mitocondriales (MLOs). Estos compartimentos celulares contienen una molécula de DNA circular la cual posee propiedades metabólicas mitocondriales aeróbicas y anaeróbicas (Figura 2).⁸

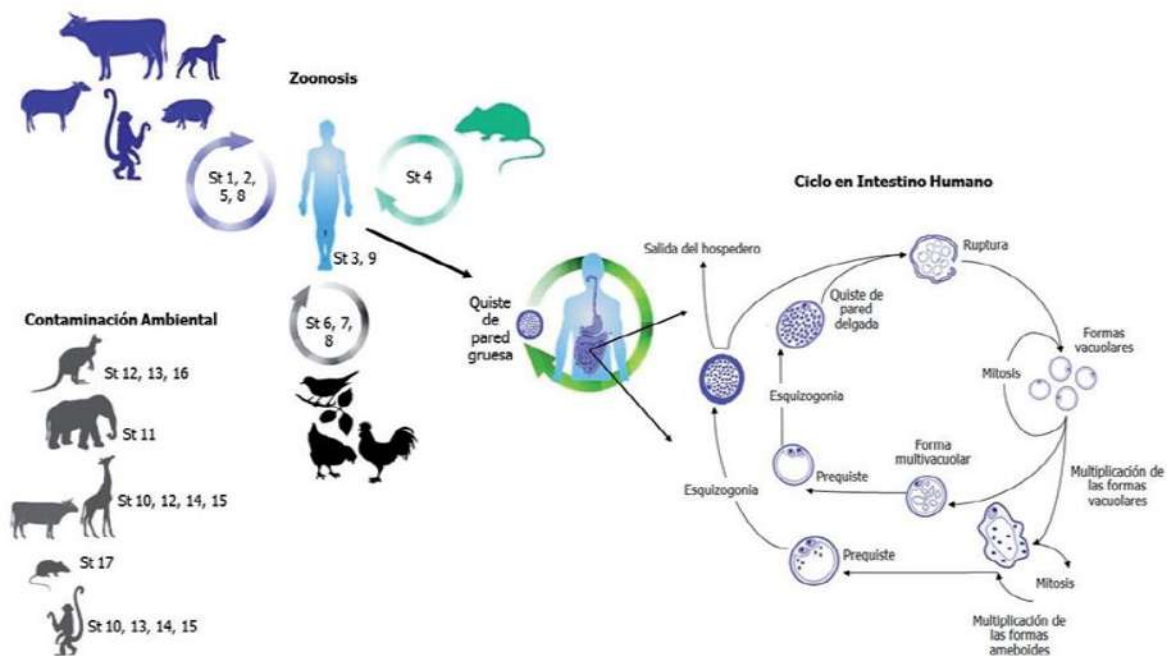


Figura 2. Ciclo de vida. En este ciclo se evidencia diecisiete subtipos (ST) de *Blastocystis* y sus respectivos hospederos intermediarios.⁷

IV. Patogenia

La posibilidad de que *Blastocystis* sea un patógeno o no ha sido durante mucho tiempo un tema de debate. Numerosos estudios realizados en todo el mundo con el objetivo de identificar el significado clínico del organismo han producido resultados contradictorios. La mayoría de los estudios sobre el papel patógeno de *Blastocystis* se basan en la evaluación de pacientes divididos en dos grupos de portadores, los sintomáticos y los asintomáticos. Entre los síntomas más frecuentemente descritos en blastocistosis están diarrea, dolor abdominal, flatulencia, vómito, estreñimiento, fatiga, colitis, náuseas, tenesmo, esteatorrea, pérdida de peso, fiebre, distensión abdominal, anorexia, abdomen agudo en niños, proctosigmoiditis hemorrágica, hipoalbuminemia, edema generalizado o anasarca, urticaria crónica, artritis infecciosa y prurito palmoplantar.^{9, 11} Además se ha reportado en pacientes con síndrome del colon irritable (IBS) en los cuales las condiciones de su microbiota intestinal, el pH, la presión osmótica y potenciales hídricos podrían desempeñar un papel importante en la patogenicidad del parásito.⁶ La patogenicidad y el aumento de la infección es mayor cuando el estrés está presente.¹² Pacientes inmunocomprometidos como VIH o cáncer son particularmente susceptibles a contraer la infección, considerándose entonces también al parásito un oportunista.¹³

En la actualidad, una explicación para la patogenicidad de *Blastocystis* es la correlación de los subtipos con la virulencia. Estudios recientes determinaron la patogenicidad del subtipo 3 que tienen alta correlación con infecciones sintomáticas. Subsecuentemente los subtipos 1, 2, 4 y 6 también han sido observados en pacientes sintomáticos. Sin embargo, ST3 es el subtipo más común reportado de los pacientes sintomáticos, seguido de ST1 y ST2.⁶

Blastocystis reside en el lumen intestinal, estableciéndose desde el íleon hasta el ciego, adhiriéndose en el exterior de la capa mucosa.¹⁴ En un estudio reciente con animales de bioterio se dedujo que con una ingesta de 10 a 100 quistes del parásito se logra contraer la infección y supervivencia de este.¹⁵ El epitelio intestinal sirve como primera línea de defensa del cuerpo contra microorganismos que comprenden un microbiota diversa, incluyendo procariotas y eucariotas patógenos y no patógenos. Las células epiteliales intestinales o enterocitos regulan el flujo de absorción y secreción de contenidos entre el lumen del intestino y el tejido subepitelial. La disfunción de esta barrera es la causa de una variedad de enfermedades. *Blastocystis* induce compromiso de la barrera epitelial humana, algunos subtipos más intensamente y otros muy poco, lo cual refuerza su posición como un patógeno humano.^{16, 17}

En estudios más recientes realizados en el genoma del subtipo 7 se proponen las vías por las cuales *Blastocystis* interacciona con los enterocitos del hospedero para poder causarle su patogenicidad y poder proveerse de nutrimentos para su multiplicación.⁸

Análisis filogenéticos revelan dos genes originarios de posibles cianobacterias en el genoma de *Blastocystis*. Tal acción es interpretada como transferencia secundaria horizontal de genes (HGT).⁸

La HGT es importante en evolución como un mecanismo de adaptación de microorganismos eucariotas a las condiciones del ambiente y se sabe que esta juega un rol importante en Stramenopiles. Para *Blastocystis* se han identificado 133 genes que son candidatos a ser HGT. Algunos de los genes que se originaron por HGT poseen funciones que conducen a una mejor comprensión de cómo este linaje ha emergido. Tres son homólogos al transportador facilitador principal bacteriano (MFS).⁸

Las proteínas MFS forman un largo y diverso grupo de transportadores secundarios, los cuales facilitan el transporte a través de las membranas de variedad de sustratos, incluyendo iones, fosfatos de azúcar, metabolitos o drogas, nucleósidos, aminoácidos y péptidos. La presencia de proteínas MFS en *Blastocystis* podría conferir la habilidad para absorber nutrientes del ambiente, particularmente en el lumen del intestino o cuando afecta al tejido del hospedero. Se han encontrado también diferentes genes HGT que mitigan para enzimas como la alcohol deshidrogenasa, deshidrogenasa corta y dominios de oxidoreductasa que se implicarían en fermentaciones específicas que permanecen ser características. Algunas de ellas están estrechamente relacionadas a genes homólogos encontrados en eucariotas anaeróbicos como *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica*, o en la bacteria *Legionella pneumophila* o *Parachlamydia acanthamoebae*, las cuales infectan o se asocian con *amoeba*. Estas enzimas incrementarían el rango metabólico de *Blastocystis* y sus habilidades para producir energía en ambientes anaeróbicos.⁸

Diversos genes adquiridos por transferencia secundaria horizontal de genes (HGT) podrían participar en la adhesión del parásito a los tejidos del hospedero. En efecto, 26 genes codifican proteínas conteniendo el dominio IPR008009, el cual es asociado con dominios de inmunoglobulinas. Entre estas 26 proteínas de *Blastocystis*, algunas también contienen el dominio IPR015919, el cual caracteriza a cadherinas, una familia de moléculas de adhesión que regula a la adhesión entre células de manera dependiente de Ca^{2+} . Algunos genes codifican hidrolasas que pueden también resultar ser de la transferencia de bacterias a *Blastocystis*. Una de ellas posee un dominio esterasa-lipasa y participaría en la degradación del tejido del hospedero durante la infección.⁸

Los organelos mitocondriales (MLOs) de *Blastocystis* contienen un genoma circular, incluyendo genes que codifican 10 de las 20 subunidades del complejo I, pero todos estos genes están ausentes de codificar subunidades citocrómicas, citocromo oxidasa y ATP sintasas, diferente al de otros Stramenopiles. Los MLOs probablemente tengan tres vías para generar acetil-CoA a partir del piruvato, apoyándose de la presencia del complejo piruvato deshidrogenasa, piruvato:ferrodixin oxidoreductasa y piruvato:NADP+ oxidoreductasa.⁸

La persistencia de *Blastocystis* en el hospedero sería tanto por su habilidad de evadir la respuesta inmune y de adherirse y sobrevivir dentro del tejido del intestino. Son 75 posibles proteínas que se secretan las que han sido clasificadas de acuerdo a su posible función, algunas de las cuales tendrían una relación directa con la patogenicidad (proteasas, enzimas digestivas de hexosas, lectinas, glicosiltransferasas).⁸

Blastocystis puede secretar miembros de la familia inmunofilina, caracterizados por la actividad de peptidil-propil cis-trans isomerasas y disulfuro isomerasas. Estas proteínas tienen el rol en el plegamiento de proteínas, esto también ha sido establecido a que puede tener múltiples funciones. En bacterias, estas enzimas han evolucionado en propiedades de adhesión al hospedero, aunque ellas también pueden modular la función leucocitaria e inducir apoptosis celular.⁸

Blastocystis probablemente usa hidrolasas para afectar el tejido intestinal. Se han identificado a fucosidasa, hexosaminidasa y poligalacturonasa, las cuales podrían participar en el proceso de degradación de glicoproteínas del hospedero. Diferentes proteasas han sido propuestas las cuales se relacionarían en diversos procesos, tales como la invasión celular, metabolismo, citoadherencia y otras funciones de virulencia. En efecto, cisteína proteasas degradan proteínas de la matriz extracelular, degradando

inmunoglobulinas A y G. Curiosamente enzimas proteolíticas de *Blastocystis* también degradan inmunoglobulinas A secretadas por el hospedero, de las cuales pueden ser serinas, cisteína proteasas y metaloproteasas. Entre las cisteínas proteasas de *Blastocystis* se han encontrado cinco leguminosas, las cuales pueden degradar fibronectina, y 8 catepsinas de las cuales 3 son catepsinas B.⁸

Blastocystis tiene genes que codifican también para tres inhibidores de proteasas, cistatina, inhibidor de la proteasa tipo 1 e inhibidor de la endopeptidasa. El inhibidor de la proteasa tipo 1 es similar al inhibidor de la quimiotripsina, el cual es conocido por inactivar enzimas digestivas como la tripsina y la quimiotripsina, protegiendo así al parásito contra defensas digestivas. Además de que la cistatina regula la actividad de las cisteínas proteasas del parásito.⁸

Como otros organismos anaeróbicos, *Blastocystis* tiene la capacidad de eliminar especies reactivas de oxígeno, tales como los superóxidos (O_2^-), peróxidos de hidrógeno (H_2O_2), y radicales hidroxilo ($OH^\cdot$). Este microorganismo tiene que enfrentarse a la exposición oxidativa causada por las células inmunológicas del hospedero. Por esta razón, para protegerse contra las lesiones oxidativas, ha desarrollado un eficiente grupo de enzimas antioxidantes. La primera defensa que posee para dañar el O_2^- son las superóxido dismutasas (SODs), una familia de metaloproteínas que catalizan la dismutación de O_2^- para formar H_2O_2 (Figura 3).⁸

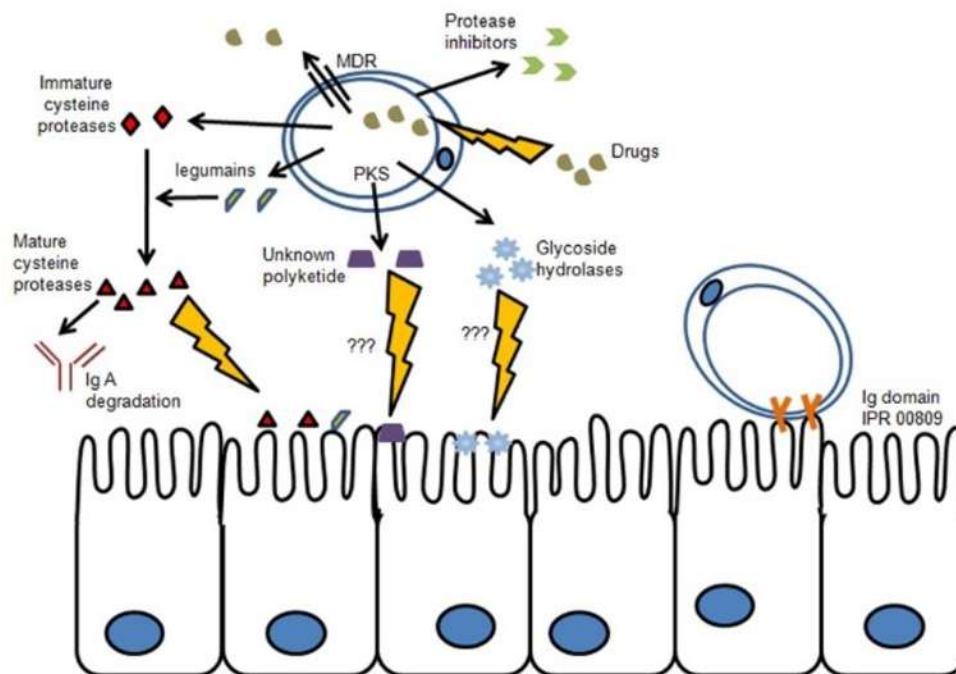


Figura 3. Secreción de proteínas y factores de virulencia identificados en *Blastocystis* ST7, los cuales son potencialmente implicados en la interacción con el huésped.⁸

Se ha planteado la hipótesis de que al igual que otros antígenos parasitarios, los antígenos de *Blastocystis* estimulan los linfocitos T *Helper* Th2 produciendo inmunoglobulina E, mediando la respuesta alérgica. También se especula que *Blastocystis* activa la cascada del complemento para liberar toxinas anafilácticas que interactúan con los mastocitos para provocar afecciones relacionadas con la epidermis.

Los factores de virulencia de *Blastocystis* que causan anemia por deficiencia de hierro aún no están identificados.⁶

V. Diagnóstico

Gran parte de los trabajos realizados para establecer el papel patogénico de *Blastocystis* fue realizada antes de que se estableciera la presencia de los diversos genotipos y por tanto, dependía de la capacidad de detectar el organismo en muestras fecales. La demostración del organismo ha recaído en los métodos parasitológicos convencionales (microscopía de luz en exámenes seriados) que tienen como gran ventaja la posibilidad de detectar infecciones por múltiples enteroparásitos pero no es factible con ellos establecer el genotipo de *Blastocystis*. De hecho, una de las grandes dificultades en el diagnóstico de la blastocistosis está dada por la gran variedad de morfologías que presenta este microorganismo, lo cual dificulta su identificación por microscopía de luz convencional cuando el personal encargado del diagnóstico no está familiarizado con todas ellas. Conocer su distribución en la población humana es necesario para establecer la sensibilidad de las pruebas diagnósticas. Al igual que para otras infecciones por enteroparásitos, la excreción de *Blastocystis* varía de un día a otro, por lo cual se recomienda emplear varias muestras para aumentar las probabilidades de detectar este microorganismo tanto en los portadores asintomáticos como en los sintomáticos. Otras técnicas usadas para su identificación son la concentración con formol-éter, la tinción permanente (hematoxilina férrica o tricrómica), tinta china modificada y el cultivo axénico *in vitro*, presentándose una sensibilidad mayor para el cultivo con respecto a la microscopía y menor para la concentración en formol-éter.⁹ Tinciones simples como el yodo-lugol se pueden utilizar como una ayuda para la rápida identificación de *Blastocystis* en frotis fecales o concentrados.¹⁸

Blastocystis puede ser cultivado y crecer axénicamente en una variedad de medios. Quizás debido a su simplicidad y bajo costo, el medio de Jones ha sido el más popular tanto para la detección y el mantenimiento de *Blastocystis*; otro medio a menudo utilizado para el aislamiento es el Robinson. El cultivo axénico como una herramienta de diagnóstico, utilizando un medio de Jones, tiene una sensibilidad que oscila entre el 52% y el 79% en comparación con los ensayos de PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) en tiempo real. El cultivo axénico *in vitro* es definido como un cultivo con presencia de una indefinida colonización bacteriana.¹⁸

La utilidad de la serología para la detección de infecciones por *Blastocystis* sigue siendo poco clara, algunos estudios han usado serología para detectar diferencias cuantitativas en las respuestas de anticuerpos entre los individuos sintomáticos y asintomáticos. La PCR para *Blastocystis*, en comparación con la tinción tricrómica, posee una especificidad y sensibilidad de 100% y 82%, respectivamente.¹⁸

Los métodos moleculares desarrollados para detectar *Blastocystis* en el DNA extraído directamente de heces frescas han puesto de relieve las deficiencias de sensibilidad de los demás métodos de diagnóstico.¹⁸

En el DNA de las células de un organismo se encuentra toda la información genética que lo define. Un gen, es decir, un segmento del DNA, contiene la información para la síntesis de un polipéptido o una molécula de RNA. Los principales RNA celulares son el RNA ribosomal (rRNA), el RNA de transferencia (tRNA) y el RNA mensajero (mRNA).²⁰

El rRNA es informativo y conformacional, además de que existen múltiples pruebas génicas y bioquímicas que señalan que el rRNA es un elemento fundamental en el mecanismo de la traducción, ya que esta clase de RNA son elementos constitutivos y conformacionales de los ribosomas. En el sistema procarionte se han descrito el rRNA 23S, 16S y 5S; en tanto que las células eucariontes contienen el rRNA 28S, 18S, 5.8S y 5S.²⁰

El rRNA transcrito primario en eucariontes tiene una longitud aproximada de 13 kb, el cual es sometido a procesamiento para obtener las diferentes moléculas de rRNA, que serán transportadas al citoplasma y, con la participación de múltiples factores proteicos, favorecer el autoensamblaje de la maquinaria catalítica proteica citoplásmica conocida como ribosoma.²⁰

Los transcritos primarios de rRNA están constituidos por una región 5', que se identifica como espaciador transcrito externo 5' (ETS5') y se encuentra junto a la región genómica que codifica para el rRNA 18S; inmediato a éste, se encuentra el sitio denominado espaciador transcrito interno 1 (ITS1), la región correspondiente al 5.8S, seguido del ITS2, el sitio de la región del rRNA 28S y, finalmente, una región ETS 3'.²⁰

Las secuencias de DNA que codifican para el RNA ribosomal (rRNA) constituyen unidades de transcripción localizadas en los cromosomas nucleares, los cuales se organizan para formar una familia sencilla multigénica que comprende un gran número de repetidas copias seguida una de otra. El espacio de transcripción interna o ITS incluye dos espacios, ITS1 e ITS2, separados por el gen 5.8S rRNA. Estas regiones evolucionan mucho más rápido que las regiones codificantes por las sustituciones que ocurren en los espacios consideradas mutaciones neutras sin alguna restricción. Por lo tanto, la gran cantidad de investigaciones disponibles con respecto a la utilidad de las secuencias de ITS como excelentes marcadores para clasificar especies, ha llevado a los científicos a considerar ambos espacios, pero principalmente el ITS2, como la mejor herramienta para clasificaciones problemáticas. Además, el gen rRNA 5.8S, a pesar de ser demasiado corto para indicar sólidas filogenias a través de escalas de extenso tiempo, muestra un nivel de conservación de genes similar a SSU rDNA, que es la región con más frecuencia se utiliza para la tipificación genética para el análisis de *Blastocystis* (Figura 4).¹⁹



Figura 4. Pre-RNA en sistema eucarionte.²⁰

DNA Barcoding es el término usado para describir un método para producir un único código identificador para las especies vivas. Esta región se encuentra, en eucariontes, en el gen 18S del rDNA, cerca del final 5' del gen que codifica para el citocromo oxidasa C subunidad I (COI-5'). La región *Barcoding* ha sido también utilizada para establecer los diferentes 17 subtipos de *Blastocystis*.²¹

A. Amplificación Isotérmica Basada en Horquillas (LAMP)

LAMP es un método de amplificación de ácidos nucleicos simple, rápido, específico y sensible, fue desarrollado por Eiken Chemical Co., Ltd.^{22, 23} El mecanismo del método LAMP puede resumirse en tres etapas, una inicial (no cíclica), la amplificación por ciclos y la elongación.^{23, 24} Este método se basa en un auto ciclo para la síntesis de DNA por desplazamiento en cadena que es realizado por una DNA polimerasa con alta actividad de desplazamiento en cadena y un conjunto de *primers* diseñados especialmente, los cuales son considerados un par interior y el par exterior.²⁰ El uso de 4 *primers* diferentes es para reconocer 6 regiones distintas en el gen diana y el proceso de la reacción transcurre a una temperatura constante. La amplificación y la detección del gen se puede completar en un solo paso, mediante la incubación de la mezcla de LAMP, *primers*, DNA polimerasa con actividad de desplazamiento en cadena y los sustratos a una temperatura constante (alrededor de 65 °C). Debido a su alta especificidad, proporciona alta eficiencia en la amplificación de la región deseada, con un rango de entre 10⁹-10¹⁰ veces dentro de 15 a 60 minutos.²²

a) Características:

- No hay necesidad de una etapa de desnaturalización del DNA.²²
- La reacción de amplificación se lleva a cabo de forma continua en condiciones isotérmicas.²²
- La eficiencia de amplificación es extremadamente alta.²²
- Mediante el diseño de 4 oligonucleótidos para reconocer 6 regiones distintas, el método LAMP es capaz de amplificar específicamente la región del DNA deseado.²²
- El costo total puede reducirse, LAMP no requiere reactivos especiales o equipos sofisticados.²²
- Los productos amplificados tienen una estructura que consiste en repeticiones alternativamente invertidas de la secuencia diana en la misma cadena.²²
- LAMP aplica también para RNA con uso de la transcriptasa inversa (RTasa) junto con la DNA polimerasa.²⁵

b) Diseño de *primers*

El diseño de los 4 *primers* se realiza en base a las siguientes 6 regiones distintas del DNA: las regiones F3c, F2c y F1c en el lado 3' y las regiones B1, B2 y B3 en el lado 5' (Figura 5).²²

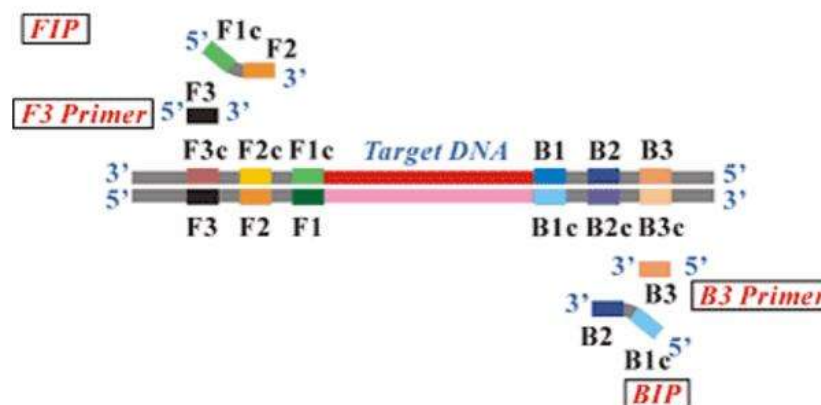


Figura 5. Diseño de *primers*.²²

FIP: *Forward Inner Primer* (FIP) consiste en la región F2 (en el extremo 3') que es complementaria a la región F2c, y en la misma secuencia la región F1c en el extremo 5' que es complementaria a la región F1.

F3: *Forward Outer Primer* consiste en la región F3 que es complementaria a la región F3c.

BIP: *Backward Inner Primer* (BIP) consiste en la región B2 (en el extremo 3') que es complementaria a la región B2c, y en la misma secuencia la región B1c en el extremo 5' que es complementaria a la región B1.

B3: *Backward Outer Primer* consiste en la región B3 que es complementaria a la región B3c.²²

c) Puntos principales para el diseño de *primers*

El adecuado diseño de *primers* es crucial para realizar la amplificación con LAMP.²²

- Distancia entre regiones del *primer*

La distancia entre el extremo 5' de F2 and B2 debe ser considerado de entre 120 y 180 pares de bases (pb), y la distancia entre F2 y F3 tanto como en B2 y B3 será de 0 a 20 pb. La distancia de las regiones para formar el *loop* (5' de F2 a 3' de F1, 5' de B2 a 3' de B1) será de 40 a 60 pb (Figura 6).²²

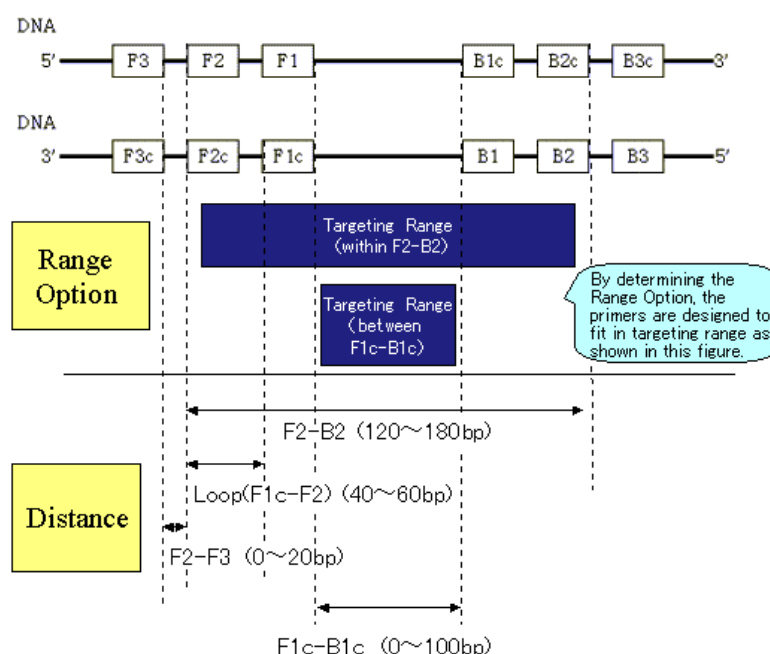


Figura 6. Características de región a amplificar.²²

- Tiempo de fusión (T_m) de las regiones del *primer*

Aproximadamente entre 60° y 65°C, en el caso de oligonucleótidos con abundantes pares de bases GC, aproximadamente entre 55° a 60°C para aquellos abundantes en pares bases AT.²²

- La estabilidad del extremo final del *primer*

El dG calculado sobre 6 pb de las siguientes regiones finales debe ser inferior a menor a 4kcal/mol, extremo 5' de F1c/B1c y extremo 3' de F2/B2 tanto como en F3/B3.²²

- Contenido de pares bases GC

Aproximadamente debe contener entre 50 a 60% de pares bases GC y de 40 a 50% de pares bases AT.²²

- Estructura secundaria

Los *primers* deben ser diseñados de manera que no formen fácilmente estructuras secundarias. La secuencia del extremo 3' no debe ser abundante en pares bases AT o complementaria a otros *primers*.²²

- Otros

Si los sitios de restricción de las enzimas existen en la secuencia base, excepto las regiones del *primer*, se pueden usar para confirmar los productos amplificados.²²

d) Principio básico

Cuando el DNA y los reactivos se incuban a una temperatura constante entre 60 a 65°C y un tiempo de entre 30 a 60 minutos, las siguientes etapas de reacción proceden:

❖ Paso 1

Como el DNA de doble cadena está en la condición de equilibrio dinámico a la temperatura alrededor de 65°C, uno de los *primers* de LAMP pueden alinearse a una de las secuencias complementaria del DNA, a continuación, inicia la síntesis del DNA utilizando la DNA polimerasa con actividad de desplazamiento en cadena, desplazando y liberando una sola hebra de DNA. Con el método LAMP, a diferencia de la PCR, no hay necesidad de la desnaturalización del DNA. La Figura 7 explica el mecanismo de amplificación desde que el *primer* FIP se alinea y libera una sola hebra de DNA.²²

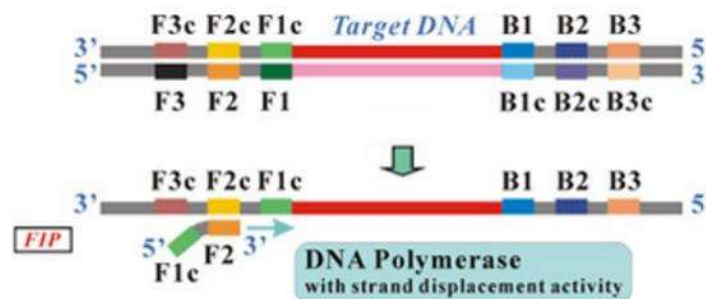


Figura 7. Alineamiento del *primer* FIP.²²

❖ Paso 2

Por la actividad de la DNA polimerasa con actividad de desplazamiento en cadena, un amplicón complementario a la región blanco del DNA se sintetiza, comenzando del final 3' de la región F2 del *primer* FIP (Figura 8).²²



Figura 8. Síntesis de amplicón 5' a 3'.²²

❖ Paso 3

El *primer* F3 alinea con la región F3c, fuera de FIP, en la región blanco e inicia la síntesis del DNA por desplazamiento en cadena, liberando la cadena complementaria sintetizada por el *primer* FIP (Figura 9).²²

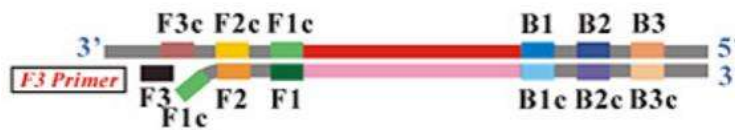


Figura 9. Alineamiento del *primer* F3.²²

❖ Paso 4

Una doble cadena se forma a partir de la hebra de DNA blanco a partir del *primer* F3 hasta la región B3 (Figura 10).²²



Figura 10. Síntesis de otro amplicón 5' a 3'.²²

❖ Paso 5

La cadena sintetizada por el *primer* FIP se libera debido a la síntesis de una nueva cadena por el *primer* F3. Entonces, se liberan cadenas sencillas con forma de horquilla o *loop* en el extremo 5' debido a las regiones F1c y F1 complementarias (Figura 11).²²



Figura 11. Cadena sencilla, en la cual la región F1c y F1 complementarias dan origen a un *loop*.²²

❖ Paso 6

La cadena sencilla del paso 5 sirve como plantilla para la síntesis de DNA iniciado por *primer* BIP y subsecuentemente el *primer* B3 sintetizando el DNA por desplazamiento en cadena. El *primer* BIP alinea con la cadena de DNA sintetizada en el paso 5. Partiendo desde el extremo 3' de la región BIP, la síntesis de la cadena complementaria se lleva a cabo. Por este proceso, el DNA que inicialmente en uno de sus extremos formaba un *loop* regresa a ser una estructura lineal. El *primer* B3 alinea con el exterior de BIP y luego, con ayuda de la actividad de la DNA polimerasa y comenzando en el extremo 3', la cadena sintetizada a partir del *primer* BIP es desplazada y liberada como una sola cadena antes de la síntesis del DNA a partir del *primer* B3 (Figura 12).²²

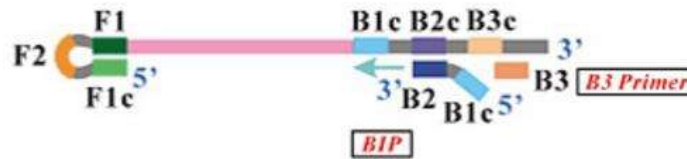


Figura 12. Alineamiento de *primer* BIP.²²

❖ Paso 7

Ahora se ha sintetizado una doble cadena por el proceso descrito en el paso 6 (Figura 13).²²



Figura 13. Síntesis de amplicón 3' a 5'.²²

❖ Paso 8

La cadena complementaria que se sintetizó por el *primer* BIP forma una estructura que contiene en cada extremo formas de *loops*, la cual se asemeja a una mancuerna. Esta sirve como estructura de partida para el ciclo de amplificación en el método LAMP (fase cíclica) (Figura 14).²²



Figura 14. Amplicón conteniendo en sus extremos regiones complementarias los cuales forman *loops*.²²

❖ Paso 8 a 11 (Etapa de amplificación cíclica)

La estructura con forma de mancuerna se sintetiza rápidamente y forma nuevamente una cadena doble en la cual uno de sus extremos aún conserva un *loop*, en tanto en el otro extremo, ya sea el primer FIP o BIP, se alinea y sintetiza una nueva cadena la cual es liberada al alinearse el *primer* B3 o F3. La nueva cadena sintetizada y liberada forma nuevamente un *loop* en su extremo a causa de la complementariedad de las regiones B1c/B1 o F1c/F1. Así, en el extremo opuesto al *loop*, se alinea el *primer* F3 o B3, y se sintetiza una nueva cadena debido a lo anterior obtenemos una doble cadena, en la cual nuevamente uno de los *primers* externos con ayuda de la DNA polimerasa sintetizarán una nueva cadena, liberando así una cadena la cual ahora formara en ambos extremos *loops*. Consecutivamente de esta manera se crean plantillas de la región blanco en forma de mancuerna a partir de las cuales los *primers* interiores se alinean para continuar sintetizando la región blanco y sobre sí misma la nueva cadena doble que contendrá *loops* y a partir de estos nuevamente los *primers* interiores se alinearan y seguirán sintetizando la región blanco, a causa de este alineamiento mayoritario de *primers* interiores y las regiones complementarias sintetizadas es por lo que se observa el DNA en forma de “zig-zag”. Finalmente se sintetizarán amplicones con forma de “zig-zag” de diferentes tamaños, desde amplicones con forma de mancuerna, hasta pequeñas a grandes estructuras en forma de “zig-zag”, las cuales son repeticiones invertidas de la región diana en la misma cadena (Figura 15).²²

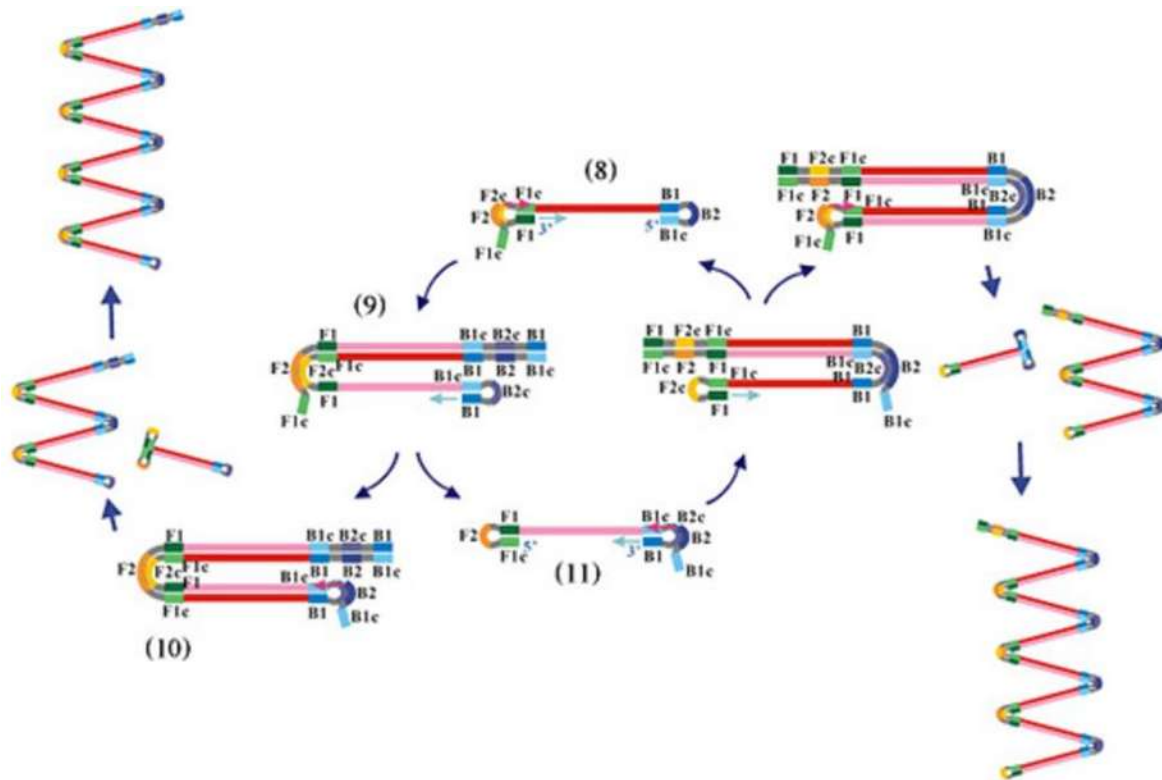
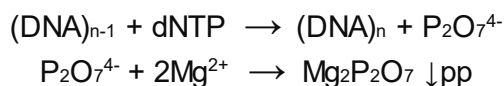


Figura 15. Síntesis de amplicones de diferentes longitudes.²²

B. Técnicas para la evaluación de amplicones de LAMP

a) Turbidez Post-Reacción

Cuando el DNA es amplificado por el método de LAMP, la turbidez observada en la reacción aumenta durante el progreso de la reacción. Análisis químicos y espectroscópicos indican que el producto precipitado es pirofosfato de magnesio. La producción del precipitado del LAMP puede ser descrito por las siguientes reacciones:



En los procesos de amplificación, iones pirofosfato son lanzados como un subproducto de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP). El ion pirofosfato reacciona con iones magnesio en la reacción produciendo un precipitado. Cuando una mezcla de reacción contiene DNA amplificado, se puede llevar esta a centrifugación o spin por algunos segundos para observar en el fondo del tubo el precipitado blanco y fácilmente se puede corroborar la reacción positiva a simple vista. Algunas veces la reacción se acompaña del precipitado instantáneamente después de su finalización y sin centrifugación (Figura 16).²⁶

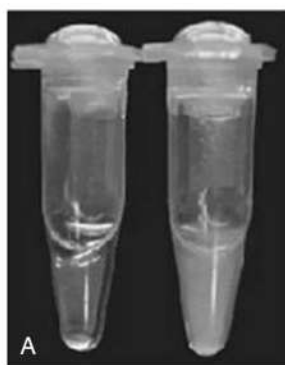


Figura 16. Detección visual de la reacción del método LAMP. **A** Detección de la reacción de LAMP por turbidez. *Izquierda* sin DNA blanco (negativo); *derecha*, presencia de DNA blanco amplificado (positivo).²³

b) Electroforesis en gel de agarosa

Principalmente el análisis del DNA amplificado se lleva a cabo por electroforesis en gel de agarosa, al cual se le puede agregar un colorante fluorescente y se lleva a observación bajo luz UV. En una reacción positiva al LAMP, debido a la formación de amplicones con variada cantidad de *loops*, el tamaño es variado de los productos amplificados en forma de “zig-zag”, por lo tanto, se observará una variada cantidad de bandas, desde unas muy delgadas hasta otras más anchas en el gel de agarosa y de diferente tamaño. Así el DNA amplificado produce un patrón que figura similitud a una escalera, lo cual lo diferencia de una revelación en gel agarosa de otros métodos de amplificación. Esta técnica es común y disponible en casi todos los laboratorios de biología molecular, pero es insuficiente para precisar la detección y cuantificación del DNA amplificado, además de un alto riesgo de contaminar muestras negativas (Figura 17).²⁶

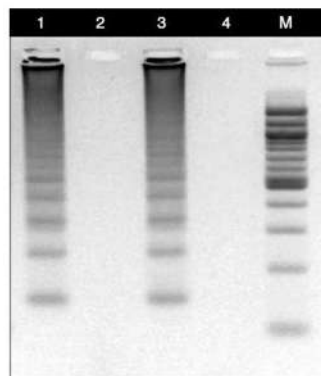


Figura 17. Análisis de los productos de la reacción de LAMP usando electroforesis en gel de agarosa. Carril 1 y 3, muestras con DNA amplificado, carril 2 y 4 DNA negativo, carril M peso molecular.²⁷

c) Uso de colorantes fluorescentes

Para una mejor evaluación visual de la reacción obtenida, el DNA puede intercalarse con colorantes fluorescentes como: SYBR Green el cual se enlaza preferentemente con secuencias ricas en Guanina y Citosina; Picogreen; Yoduro de propidio; la familia de los colorantes SYTO, de los cuales el SYTO-82 ha resultado ser la mejor opción para LAMP, ya que emite una mejor señal al intercalarse con el DNA amplificado y no se observa una preferencia hacia algún tipo de base nitrogenada. Tener en cuenta que a altas concentraciones del colorante puede causar inhibición de la reacción, si este se agrega antes de llevar a proceso, debido al contenido de agentes adicionales en el colorante como es el caso de SYTO-82 el cual contiene 5% de Dimetilsulfóxido (DMSO) en su *stock* original, y a mayores porcentajes a 5% causa inespecificidad de los *primers*, por lo que se sugiere ajustar una dilución a la reacción deseada.^{26, 28}

Cuando la reacción de LAMP es positiva, con la ayuda de estos colorantes fluorescente, puede observarse a simple vista un cambio de coloración, y llevando la reacción bajo luz UV se puede observar la fluorescencia emitida por aquellas reacciones positivas. Este tipo de estrategias es asequible, rápida y cuantitativa, además puede ser evaluada sin instrumentos de alta tecnología (Figura 18).^{26, 28}



Figura 18. Detección visual de la reacción del método LAMP. **B** Detección de la reacción de LAMP por fluorescencia. *Izquierda* sin DNA blanco (negativo); *derecha*, presencia de DNA blanco amplificado (positivo).²³

Existen otras técnicas para evaluar el producto de LAMP, en algunas aumentados el costo-beneficio como lo son:

- Turbidimetría en tiempo real.
- Polímeros catiónicos
- Chip electroquímico
- Microcámara con gel de poliacrilamida
- Uso de calceína como indicador
- Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET)
- Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) ²⁸

C. Sensibilidad y especificidad de LAMP

En general, el método LAMP ha sido de 10 a 100 veces más sensitivo que la PCR con una detección límite de 0.01-10 pfu de virus. La especificidad de la amplificación de LAMP es directamente atribuida a los juegos de *primers* que abarcan las distintas regiones del gen blanco que se usa para su amplificación. La autenticidad de la amplificación de los productos de LAMP pueden ser establecidos por la catálisis con una enzima de restricción específica para cada región, establecida previamente.²⁴

El diseño y evaluación de nuevos *primers* en LAMP para la detección de varios patógenos para fines de investigación han estado en marcha desde antes del 2008. LAMP se ha aplicado para algunas importantes enfermedades a nivel mundial como lo es la tuberculosis, la malaria y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Pero no solo se ha propuesto para estas enfermedades el método también se han iniciado ensayos para el dengue, rabia, úlcera de Buruli, lepra, enfermedad de Chagas, tripanosomiasis, leishmaniasis, cisticercosis, equinococosis, trematodiasis, filariasis, esquistosomiasis, helmintiasis y enfermedad de pian.²⁹

VI. Tratamiento

Debido a la controversia en torno a la potencial patogenicidad de *Blastocystis* y la naturaleza autolimitante de los síntomas, el tratamiento de esta enfermedad es confuso.³⁹ Metronidazol es el antibiótico más frecuentemente prescrito para el tratamiento de blastocistosis, con altas tasas de eliminación reportado por algunos estudios clínicos. *Blastocystis* ha sido reportado resistente a Metronidazol desde 1996, lo cual propone que podría ser subtipo dependiente.³⁰

Algunos genes que codifican para la resistencia a ciertos antibióticos han sido descubiertos en *Blastocystis*. Existen dos clases de genes para la multiresistencia a antibióticos: la primera clase corresponde a proteínas que se mantienen bajo la hidrólisis de ATP; la segunda clase incluye proteínas que regulan el flujo de la reacción con un gradiente de H⁺ o Na⁺.⁸ Lo que indica que, si se usa el Metronidazol debería ser utilizado en las más altas concentraciones posibles. Aunque esto no es lo ideal, ya que tomaría algunos efectos secundarios sobre el paciente, tales como náuseas y vómitos. Pero incluso en las más altas concentraciones algunos estudios revelan que no existe la total eliminación del parásito, por lo tanto, Metronidazol no debería ser el antibiótico de elección.³⁰

La prescripción de una terapia de antibióticos triple es lo más comúnmente utilizada por algunos médicos en estos tiempos. La idea tras una terapia triple es que la combinación de tres drogas tendrá la más alta posible eficacia contra el parásito, como el uso de secnidazol, furazolidona y nitazoxanida. Paramomicina es actualmente uno de los tratamientos recomendados por el Centro de Control para Infecciones (CDC). Una reciente revisión en tratamientos antimicrobianos para *Blastocystis* propone que Trimetoprim-sulfametoxazol es una buena alternativa al Metronidazol con menos efectos secundarios y de más bajo costo.³⁰

DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

A nivel mundial, las infecciones parasitarias intestinales son una de las principales causas humanas de morbilidad y mortalidad, especialmente en países en los cuales los estándares de salud pública no son tan altos como en los países desarrollados.³¹ Estas afectan a diversos grupos de poblaciones, de ambos sexos y ubicadas en diferentes zonas geográficas. Pueden perjudicar a cualquier grupo etario, pero la población infantil suele ser la más afectada.³² Con una distribución cosmopolita, *Blastocystis* es usualmente el más común de los parásitos aislado en exámenes parasitológicos y está presente en un número diferente de especies viviendo en el tracto gastrointestinal de humanos, animales de granja, aves, roedores, reptiles y otros.^{33, 34} Aunque en algunos estudios indican baja prevalencia en Europa, datos epidemiológicos han demostrado que esta tendencia no se mantiene en países como Indonesia (60%), Filipinas (40,7%) y Egipto (33%). En Latinoamérica, se ha evidenciado a *Blastocystis* con una frecuencia de 61,6% en pacientes adultos sintomáticos, a diferencia de los asintomáticos en los que se encontró un 41,6%. En Perú un estudio en niños de 5 a 13 años demostró su presencia en un 92,3% de los participantes con sintomatología digestiva; además se ha identificado como agente causal en un 51,6% en poblaciones indígenas infantiles.³⁵ Para Cuba, Chile, México y Venezuela se informa alta prevalencia, particularmente en Colombia (distrito Gayra), donde se especifica 62,6 % para la infección única.³⁶

Existen factores de riesgo para la infección de *Blastocystis*, tanto personales como de comunidad, tales como el estado nutricional, la edad, el cercano contacto con animales infectados, ya que es considerada una zoonosis, área geográfica, cultura y estilo de vida de la población.^{36, 37, 38} La forma de transmisión puede adoptar las variantes fecal-oral y anal-oral, a través del consumo de frutas u hortalizas mal lavadas, beber agua contaminada con excremento de animales, y cuando existen reservorios de animales; de ahí que, se describe que la probabilidad de contraer parasitismo intestinal aumenta ante el consumo de agua no tratada, el incorrecto tratamiento de aguas residuales, la ausencia de red de abasto de agua, y las manos sucias, entre otros factores.³⁶ Asimismo, algunos estudios han mostrado que el 62% de los portadores de este parásito se han asociado al desarrollo de síntomas.⁴⁰

Existen varios métodos para la detección del parásito. La microscopía de luz es el método de diagnóstico empleado en la mayoría de los laboratorios clínicos, sin embargo, ha demostrado tener la más baja sensibilidad para la detección de *Blastocystis* (48%), siendo los métodos moleculares, como la PCR, las técnicas más sensibles,³³ por lo que recientemente se han usado para estudiar la prevalencia y diversidad del parásito en poblaciones humanas.³⁴ *Blastocystis* muestra una relevante diversidad genética de linajes ribosomales o subtipos,³³ documentándose al menos 17 STs con base en el gen de 18S del RNA ribosomal, de los cuales del ST1 al ST9 se pueden encontrar en humanos.^{41, 42}

En cuanto a las asociaciones de los subtipos (STs) con morfotipos y hallazgos clínicos, la subtipificación por PCR no sólo indica que los diversos subtipos se correlacionan con diferentes morfotipos, sino también su estrecha relación con los síntomas definidos. Aunque el ST3 es el subtipo más común que se encuentra en la mayoría de los estudios epidemiológicos en humanos, ha existido una asociación más baja reportada del ST3 con los síntomas en comparación con el ST1.³³

Zona geográfica	Subtipo(ST) de <i>Blastocystis</i>								
	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9
África	25%	7%	45%	3%	-	16%	7%	-	-
América	42%	33%	25%	-	-	-	-	-	-
Asia Central	33%	13%	42%	2%	2%	2%	8%	-	-
Europa	16%	12%	43%	25%	1%	0.5%	1.5%	0.8%	-
Asia Este y Sureste	40%	3%	48%	2.5%	-	3.5%	1.5%	-	0.5%
Australia	32%	4%	42%	14%	-	4%	1%	2%	-

Tabla 1. Prevalencia de los subtipos de *Blastocystis* por región geográfica.⁴³

Un estudio enfocado en identificar los STs de *Blastocystis* en pacientes y portadores asintomáticos de seis países de Sudamérica, mostró que el ST3 fue el más frecuente, seguido del ST1, en Ecuador (83% para ST3 frente al 12% para ST1), Perú (92% para ST3 frente al 0% para ST1) y Argentina (63% para ST3 frente al 15% para ST1). Por el contrario, el ST1 se observó con mayor frecuencia en Bolivia (30% para ST3 frente al 33% para ST1) y Colombia (18% para ST3 frente al 45% para ST1). Los estudios realizados en México han demostrado que niños de áreas semi-urbanas y rurales tienen una mayor frecuencia de *Blastocystis* que los adultos de la misma área. En un estudio reciente los subtipos ST3 Y ST1 fueron asociados con niños de Hermosillo y Morelia respectivamente, los cuales se determinaron por medio de PCR anidada.³⁵

Aunque la PCR y otros métodos moleculares son de gran ayuda en el diagnóstico clínico, presentan como gran desventaja su alto costo, debido al equipamiento que usa y su larga duración en la que esta puede entregar resultados, ya que según el método que se utilice, puede requerirse secuenciación o alguna otra técnica acoplada. Un método molecular novedoso de reciente descripción es la Amplificación Isotérmica Basada en Horquillas o LAMP por sus siglas en inglés. La técnica de LAMP brinda resultados en menor tiempo con alta sensibilidad y especificidad. Los resultados pueden ser vistos a simple vista debido a la turbidez que forma después de la reacción, también se pueden usar reactivos como la calceína o el SYBR Green, que dan cierta coloración cuando la reacción se torna positiva. Los países que están en vías de desarrollo son los que más sufren de infecciones por microorganismos, siendo así el LAMP una buena opción para incorporar como pruebas de rutina en el laboratorio debido a su bajo costo y a su simplicidad en cuanto a equipos.⁴⁴

JUSTIFICACIÓN

En México se comparó la variabilidad genética de los subtipos de *Blastocystis* entre portadores humanos de dos regiones climáticas contrastantes. En el cual se usó la PCR convencional, utilizando *primers* de Santin et al. Se encontraron asociaciones entre ST3 y ST1 en los menores de Hermosillo y Morelia, respectivamente, lo que sugiere que existe una relación entre el ST, el medio ambiente, las condiciones y el anfitrión. Asimismo, se demostró que los cambios en la temperatura y la humedad pueden afectar la viabilidad de los quistes de *Blastocystis*.³⁵

En Filipinas se empleó el método LAMP para determinar el parásito de transmisión sexual *Trichomonas vaginalis* en muestras vaginales, en el cual también se usó la PCR y el cultivo, para comparar el análisis de la alta sensibilidad de LAMP. Obteniendo resultados para la sensibilidad de LAMP de 42.06% con parado con el cultivo de 8.26% y la PCR 7.44%. Para el ensayo de LAMP se diseñaron 4 *primers* para la región 18S SSU rDNA, los cuales amplificaron para regiones de 200 pb a 1000 pb.⁴⁵

En Sri Lanka se realizó un estudio con el objetivo de valorar la sensibilidad de LAMP en comparación con la microscopía de luz y PCR anidada para confirmar el diagnóstico de *Leishmania donovani*, en el cual el LAMP arrojó resultados con una sensibilidad del 82.6%, 19/23 muestras positivas al parásito, además se comparó el tiempo que transcurre entre la PCR, que fue de 3 horas 30 minutos, y LAMP, de 1 hora 40 minutos, para este se utilizaron 4 *primers*. Considerando a LAMP una herramienta útil de diagnóstico en potencia para leishmaniasis.⁴⁶

En los Estados Unidos de América se incluyó a LAMP y PCR para determinar la existencia de *Plasmodium* spp. en muestras de sangre de diferentes países endémicos al parásito que fueron tomadas de pacientes con pre-tratamiento para demostrar la sensibilidad y especificidad de los métodos, además de determinar el rango límite de detección de parásitos por μL de muestra. También se usó el verde malaquita como revelador para muestras positivas, el cual a una concentración de 0.004% arroja resultados. Observándose un 100% de sensibilidad para LAMP y la PCR, pero una especificidad de 97% para LAMP y 86% para PCR en las diferentes especies de *Plasmodium* spp. Además, el LAMP detectó de 1 a 8 parásitos/ μL de muestra.⁴⁷

Blastocystis es el parásito más frecuente identificado en los estudios coproparasitológicos; aunque su papel patógeno es controversial, existe evidencias que muestran que este microorganismo está asociado al desarrollo de trastornos gastrointestinales, como el Síndrome de Colon Irritable.¹⁸ Asimismo, su diagnóstico rutinario basado en la examinación microscópica de muestras fecales, puede resultar poco sensible y específico ya que depende de la experiencia del encargado, mientras que las técnicas moleculares convencionales todavía son costosas y poco accesibles para ser aplicadas de manera rutinaria.⁷ Por ello, es necesario contar con una técnica molecular que sea económica y fácil de aplicar en el laboratorio clínico, cuyos resultados sean sensibles y específicos para el diagnóstico de esta parasitosis, siendo la técnica molecular de LAMP de fácil escalonamiento al laboratorio clínico con resultados reproducibles, sensibles y específicos para el diagnóstico de la blastocistosis.

HIPÓTESIS

Debido a que la técnica de LAMP es un método molecular que genera resultados sensibles y específicos sin la necesidad de una gran inversión de equipo, es posible estandarizar esta técnica para su establecimiento y aplicación para el diagnóstico de *Blastocystis* en el Laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil de Morelia.

OBJETIVOS

I. Objetivo general

Estandarizar la técnica de Amplificación Isotérmica Basada en Horquillas (LAMP) para el diagnóstico molecular de *Blastocystis* en muestras de niños procedentes del Hospital Infantil de Morelia.

II. Objetivos específicos

1. Identificar parámetros demográficos y clínicos de los participantes cuyas muestras sean incluidas en el presente estudio.
2. Describir las formas de *Blastocystis* más frecuentes.
3. Contar con una coproteca de DNA de muestras negativas y positivas a *Blastocystis*, diagnosticadas por microscopia y por PCR en punto final.
4. Estandarizar la técnica de LAMP para el diagnóstico de *Blastocystis*.
5. Calcular el valor predictivo positivo y negativo de la técnica estandarizada.
6. Establecer un procedimiento para la transferencia de tecnología, para aplicar la técnica de LAMP en el laboratorio de Parasitología del Hospital de Infantil.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Universo de estudio

Se utilizaron muestras fecales de pacientes remitidos del servicio de Consulta Externa del Hospital Infantil de Morelia que se procesaron por exámenes coproparasitológicos en serie de 3, a las cuales previamente se les otorgaron por escrito las indicaciones de recolección y transporte de las muestras de heces (Anexo 1), para después ser procesadas por técnicas coproparasitológicas de examen microscópico directo en fresco (Anexo 2), técnicas de concentración por sedimentación por el método de Ritchie o Formol-Éter (Anexo 3) y flotación por el método de Sheather o Sacarosa (Anexo 4); de ser necesario para la identificación de especies de algunas amibas se llevó a cabo mediciones microscópicas (Anexo 5). A todos los pacientes se les solicitó al padre o tutor la autorización por escrito en una hoja de consentimiento (Anexo 6) informando sobre la inclusión de las muestras de heces del paciente en la presente investigación. Además, se les aplicó una encuesta para conocer síntomas y factores de riesgos asociados a los pacientes (Anexo 7). Asimismo, se realizó la extracción del DNA de las muestras (Anexo 8) y se analizaron las muestras para confirmar la ausencia o presencia de *Blastocystis* por PCR en punto final (Anexo 9), y en su caso, los STs se identificarán a través de la secuenciación de los amplicones mediante un proveedor comercial, para posteriormente analizar las

muestras con la nueva técnica diagnóstica LAMP (Anexo 10). Se conformaron 4 grupos: a) muestras positivas exclusivamente con *Blastocystis*; b) muestras positivas con *Blastocystis* y con otros protozoarios o helmintos intestinales; c) muestras negativas a *Blastocystis* pero positivas a otros protozoarios y helmintos intestinales; d) muestras negativas a cualquier protozoario o helminto intestinal.

II. Tamaño de la muestra

Se considera un tamaño de muestra por conveniencia, donde la inclusión de las muestras se realizará por asignación secuencial; para ello, el tamaño propuesto es de 120 muestras fecales divididas en 4 grupos, los cuales estarán formados por 30 muestras cada uno.

III. Definición de las unidades de observación

Muestras fecales de portadores o no portadores de *Blastocystis* con parasitosis única o múltiple.

IV. Criterios de inclusión

Participantes de 1 a 15 años, de ambos sexos, pacientes del Hospital Infantil de Morelia.

V. Criterios de exclusión

Pacientes cuyos padres no hayan otorgado su consentimiento informado o que hayan proporcionado escasa muestra fecal.

VI. Criterios de eliminación

Pacientes con datos incompletos o cuyas muestras se procesaron incorrectamente.

VII. Definición de variables y su medición

Variable	Definición	Tipo	Medición
Parámetros demográficos y clínicos.	Procedencia de los pacientes, edad y sexo.	Cualitativa nominal	Realizar un análisis bi- y multi-variado contrastando la edad, sexo, procedencia, y otros factores de riesgo, así como signos y síntomas con la presencia y los subtipos de <i>Blastocystis</i> .
Coproteca de DNA de muestras negativas y positivas a <i>Blastocystis</i> .	Referencia y consulta de los subtipos de <i>Blastocystis</i> .	Cualitativa nominal	Subtipos del 1 al 9, que son los que infectan al humano.
Estandarizar la técnica de LAMP.	Establecer y ajustar la técnica LAMP para <i>Blastocystis</i> .	Cuantitativa discontinua	Evaluar la sensibilidad y especificidad de la

			técnica LAMP para <i>Blastocystis</i> .
Valor predictivo positivo y negativo de la técnica estandarizada.	Capacidad de la técnica para detectar y amplificar DNA de <i>Blastocystis</i> .	Cualitativa nominal	Eficacia real de la técnica LAMP para <i>Blastocystis</i> .
Procedimiento para la transferencia de tecnología.	Transmisión de conocimientos científicos y técnica estandarizada para <i>Blastocystis</i> .	Cualitativa	Rendimiento y resultados de la técnica LAMP para <i>Blastocystis</i> .

VIII. Selección de las fuentes, métodos y técnicas de recolección de la información

Los datos de los pacientes incluidos en la investigación se obtuvieron de bitácoras de registro y tarjetas de exámenes coproparasitológicos del Laboratorio de Investigación de Microbiología y Parasitología y del Archivo Clínico del Hospital Infantil de Morelia para posteriormente ser recabados estadísticamente en hoja de cálculo Excel.

IX. Plan de procesamiento y presentación de la información

Hoja de cálculo Excel, procesador de texto Word.

X. Prueba piloto

La estandarización de la técnica de LAMP se realizó en el Departamento de Ecología de Agentes Patógenos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y posteriormente se adecuará, mediante una transferencia de tecnología, al Laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil de Morelia.

XI. Aspectos éticos

Esta investigación no represento riesgo para los niños del Hospital Infantil de Morelia que participaron, ya que se les realizó un estudio adicional a las muestras de materia fecal, por lo que de acuerdo al Reglamento de Investigación de la Ley General de Salud, esta investigación se clasifica sin riesgo para los sujetos participantes; sin embargo, se mantendrá en la publicación de resultados el anonimato y la confidencialidad de sus datos personales y se cumplirán las disposiciones que en los aspectos éticos dicho reglamento establece, así como lo postulado por la Asociación Médica Mundial en las Declaraciones de Helsinki y sus actualizaciones.

Debe resaltarse que durante este proyecto no se intervino en el tratamiento ni en la práctica o diagnóstico clínico rutinario, quedando estos bajo la responsabilidad del personal médico y químico responsable, enfocándose esta investigación a trabajar exclusivamente con el DNA de *Blastocystis* de materia fecal, previamente utilizada para su procesamiento y análisis clínico y que sería desechada.

XII. Prevención de riesgos para el personal

Para el personal que procesa las muestras se tomaron las medidas preventivas a fin de evitar un eventual contagio, por lo que fue obligatorio el uso de bata, cubrebocas y guantes.

ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

I. Recursos humanos

Hospital Infantil Eva Sámano de López Mateos

El Personal del Hospital Infantil tuvo a su cargo el registro del protocolo de investigación para ser considerado por la Comisión de Investigación.

Químico Farmacobiólogo adscrito al Hospital:

- Colecta y procesamiento de muestras, lectura e interpretación de resultados.
- Sensibilización y aplicación de encuestas.

Tesista:

- Registro del protocolo de investigación, colecta y procesamiento de muestras, lectura e interpretación de resultados.
- Recolección de datos.
- Realizó una estancia en el Hospital General Dr. Manuel Gea González para procesamiento de muestras por medio de PCR y LAMP.
- Redacción de trabajo final.

Pasantes de Servicio Social o Prácticas Profesionales:

- Procesamiento de muestras.

Hospital General Dr. Manuel Gea González

Personal adscrito al Hospital:

- Apoyo al tesista para el procesamiento de muestras, lectura e interpretación de resultados por medio de la técnica de LAMP.
- Redacción de documento para publicación.

II. Recursos Financieros

El Hospital Dr. Manuel Gea González y el CONACYT proyecto 168619 asumió la subvención del pago de secuencias, reactivos e insumos para la realización de esta investigación, mientras que el procesamiento de muestras de heces es parte de la rutina de trabajo del Hospital Infantil de Morelia Eva Sámano de López Mateos.

RESULTADOS

I. Análisis estadístico

La inclusión de un total de 120 muestras fue establecida, iniciando con la extracción de las primeras 42 y a la par se trabajó con la subtipificación de estas además la estandarización del método LAMP. Al no obtener los resultados deseados de LAMP, se presentan únicamente los resultados de estas 42 muestras.

De las 42 muestras, que fueron las primeros que se obtuvieron de manera consecutiva, sin tomar en cuenta el resultado del examen coproparasitológico, ya que fueron incluidas de los 4 grupos antes mencionados, el 45% (19) fue positivo y 55% (23) negativo a blastocistosis (Figura 19).

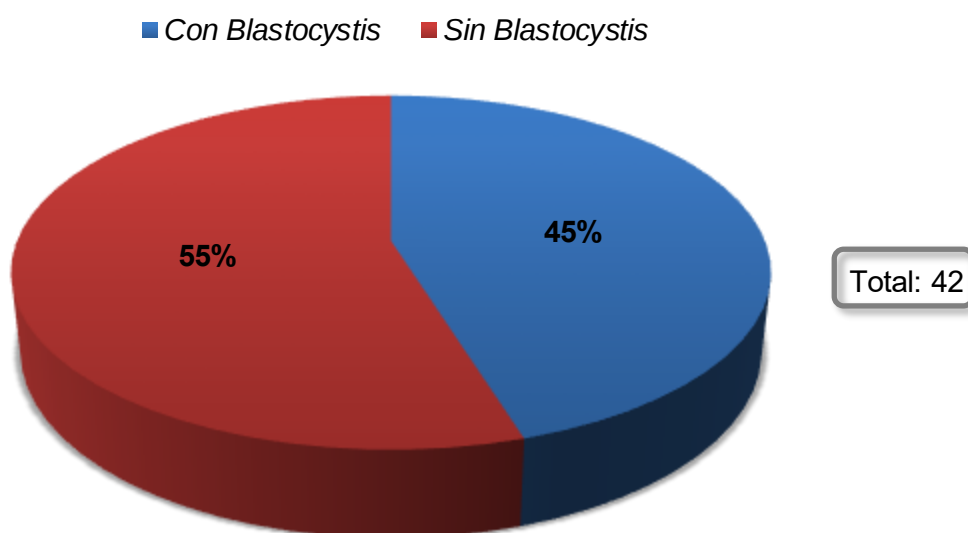


Figura 19. Niños con blastocistosis.

Blastocystis estuvo asociado a parásitos comensales en 8 muestras (42%), a patógenos en un caso (5%), a comensales/patógenos también en un caso (5%) y como parasitosis única en 9 casos (48%) (Figura 20).

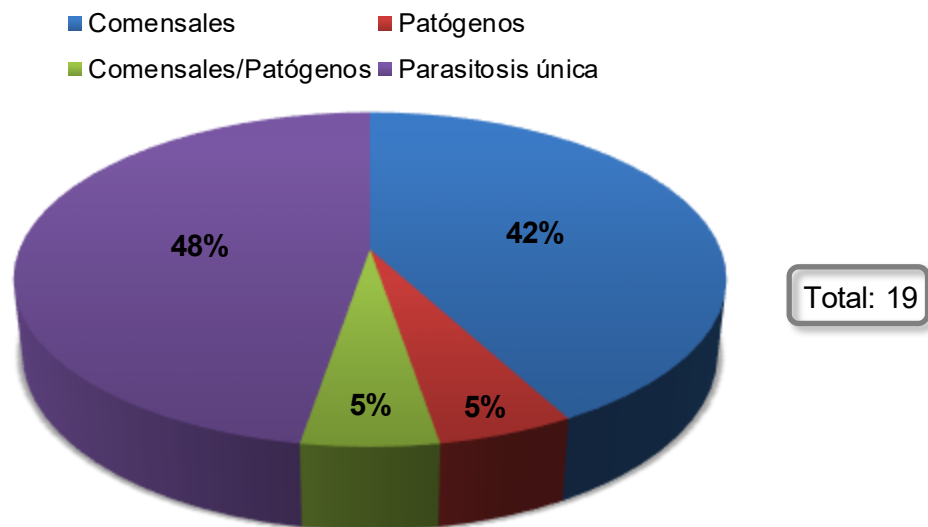


Figura 20. Asociación de *Blastocystis* con otros parásitos.

De los 19 pacientes positivos a *Blastocystis*, 55% (11) corresponde al sexo femenino y 45% (8) al sexo masculino, presentándose una diferencia entre sexos (Figura 21).

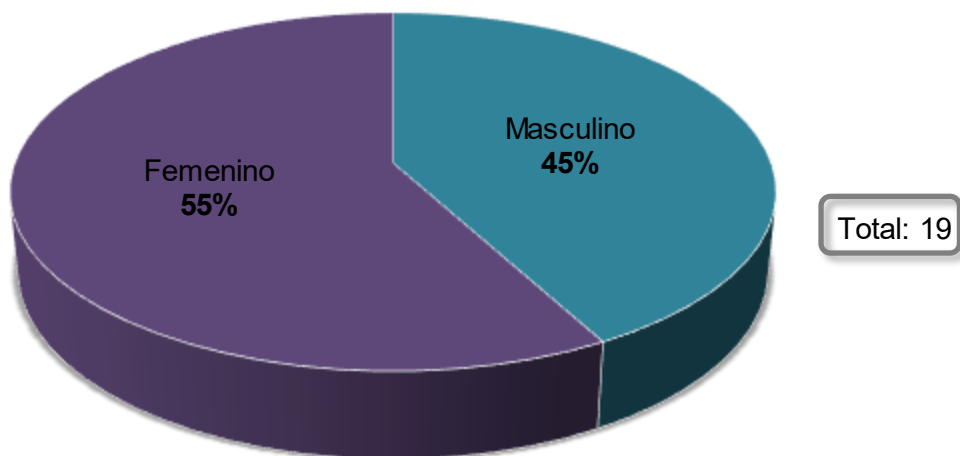


Figura 21. Distribución de *Blastocystis* por sexo.

Con respecto a la distribución por grupos etarios, tenemos 4 (21%) de preescolar (3 a 5 años) y 15 (79%) para escolar (6 a 15 años) (Figura 22).

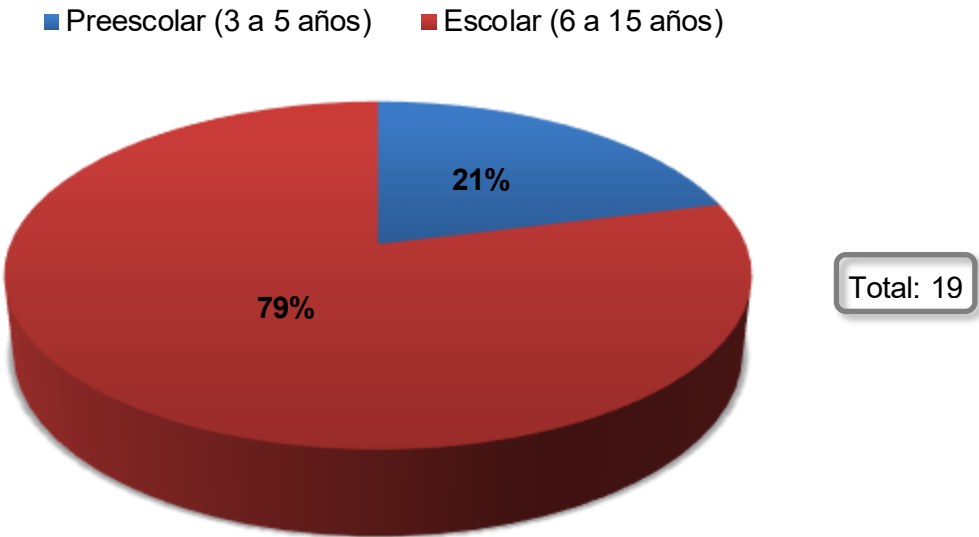


Figura 22. Distribución por grupos etarios.

En cuanto a la procedencia de los pacientes, el 48% (9) viven en la ciudad de Morelia, mientras que el 52% (10) son foráneos, correspondiendo 11% (2) al municipio de Charo y 41% (8) a otros municipios (Figura 23).

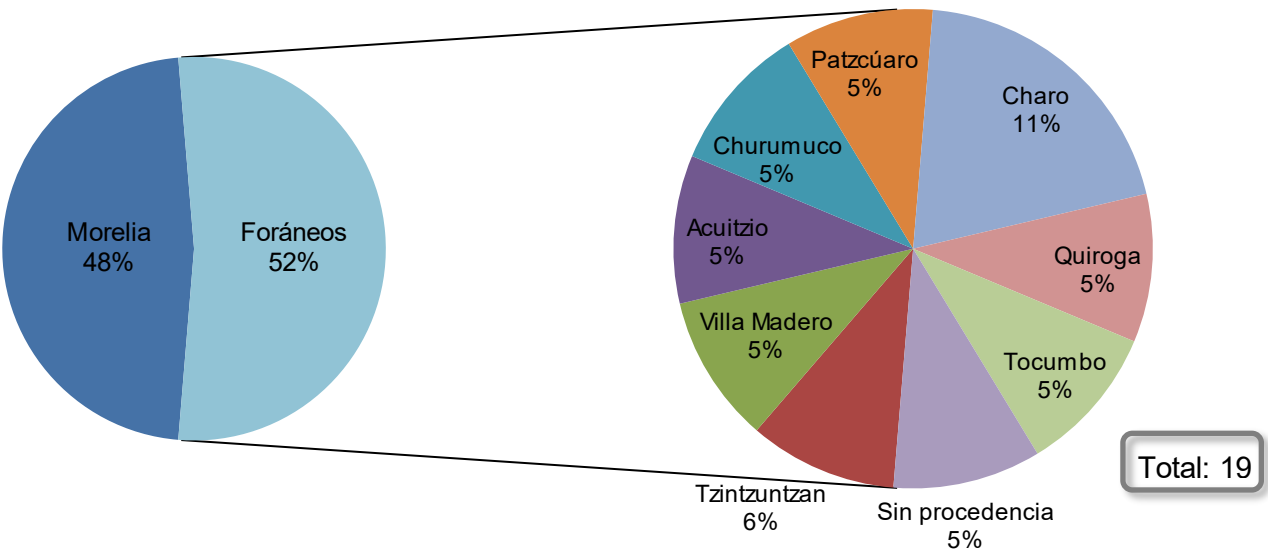


Figura 23. Procedencia de los niños con blastocistosis.

Al realizar la subtipificación de *Blastocystis* se encontró que el subtipo más frecuentemente encontrado en la ciudad de Morelia es el ST3 (66.7%), y en los otros municipios los ST1 (57.2%) y ST2 (66.7%) (Tabla 2).

Procedencia	<i>Blastocystis</i> (ST)		
	ST1	ST2	ST3
Morelia	33.3%	22.2%	44.5%
Foráneos	33.3%	44.5%	22.2%

Tabla 2. Asociación del subtipo (ST) de *Blastocystis* con la procedencia.

Al analizar los síntomas de los participantes, se observó que el síntoma mayormente reportado en los niños con blastocistosis fueron las flatulencias (84.2%), seguido del dolor abdominal (68.4%) y el dolor de cabeza (47.4%); sin embargo, estos no mostraron una asociación estadísticamente significativa ($X^2= 3.85$, $v= 1$, $p 0.05$) ((Tabla 3).

Síntoma	% de niños	X^2 calculada
Flatulencias	84.2%	0.62
Dolor Abdominal	68.4%	0.46
Dolor de Cabeza	47.4%	0.75
Distensión Abdominal	42.1%	0.71
Estreñimiento	42.1%	0.13
Mareo	42.1%	0.43
Heces Blandas	36.8%	0.03
Prurito Anal	36.8%	0.66
Bruxismo	26.3%	0.98
Náuseas	26.3%	0.72
Anorexia	10.5%	0.83
Fiebre	10.5%	0.52
Vómito	10.5%	0.20
Angioderma	5.3%	0.26
Hiporexia	5.3%	0.07
Urticaria	5.3%	0.26
Aumento de Apetito	0%	0.35
Bajo Peso	0%	0.35

Tabla 3. Sintomatología de pacientes con *Blastocystis*.

Donde la edificación de la casa con material austero fue el factor de riesgo mayormente asociado (RR=2.14), seguido del consumo de agua no purificada (RR=1.97) y tener baño sin drenaje (RR=1.11), sin embargo, ninguno tuvo diferencia estadísticamente significativa ($X^2= 3.85$, $v= 1$, $p 0.05$) (Tabla 4).

Factor de Riesgo	Riesgo Relativo (RR)	Chi-Cuadrada (X^2)
Edificación de Casa con Material Austero	2.14	0.04
Consumo de Agua No Purificada	1.97	0.09
Baño Sin Drenaje	1.11	0.84
Muerde Uñas/Chupa Manos	0.99	0.98
Consumo de Alimentos Fuera de Casa	0.97	0.93
No Lavado de Manos	0.93	0.88
Antecedente de Arrojar Lombrices	0.79	0.62
Contacto con Animales	0.76	0.45
Grado de Estudio de Padre o Tutor (Primaria o Analfabeta)	0.75	0.49
No Lavado de Frutas y Verduras	0	0

Tabla 4. Factores de riesgo asociados a la blastocistosis.

II. Diagnóstico por microscopía de luz

De las 19 muestras positivas a *Blastocystis*, la forma más frecuente encontrada fue la vacuolar y sus diferentes variantes (89.4%) seguida de la quística (31.5%), encontrando en 10 muestras (52.6%) menos de 5 formas parasitarias por campo (Tabla 5) (Figura 24).

Forma de <i>Blastocystis</i>	% Muestras
Vacuolar (Avacuolar, Multivacuolar, División Binaria)	89.4%
Quiste	31.5%
Granular	10.5%
Ameboide	0%

Tabla 5. Formas encontradas de *Blastocystis*.

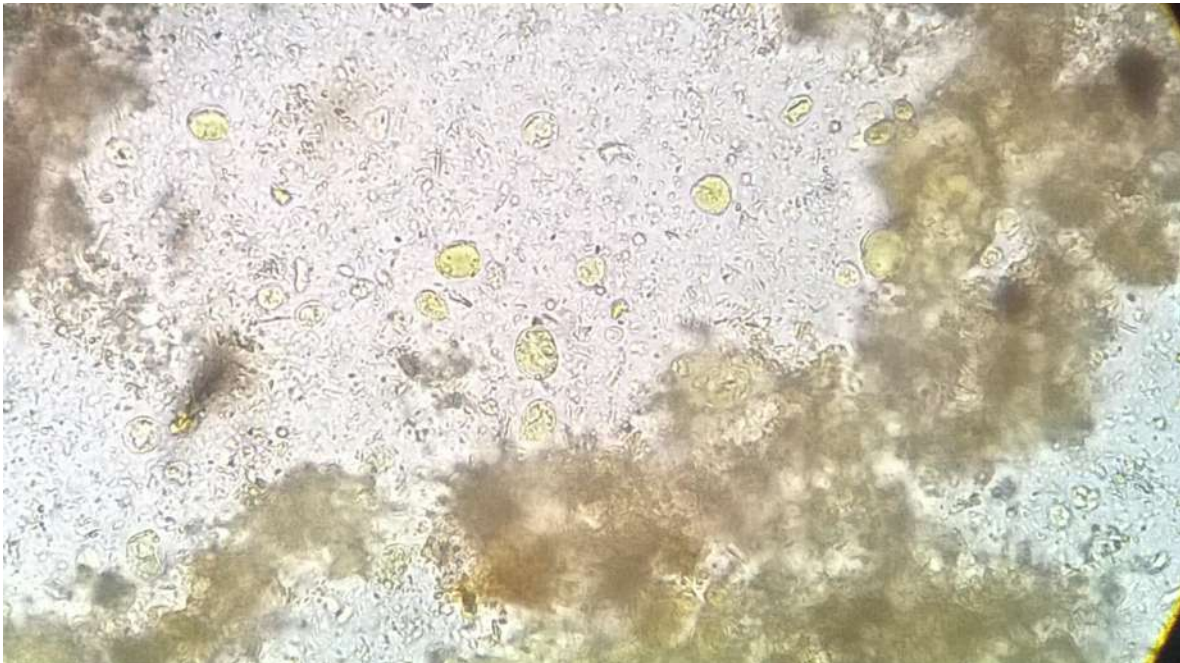


Figura 24. Observación por microscopía de luz, campo a 40X, muestra HIM06 procesada por técnica de concentración por sedimentación por el método de Ritchie o Formol-Éter, se puede observar a *Blastocystis* en su forma vacuolar, avacuolar y quistes ovalados.

III. Confirmación del diagnóstico de *Blastocystis* por PCR en punto final

Las 42 muestras utilizadas en el presente estudio se conservaron en etanol al 70% en un volumen equivalente 1:2 y almacenadas en refrigeración. Se realizó la extracción del DNA de las muestras con una concentración promedio de 122.468ng/μl. Previamente se corroboró la integridad del DNA llevándolo a través del corrimiento por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 25).

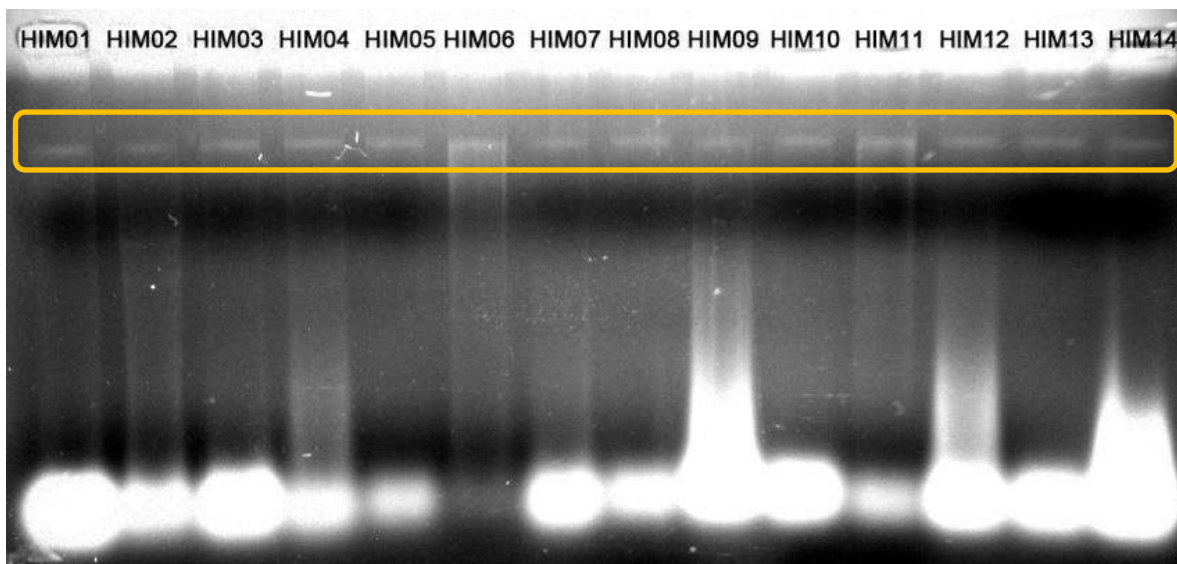


Figura 25. Integridad de DNA. Gel agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. PM: peso molecular, HIM01-HIM14 muestras a analizar. El recuadro amarillo muestra las bandas que corresponden al DNA genómico total.

Para el diagnóstico por PCR en punto final para la amplificación del SSU rDNA de *Blastocystis* se utilizaron los oligonucleótidos de SANTIN et al. 2011. La amplificación del fragmento es de 500 (479) pb, conteniendo una región variable que permite subtipificar los especímenes de *Blastocystis*.

Las 42 muestras se sometieron a PCR en punto final. Los productos post-reacción se analizaron en gel de agarosa al 1.5%, obteniéndose 19 muestras positivas a *Blastocystis* y 23 negativas (Figura 26).

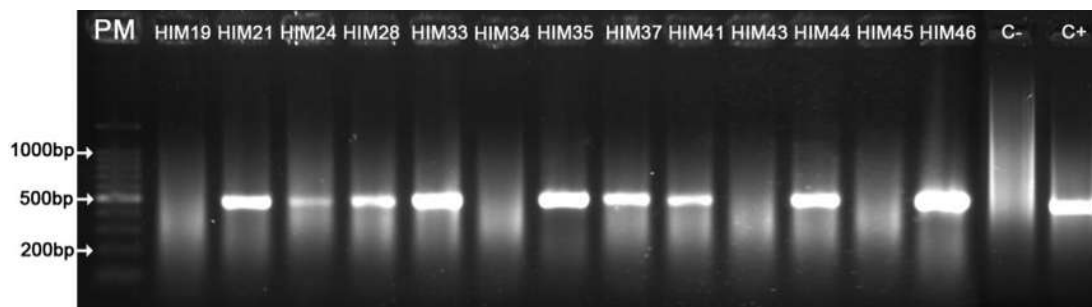


Figura 26. Amplicón 500 (479) pb para *Blastocystis*. Gel agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. PM: peso molecular; HIM21, HIM24, HIM28, HIM33, HIM35, HIM37, HIM41, HIM44, HIM46 muestras positivas a *Blastocystis* observándose una banda de aproximadamente 500 pb; HIM19, HIM34, HIM43, HIM45 muestras negativas a *Blastocystis*; C- control negativo y C+ control positivo.

Las muestras positivas se duplicaron en otro ensayo más para obtener un total de 100 µl, los cuales se utilizaron para realizar la purificación de los amplicones obtenidos, para lo cual se utilizó el kit de purificación GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences, UK). Obteniéndose un volumen de 15 µl de cada muestra con diferentes concentraciones (Tabla 6), además cargando 2 µl del purificado obtenido en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para corroborar la pureza del amplicon (Figura 27).

Primer	Muestra	[ng/µl]
SANTIN FORWARD Blast 505–532 (5' GGA GGT AGT GAC AAT AAATC 3') REVERSE Blast 998–1017 (5' TGC TTT CGC ACT TGT TCATC 3') Annealing temperature: 54°C	HIM01	271.4
	HIM02	154.0
	HIM04	100.139
	HIM05	52.588
	HIM06	92.321
	HIM07	86.37
	HIM09	60.596
	HIM11	73.936
	HIM13	148.0
	HIM14	59.06
	HIM15	110.4
	HIM21	92.067
	HIM28	96.9
	HIM33	123.671
	HIM35	116.209
	HIM41	101.104
	HIM45	135.533
	HIM46	88.038
	HIM47	115.5

Tabla 6. Concentración de amplicones (ng/µl) de las muestras purificadas positivas a *Blastocystis*.

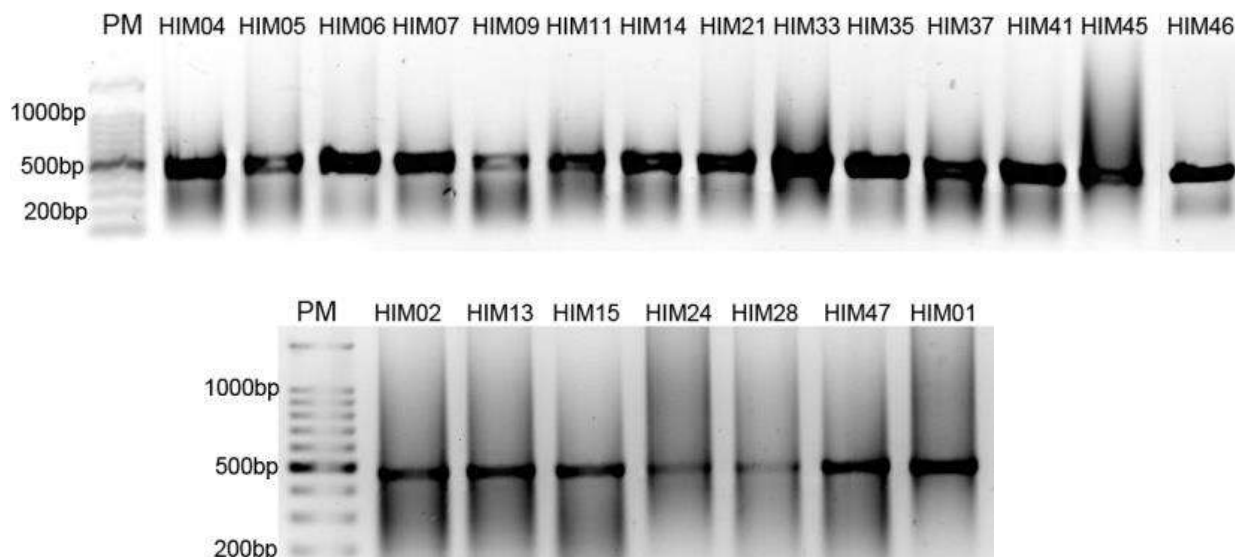


Figura 27. Amplicón 500 (479) pb para *Blastocystis* purificado. Gel agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. PM: peso molecular; HIM04 a HIM01 productos de PCR purificados.

Posteriormente, una vez purificados los productos, estos fueron secuenciados en ambos sentidos en la Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Laboratorio de secuenciación genómica de la biodiversidad y de la salud.

Obtenidas las secuencias nucleotídicas (electroferograma), estas fueron analizadas, editadas y alineadas con los programas BioEdit Sequence Alignment Editor (Copyright© 1997-2015 Tom Hall) y MEGA Version 7.0.26.

Todas las secuencias fueron llevadas a un análisis BLAST en la base de datos GenBank para confirmar que corresponden al gen 18S de *Blastocystis*, además de conocer el subtipo (ST) del parásito en estudio, teniendo gran porcentaje de similitud con secuencias ya reportadas en GenBank para *Blastocystis* (Figuras 28-29).

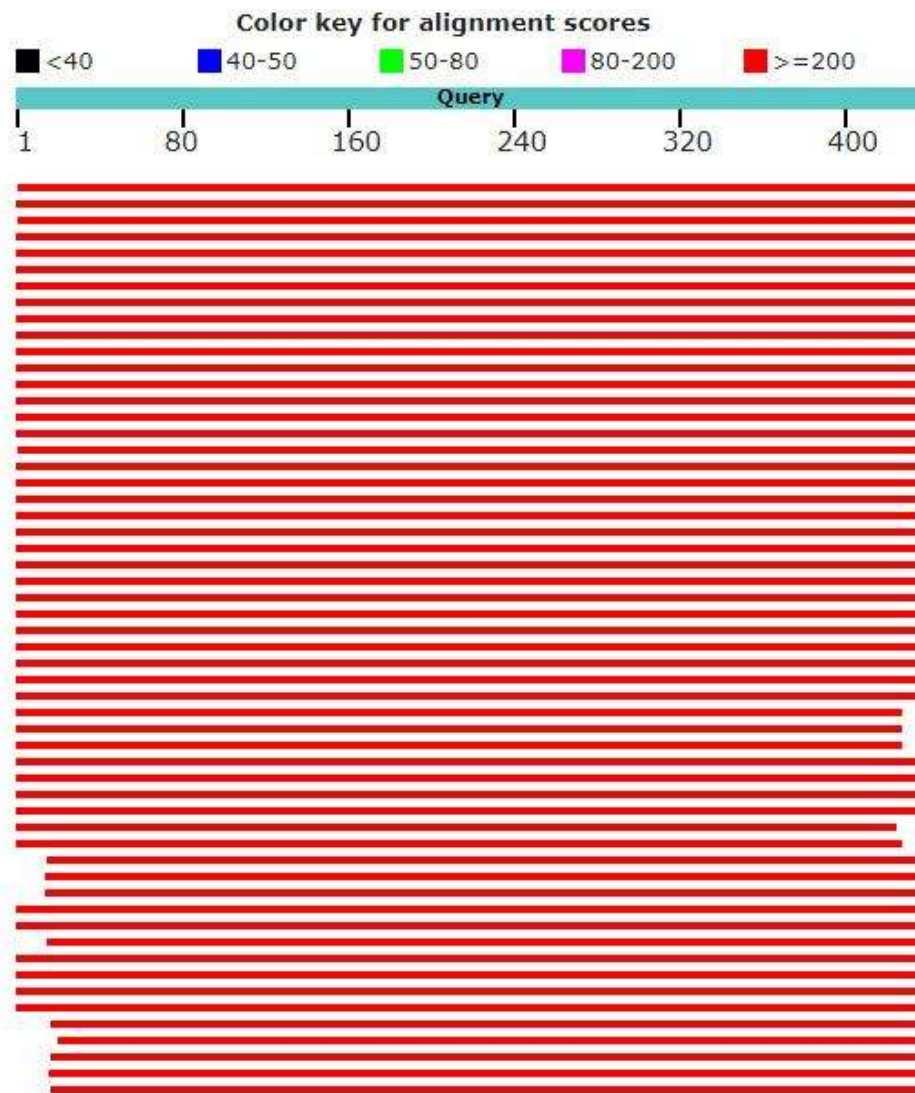


Figura 28. Resumen gráfico. Distribución de los 100 mejores resultados mejor posicionados de 100 diferentes secuencias similares. Alineamiento de la secuencia de la muestra HIM01 la cual coincide diferentes secuencias de *Blastocystis* almacenadas en GenBank.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Uncultured Blastocystis partial 18S rRNA gene, isolate TYRK112 BHCReseq3	793	793	99%	0.0	99%	AM779050.1
☐	Blastocystis sp. subtype 2 strain 042HC 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	789	789	100%	0.0	99%	KU147355.1
☐	Uncultured Blastocystis partial 18S rRNA gene, isolate TYRK88 BHCReseq3	787	787	99%	0.0	99%	AM779052.1
☐	Blastocystis sp. isolate 146 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	KX524043.1
☐	Blastocystis sp. isolate 148 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	KX524042.1
☐	Blastocystis sp. isolate 230 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	KX524027.1
☐	Blastocystis sp. isolate 371 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	KX524022.1
☐	Blastocystis sp. isolate 52 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	KX524013.1
☐	Blastocystis sp. isolate 53 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	KX524010.1
☐	Blastocystis sp. isolate 634 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	KX523999.1
☐	Blastocystis sp. isolate 86 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	KX523977.1
☐	Blastocystis sp. subtype 2 isolate BhKML10 ST2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	KX358437.1
☐	Blastocystis sp. subtype 2 strain 089CA 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	KU147360.1
☐	Blastocystis sp. subtype 2 strain 068UA 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	KU147358.1
☐	Blastocystis sp. subtype 2 strain 012HC 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	KU147354.1
☐	Blastocystis sp. H-7 clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	784	784	100%	0.0	99%	HQ641599.1
☐	Uncultured Blastocystis partial 18S rRNA gene, isolate TYRK66 BHCReseq3	782	782	99%	0.0	99%	AM779049.1
☐	Blastocystis sp. isolate 228 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	778	778	100%	0.0	98%	KX524029.1
☐	Blastocystis sp. isolate 350 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	778	778	100%	0.0	98%	KX524025.1
☐	Blastocystis sp. isolate 629 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	778	778	100%	0.0	98%	KX524001.1
☐	Blastocystis sp. subtype 2 strain 044IC 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	778	778	99%	0.0	99%	KU147356.1

Figura 29. Descripción. Secuencias que coinciden en alineamiento significativo. Muestra HIM01 la cual coincide con varios aislamientos de *Blastocystis*, además de conocer el subtipo (ST) con el que coincide el alineamiento, en este caso ST2. *Max score*: puntuación de alineación máxima de la base de datos para dicha secuencia. *Total score*: puntuación de alineación total de todos los segmentos. *Query cover*: porcentaje de consulta que coincide por alineamiento de la base de datos de secuencias. *E value*: valor más bajo de la secuencia con respecto a la base de datos de secuencias. *Identity*: porcentaje de identidad más alto con respecto a las secuencias de la base de datos. *Accession*: clave de acceso a la secuencia.

Con base en los estudios realizados de biología molecular y genética en *Blastocystis*, se encontró que el ST1 (36.80%) fue el que tuvo mayor prevalencia en la comunidad del Hospital Infantil de Morelia (Figura 30).

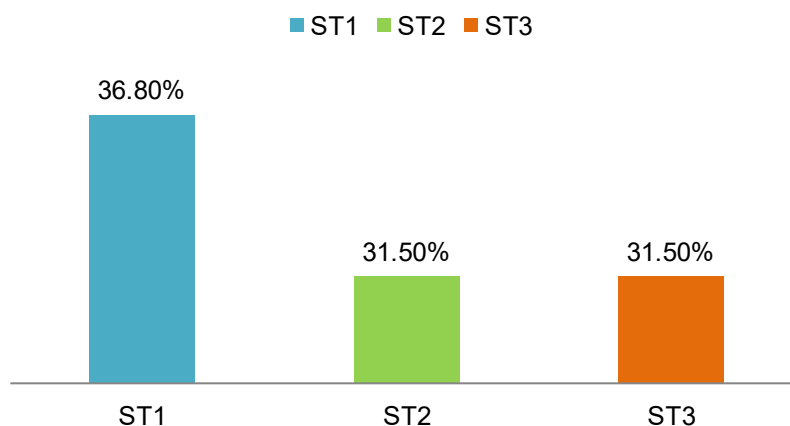


Figura 30. Subtipos de *Blastocystis*, porcentajes obtenidos en este estudio.

Algunas secuencias nucleotídicas obtenidas en este estudio, así como otras tomadas de la base de datos de *GenBank* como referencia de todos los subtipos reportados para *Blastocystis* (Tabla 7), se utilizaron para realizar un análisis filogenético con el programa MEGA Versión 7.0.26. Se construyó un árbol de Neighbor-Joining con base en un modelo de Jukes-Cantor, estableciendo los valores de *bootstrap* en la base de las ramas principales (Figura 31).

Blastocystis Subtipo (ST)	N. Acceso	Hospedero	País	Referencia
ST1	HQ641595.1	Humano	Colombia	Santin M. et al 2011
ST2	HQ641602.1	Humano	Colombia	Santin M. et al 2011
	HQ641654.1	<i>Gorilla gorilla</i>	España	Santin M. et al 2011
ST3	JX305883.1	Humano	Tailandia	Mori H. et al 2012
	HQ641613.1	Humano	Colombia	Santin M. et al 2011
	HQ641611.1	Humano	Colombia	Santin M. et al 2011
ST4	HQ641652.1	<i>Lemur catta</i>	España	Santin M. et al 2011
	HQ641621.1	Humano	España	Santin M. et al 2011
ST5	HQ641635.1	Cerdo	USA	Santin M. et al 2011
ST6	JQ665849.1	Humano	Tailandia	Thathaisong U. et al 2013
	HQ641659.1	Pollo	España	Santin M. et al 2011
ST7	HQ641661.1	Pollo	España	Santin M. et al 2011
	HQ641660.1	Pollo	España	Santin M. et al 2011
ST8	AB107971.1	Humano	Tailandia	Thathaisong U. et al 2013
ST9	AF408425.2	Humano	Japón	Yoshikawa H. et al 2004
ST10	HQ641627.1	Vaca	USA	Santin M. et al 2011
ST11	GU256900.1	Elefante	Australia	Parkar U. et al 2010
	GU256907.1	Elefante	Bélgica	Parkar U. et al 2010
ST12	GU256905.1	Jirafa	Australia	Parkar U. et al 2010
ST13	GU256934.1	Quokka	Australia	Parkar U. et al 2010
ST14	JQ996361.1	Vaca	USA	Fayer R. et al 2012
ST15	KC148211.1	Gibón	UK	Alfellani M.A. et al 2013
ST17	KC148208.1	Gundi	Libia	Alfellani M.A. et al 2013

Tabla 7. Secuencias obtenidas de *Gen Bank* con las cuales se compararon las obtenidas en este estudio.

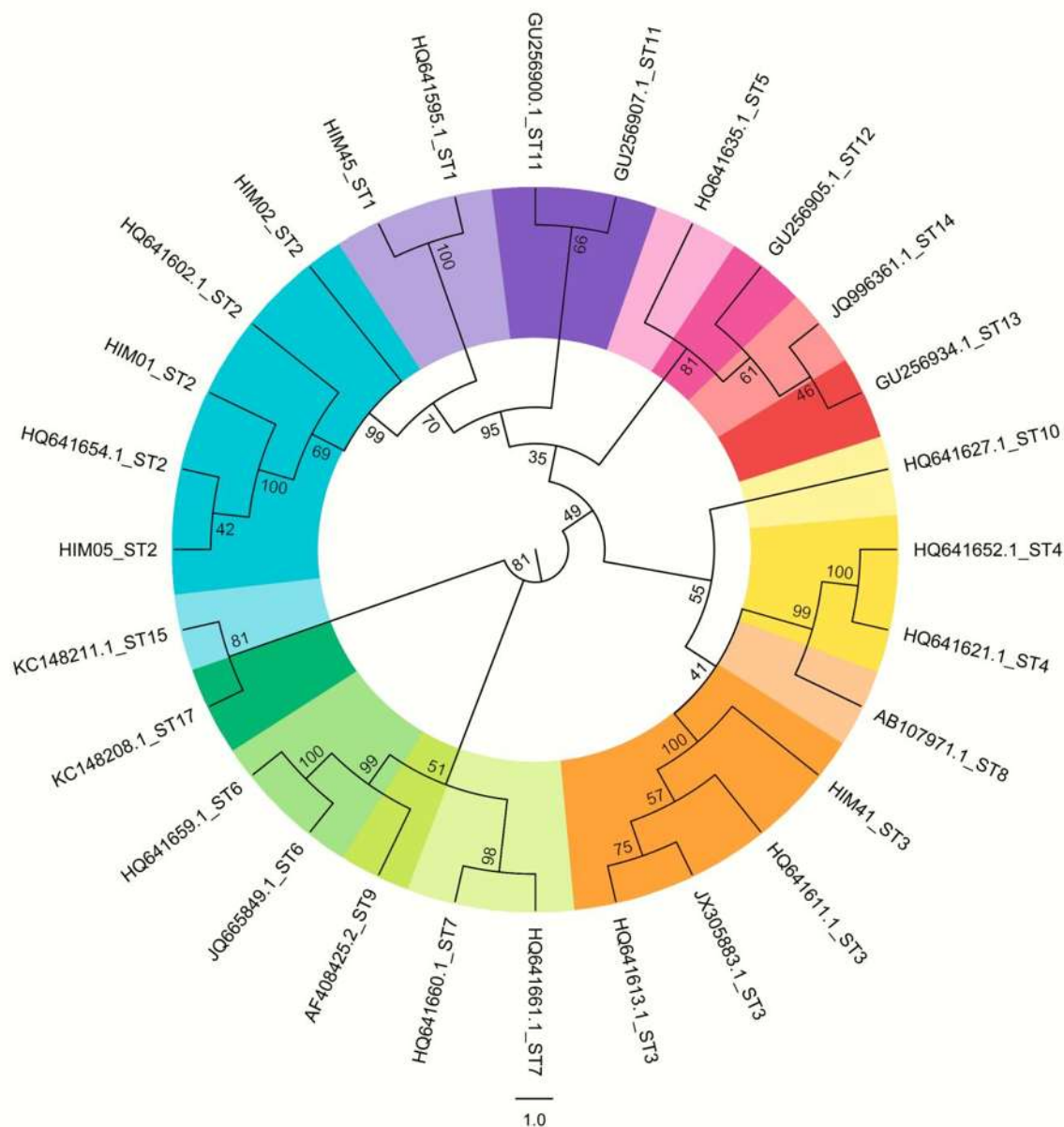


Figura 31. Árbol filogenético para *Blastocystis* y sus 17 STs, en el cual se comparan secuencias de *Gen Bank* con las más representativas obtenidas en este estudio.

IV. Estandarización del método de Amplificación Isotérmica Basada en Horquillas (LAMP) para el diagnóstico de *Blastocystis*

En este estudio, y para conocer más sobre la estandarización de LAMP, se realizó una recopilación de diferentes ensayos ya publicados en los cuales se estandarizó el método LAMP en diferentes parásitos para conocer concentraciones de reactivos que determinaron las condiciones óptimas para la reacción como lo es de *primers*, enzima polimerasa y sulfato de magnesio, así como de los diferentes *enhancer* aplicados. Además de las condiciones de temperatura, ya que es una reacción isotérmica, y el tiempo para conocer desde que momento se obtiene producto de amplificación (Tabla 8).

Parásito	Primers			dNTPs	MgSO ₄	Bst	Enhancer	Temperatura	Tiempo
	F3/B3	FIP/BIP	FL/BL						
<i>Ascaris lumbricoides</i> ⁵³	1	6	-			8U Bsm		63°C	45min
<i>Cryptosporidium spp.</i> ⁵⁴	5pmol	40pmol	20pmol	2.8mM	16mM	8U	Betaína 1.6M	63°C	60min
<i>Entamoeba histolytica</i> ⁵⁵	20pmol	48pmol	24pmol		3.5mM	8U	Betaína 0.8M	63°C	60min
<i>Fasciola hepatica</i> ⁵⁶	20pmol	160pmol	-	1.4mM	8mM	8U	Betaína 1M	63°C	60min
<i>Giardia lamblia</i> ⁵⁷	20pmol	160pmol	80pmol	2.5mM	8mM	8U	Betaína 1.6M	63°C	60min
<i>Leishmania donovani</i> ⁵⁸	5pmol	40pmol	-	1.4mM	8mM	8U	Betaína 0.8M	62°C	60min
<i>Naegleria fowleri</i> ⁵⁹	20pmol	160pmol	80pmol	1.4mM	8mM	8U	Betaína 0.8M	64°C	60min
<i>Necator americanus</i> ⁶⁰	5pmol	40pmol	-			1U		63°C	60min
<i>Plasmodium falciparum</i> ⁶¹	20pmol	355pmol	178pmol	1.25mM	8mM	8U		65°C	40min
<i>Strongyloides stercoralis</i> ⁶²	5pmol	40pmol	20pmol	1.4mM	8mM	8U	Betaína 0.8M BSA 1% PVP 1%	60°C	60min
<i>Taenia spp.</i> ⁶³	5pmol	40pmol	-	1.4mM	8mM	8U	Betaína 0.8M	60°C	60min
<i>Toxoplasma gondii</i> ⁶⁴	5pmol	40pmol	-	1.4mM	8mM	8U	Betaína 0.8M	65°C	60min
<i>Trypanosoma brucei</i> ⁶⁵	5pmol	40pmol	-	1.4mM	8mM	8U	Betaína 0.8M	65°C	60min

Tabla 8. Recopilación de datos de estandarización del método LAMP en diferentes parásitos.

Para definir el protocolo final, además, se siguió también el protocolo sugerido en el inserto de la enzima polimerasa *Bacillus stearothermophilus* (Bst), que es la que se utilizó para la estandarización de LAMP en *Blastocystis* (Tabla 9).

Typical LAMP Protocol (M0275)⁶⁶

Reactivo (Concentración inicial)	Reacción a 25 µl	Concentración final
ThermoPol Buffer 10X	2.5 µl	1X (contiene 2 mM MgSO ₄)
MgSO ₄ (100 mM)	1.5 µl	6 mM (8 mM total)
dNTP Mix (10 mM)	3.5 µl	1.4 mM
Primers FIP/BIP (25X)	1 µl	1.6 µM
Primers F3/B3 (25X)	1 µl	0.2 µM
Primers Loop F/B (25X)	1 µl	0.4 µM
DNA Polimerasa Bst (8,000U/ml)	1 µl	320 U/ml
Muestra de DNA	Variable	>10 copias o más
H ₂ O libre de nucleasas	c.b.p. 25 µl	

Tabla 9. Protocolo sugerido por New England Biolabs®.

En base a los datos recopilados (Tabla 8) y al protocolo sugerido (Tabla 9) se formuló el siguiente protocolo para iniciar la estandarización del método LAMP en *Blastocystis*.

Preparar la siguiente reacción en un volumen total de 25 µl.

Reactivo (Concentración inicial)	Reacción a 25 µl	Concentración final
ThermoPol Buffer 10X	2.5 µl	1X (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 mM KCl, 2 mM MgSO ₄ , 0.1% Tween® 20, pH 8.8 @ 25°C)
MgSO ₄ (100 mM)	1.5 µl	6 mM (8 mM total)
Albúmina Sérica Bovina 1% (0.1g)	1 µl	4mg
Betaina 1M	1 µl	0.04 M
dNTP Mix (10X)	3.5 µl	1X
Primers FIP/BIP (25X)	1 µl	1X
Primers F3/B3 (25X)	1 µl	1X
DNA Polimerasa Bst (8U/µL)	1 µl	0.32 U/µl
Muestra de DNA (5-500ng/ µl)	2 µl	0.2-20ng/ µl
H ₂ O libre de nucleasas	c.b.p. 25 µl	

Incubar la reacción a 60°C por 60 minutos, después a 80°C por 10 minutos para desnaturalizar la enzima polimerasa y así finalizar la reacción. Observar los productos

obtenidos de la reacción por electroforesis en gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 µl/10ml TAE) por 45 minutos a 100 mA y 100 V.

IV.1 Primers Barcoding, ITS 432 e ITS 522.

Para la amplificación del SSU rDNA de *Blastocystis* se diseñaron los *primers* interiores (FIP/BIP) únicamente, los exteriores (F3/B3) se tomaron de ensayos de PCR en punto final ya publicados, para dos regiones, en el gen 18S que es *Barcoding*²¹ en un segmento de aproximadamente 628 pb y los *Internal Transcribed Spacers* (ITS)¹⁹ en segmentos de diferentes longitudes 432 pb y 522 pb.

- *Barcoding*

FIP 5' (CGC GTA AAT TAC CCA ATC CTT TTC CAG ATT GCC CTC CAA T) 3'

F3 5' (ATC TGG TTG ATC CTG CCA GT) 3'

BIP 5' (CTA GAA TTA CTA CGG TTA TCC ATT TTACCGAAT TAC AAA CTC TGC TG) 3'

B3 5' (GAG CTT TTT AAC TGC AAC AAC G) 3'

- *Internal Transcribed Spacers* (ITS) 432 pb.

FIP 5' (CAC TTC CTT TGG GAG TAT ACT TTT AGA ACC GAT TAC CAA TAC TCA AAC) 3'

F3 5' (CAG CAG GTC TTC TTR CTT GA) 3'

BIP 5' (GCA TTT CGC TGC GTT CTT CTT TTC GAT GGA TAT CTT GGC TCT TG) 3'

B3 5' (GGA AGG TGA AGT CGT AAC AAG) 3'

- *Internal Transcribed Spacers* (ITS) 522 pb.

FIP 5' (TGA GTC ATC AAA TCT TTG AAC GCT TTT GTATAC TCC CAA AGG AAG TG) 3'

F3 5' (CAG CAG GTC TTC TTR CTT GA) 3'

BIP 5' (CAA GAG CCA AGA TAC CAT CGT TTT GGA AGG TGA AGT CGT AAC AAG) 3'

B3 5' (GGA AGG TGA AGT CGT AAC AAG) 3'

Región	Primer		Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	%GC	Total pb
Barcoding	FIP	F1c	CGCGTAAATTACCCAATCCTT	53	43	40
		F2	TTCCAGATTGCCCTCCAAT	52	47	
	BIP	B1c	CTAGAATTACTACGGTTATCCATT	49	33	47
		B2	TTACCGAATTACAACTCTGCTG	53	39	
	F3		ATCTGGTTGATCCTGCCAGT	55	50	20
	B3		GAGCTTTTTAACTGCAACAACG	53	41	22
ITS 432	FIP	F1c	CACTTCCTTTGGGAGTATACTT	51	41	48
		F2	TTAGAACCGATTACCAATACTCAAAC	53	35	
	BIP	B1c	GCATTTGCTGCGTTCTTCTT	56	48	44
		B2	TTGATGGATATCTTGGCTCTTG	54	43	
	F3		CAGCAGGTCTTCTTRCTTGA	51	47	20
	B3		GGAAGGTGAAGTCGTAACAAG	53	48	21
ITS 522	FIP	F1c	TGAGTCATCAAATCTTTGAACGCTT	55	36	47
		F2	TTGTATACTCCCAAAGGAAGTG	51	41	
	BIP	B1c	CAAGAGCCAAGATACCATCGTT	54	45	45
		B2	TTGGAAGGTGAAGTCGTAACAAG	55	43	
	F3		CAGCAGGTCTTCTTRCTTGA	51	47	20
	B3		GGAAGGTGAAGTCGTAACAAG	53	48	21

Tabla 10. *Primers* y características de su diseño.

IV.I.I Determinación de la concentración de *primers*.

La concentración de *primers* es decisiva para este tipo de reacción, por lo que se optó por iniciar determinando esta, además de incluir dos de los *enhancer* más utilizados en el método LAMP, BSA 1% y Betaína 1M.

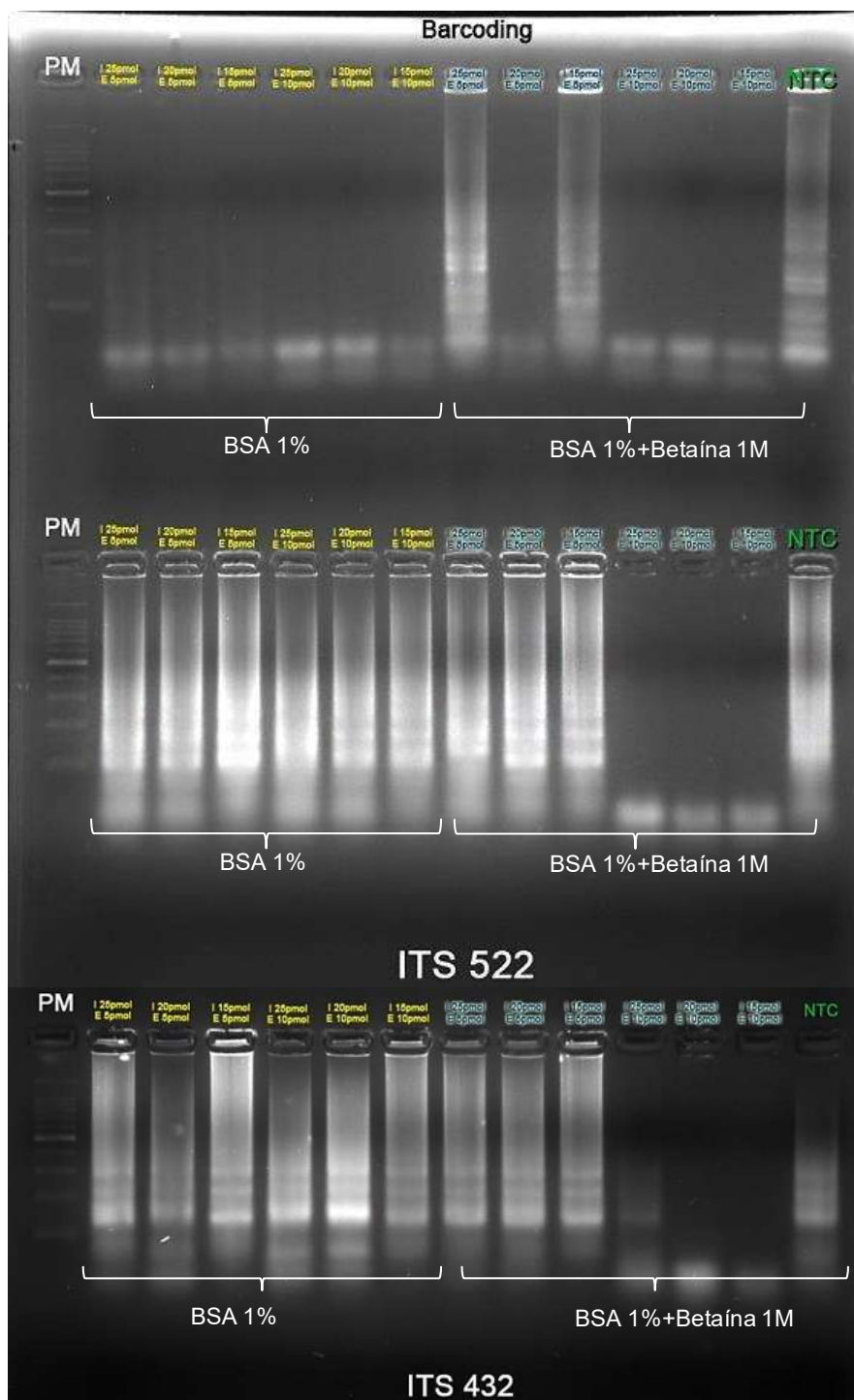


Figura 32. Amplificación *primers* Barcoding, ITS 522 e ITS 432. Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 µl/10ml TAE) bajo luz UV.

Las concentraciones de *primers* son, en general, muy bajas por lo que se observó bandas apenas visibles. En cuanto al uso de *enhancers* no se mostró en este ensayo gran diferencia entre estos. Por lo cual se sugiere aumentar la concentración de *primers* para ajustar y obtener bandas más definidas. Utilizar ambos *enhancer*, debido al origen del espécimen que se realizó la extracción del DNA, la BSA ayudará a precipitar algunos inhibidores de la reacción y la Betaína hará gran diferencia al momento de alineamiento de los *primers* en la hebra de DNA.

IV.I.II Incremento en la concentración de *primers* y temperatura.

El aumento tanto de la concentración de *primers* como de la temperatura a 63°C llevó a la reacción a ser más astringente, se cuidó el límite de temperatura para que la enzima polimerasa trabajara aún bajo condiciones considerables para ella.

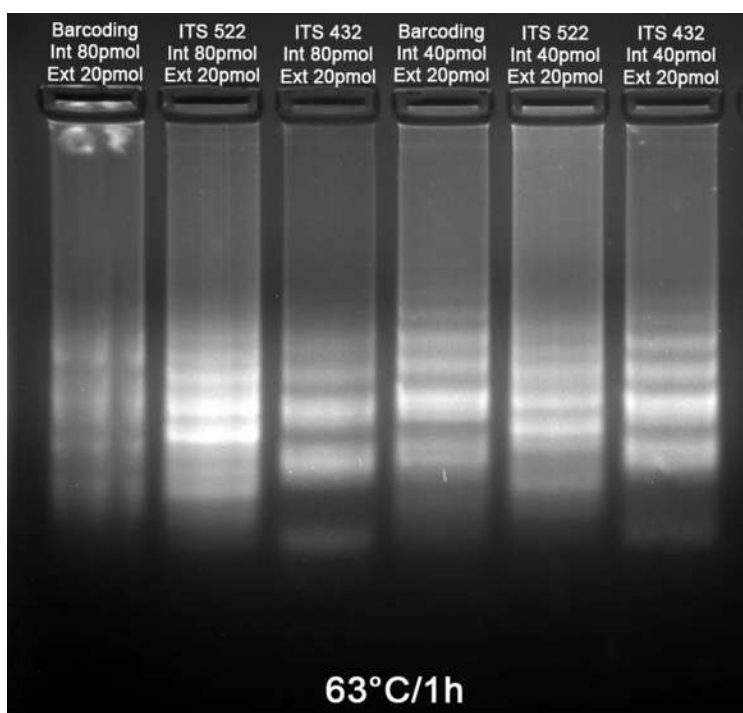


Figura 33. Amplificación de gradiente de *primers* Barcoding, ITS 522 e ITS 432. Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 µl/10ml TAE) bajo luz UV.

Se observó una mejor amplificación con una concentración de *primers* interiores a 40 pmol y exteriores a 20 pmol, además una temperatura de 63°C la cual favoreció a la reacción. Por lo tanto, se decide trabajar con una concentración de *primers* interiores de 40 pmol y exteriores 20 pmol para evitar dímeros de primer y además no saturar el sistema. 63°C se determina como la temperatura con la cual seguir ensayando.

IV.I.III Estandarización de control positivo, negativo y *Non Template Control*.

El control positivo, negativo y *Non Template Control* (NTC) son de suma importancia al realizar una estandarización, ya que con ellos se demuestra la auténtica validez y confianza de la reacción.

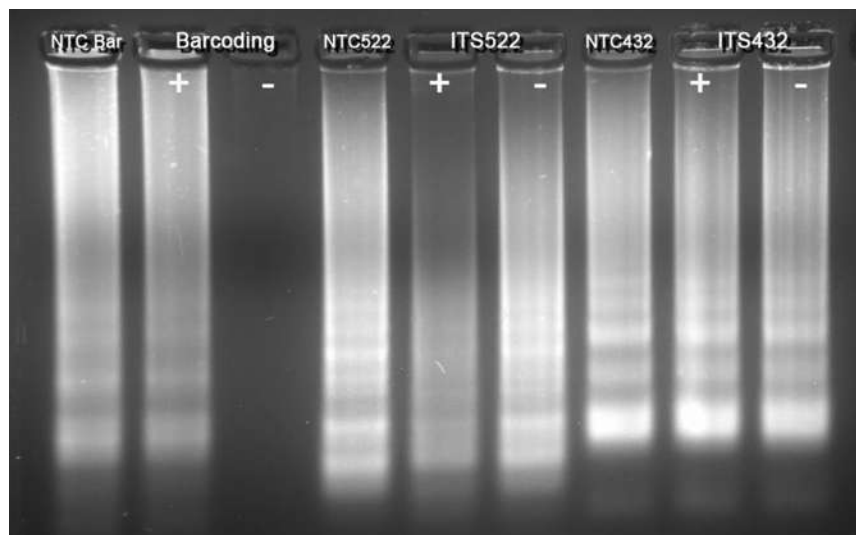


Figura 34. Amplificación *primers Barcoding*, *ITS 522* e *ITS 432* en control positivo, negativo y *No Template Control* (NTC). Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 μ l/10ml TAE) bajo luz UV.

Se observó la amplificación de NTC, control positivo y control negativo, a excepción del control negativo con *primers* para *Barcoding*. Las posibles causas de los resultados obtenidos podrían deberse a: contaminación, aun con las mejores condiciones para preparar la reacción la contaminación pudo ocurrir, el tipo de sistema que tiene la reacción la hace mucho más sensible; dímeros de primer, por la gran cantidad de *primers* en el sistema así como su alta concentración es mucho más fácil que se creen productos inespecíficos, además por ser una reacción a una temperatura constante, que si apenas es un par de °C más alta que la T_m de los *primers*, por lo cual es más factible que estos se unan.

IV.I.IV Estandarización de la temperatura.

La enzima polimerasa *Bst*, trabaja óptimamente a una temperatura de entre 60 a 65°C, con un límite de hasta los 70°C pero no recomendado.

Se ensayó únicamente con los *primers ITS 432* y control positivo en una curva de temperatura de entre 63 a 70°C.

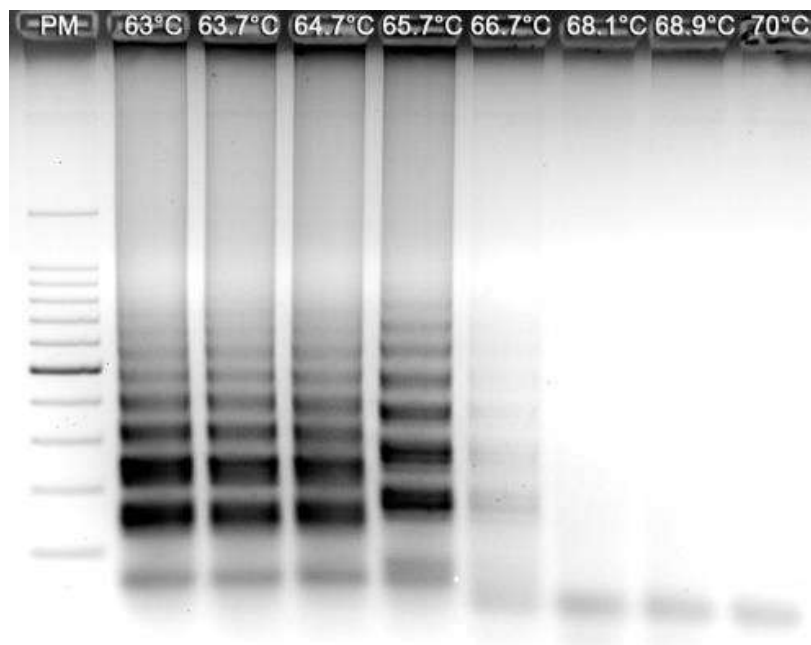


Figura 35. Amplificación *primers ITS 432* en curva de temperatura. Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 µl/10ml TAE) bajo luz UV.

Entre los 63 y 66°C se observó que existe una óptima amplificación, aproximadamente arriba de los 67°C el sistema ya no amplificará, por lo cual se consideró llevar la reacción a 65°C, ya que además es la temperatura máxima a la cual la enzima polimerasa desempeña mejor su función de helicasa.

IV.I.V Estandarización de control positivo y negativo.

Realizada la curva de temperatura, se llevó a reacción el control positivo y negativo a 65°C por 60 minutos, utilizando todos los juegos de *primers*.

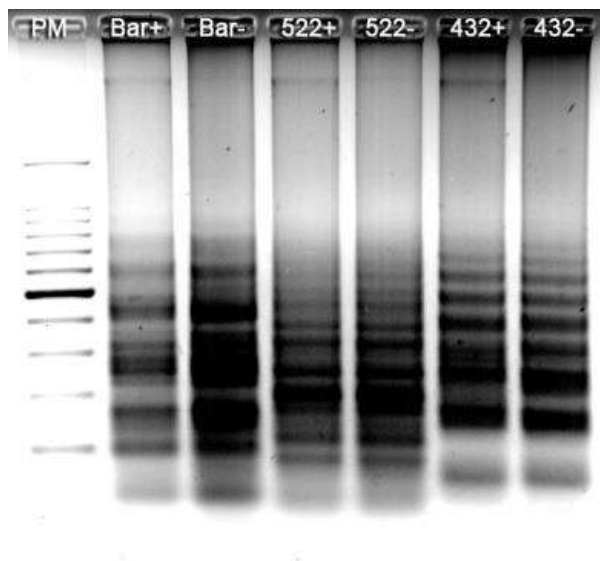


Figura 36. Amplificación *primers* *Barcoding*, *ITS* 522 e *ITS* 432 en control positivo y negativo. Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 µl/10ml TAE) bajo luz UV.

Se obtuvo amplificado tanto de control positivo como negativo en los 3 sets de *primers* (*Barcoding*, *ITS* 522 e *ITS* 432). Por lo cual se determinará el tiempo de la reacción, ya que a un tiempo más prolongado es más factible que se produzcan productos inespecíficos.

IV.I.VI Estandarización del tiempo de reacción.

Se realizó una curva de tiempo, llevando la reacción a 10, 15, 30, 45, 60 minutos a 65°C utilizando solo *primers ITS 432*.

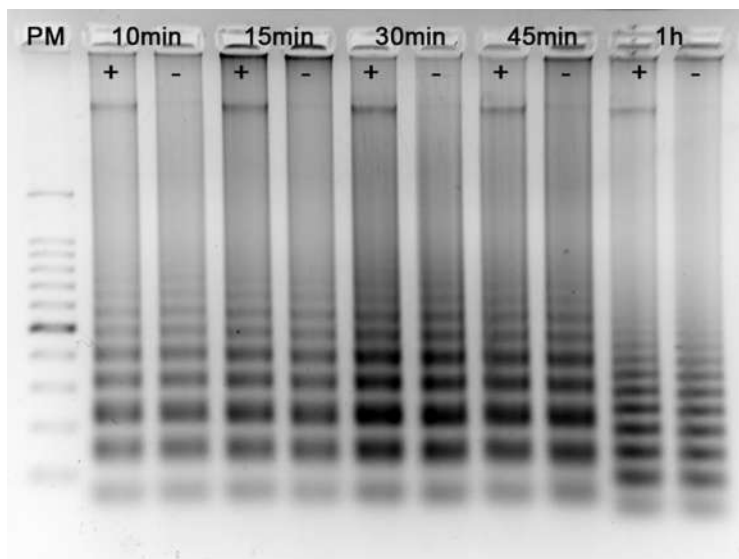


Figura 37. Amplificación *primers ITS 432* en curva de tiempo. Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 µl/10ml TAE) bajo luz UV.

Se obtuvo amplificado tanto de control positivo como negativo en todos los tiempos a los que se llevó la reacción. De acuerdo con las características con las que deben de ser diseñados y deben cumplir los *primers* para un sistema LAMP, se conocía que los utilizados en este protocolo no cumplen con algunas de estas características, una de mayor importancia es el diseño de los *primers* en un segmento de entre 200 y 180 pb, por lo cual se decide nuevamente diseñar los *primers*, tratando de cumplir todas las características para obtener resultados favorables.

IV.II *Primers Barcoding e ITS.*

Para la amplificación del SSU rDNA de *Blastocystis* se diseñaron nuevamente los *primers* tanto para 18S (región *Barcoding*) como para los *Internal Transcribed Spacers* (ITS) utilizando el Software Primer Explorer V5 el cual arrojó varios juegos de *primers*, pero apegándonos a las características que deben cumplir para el método de LAMP se eligieron los siguientes:

- *Barcoding*

FIP 5' (CGA AAT CGA ACC CAA TTC TTC GTT CGA TGG TAG TGT ATT GGA CTA) 3'

F3 5' (TTC TCT GCC CTA TCA GCT) 3'

BIP 5' (GAG AGG GAG CCT GAG AAA TGG CCT CCC TAT GTC AGG ATT G) 3'

B3 5' (GTT CCA CAT TAG TAT TTA TTG TCA C) 3'

- *Internal Transcribed Spacers (ITS)*

FIP 5' (CCA TCA AAA CAC TCT CAA ATG ATC CAA GGT GAA GTC GTA ACA AGG)3'

F3 5' (TCG TGT AAA TCT TAT CAT TTA GAG G) 3'

BIP 5' (GAG AGC GAG CTG ACC TGA GTA AGA GTT CAC TCT AAC CTC AC) 3'

B3 5' (GCC AAG ATA TCC ATC GTG G) 3'

Región	Primer		Secuencia (5'-3')	T _m (°C)	%GC	Total pb
Barcoding	FIP	F1c	CGAAATCGAACCCAATTCTTCGT	65	43	45
		F2	TCGATGGTAGTGTATTGGACTA	61	41	
	BIP	B1c	GAGAGGGAGCCTGAGAAATGG	65	57	40
		B2	CCTCCCTATGTCAGGATTG	59	53	
	F3		TTCTCTGCCCTATCAGCT	60	50	18
	B3		GTTCCACATTAGTATTTATTGTCAC	59	32	25
ITS	FIP	F1c	CCATCAAAACACTCTCAAATGATCC	63	40	45
		F2	AAGGTGAAGTCGTAACAAGG	61	45	
	BIP	B1c	GAGAGCGAGCTGACCTGAGT	65	63	41
		B2	AAGAGTTCACCTAACCTCAC	60	43	
	F3		TCGTGTAAATCTTATCATTTAGAGG	60	32	25
	B3		GCCAAGATATCCATCGTGG	61	53	19

Tabla 11. *Primers* y características de su diseño.

Para continuar con la estandarización de LAMP para *Blastocystis*, se siguió la misma concentración de algunos reactivos que en el protocolo inicial, realizando curvas de diferentes concentraciones de los reactivos que consideramos que son puntos clave para llegar a las óptimas condiciones para este tipo de reacción, que son los iones Mg²⁺, *enhancers*, unidades de enzima polimerasa, *primers*. Así como la temperatura, la cual es constante, y tomando en cuenta que entre los 60 y 65°C la enzima polimerasa *Bst* cumple su mejor función como helicasa, además el tiempo para determinar cuál es el mejor para obtener un excelente amplificado.

IV.II.I Estandarización de iones Mg^{2+} y temperatura.

Otro factor determinante en esta reacción es la concentración de iones Mg^{2+} , por lo cual se realizó una curva de sulfato de magnesio en concentraciones de 4 mM, 6 mM, 8 mM y 10 mM. Calculados la T_m de los primers y considerándolas, se estandarizó la temperatura en una curva iniciando en 54°C aumentando 2°C hasta llegar a una temperatura de 64°C. Se optó por seguir trabajando con una concentración de primers interiores de 80 pmol y exteriores a 20 pmol.

Primers ITS

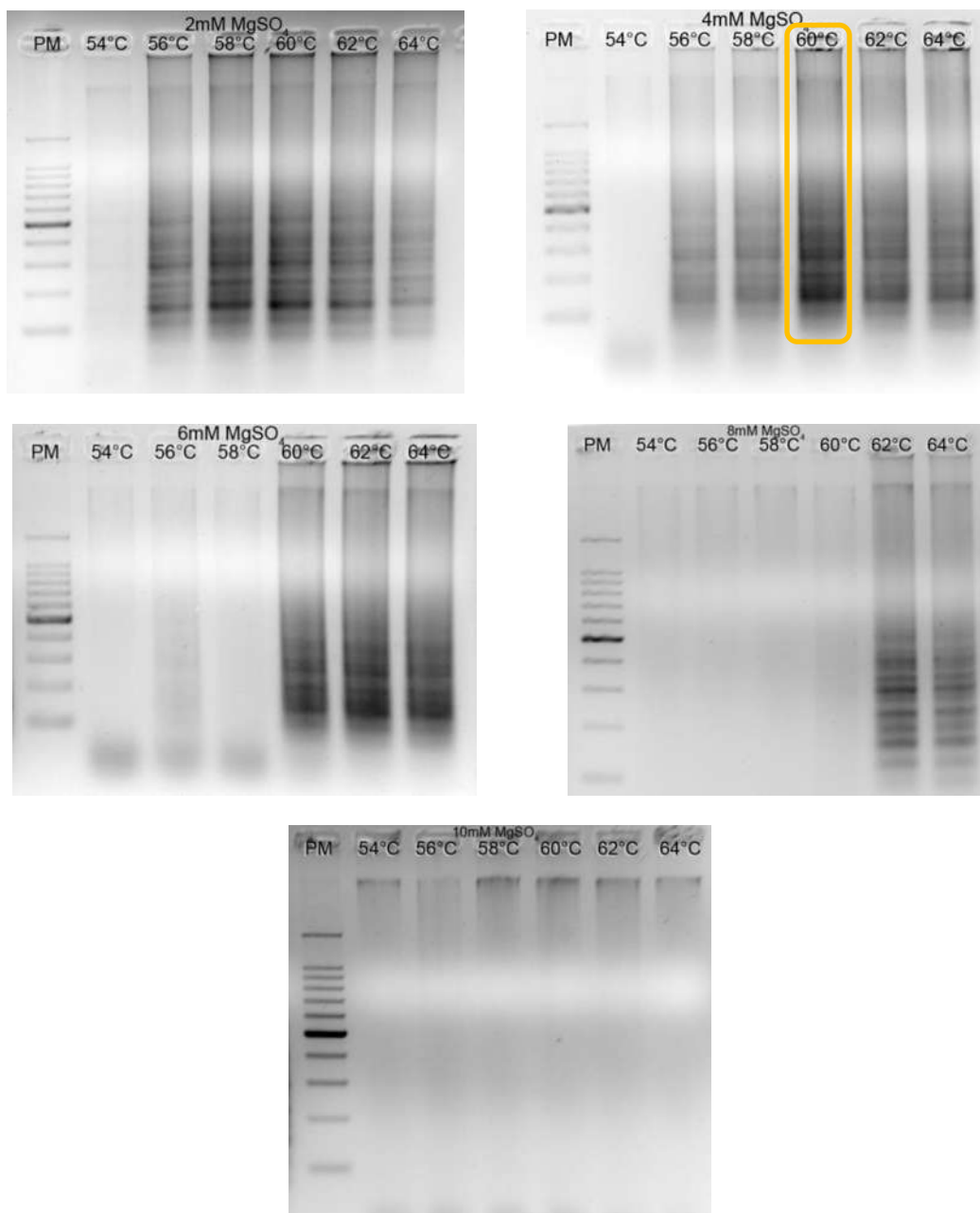


Figura 38. Amplificación *primers ITS* en curva de temperatura y gradiente de sulfato de magnesio ($MgSO_4$). Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 μ l/10ml TAE) bajo luz UV.

A 2 mM y 4 mM se observó una mejor amplificación entre un rango de entre 56 y 60 °C. Por lo tanto, a menor concentración de MgSO_4 la enzima polimerasa trabaja mejor, por lo tanto se elige trabajar a 4 mM (+2 mM contenidos en Buffer) 6 mM total de MgSO_4 a 60°C.

Primers Barcoding

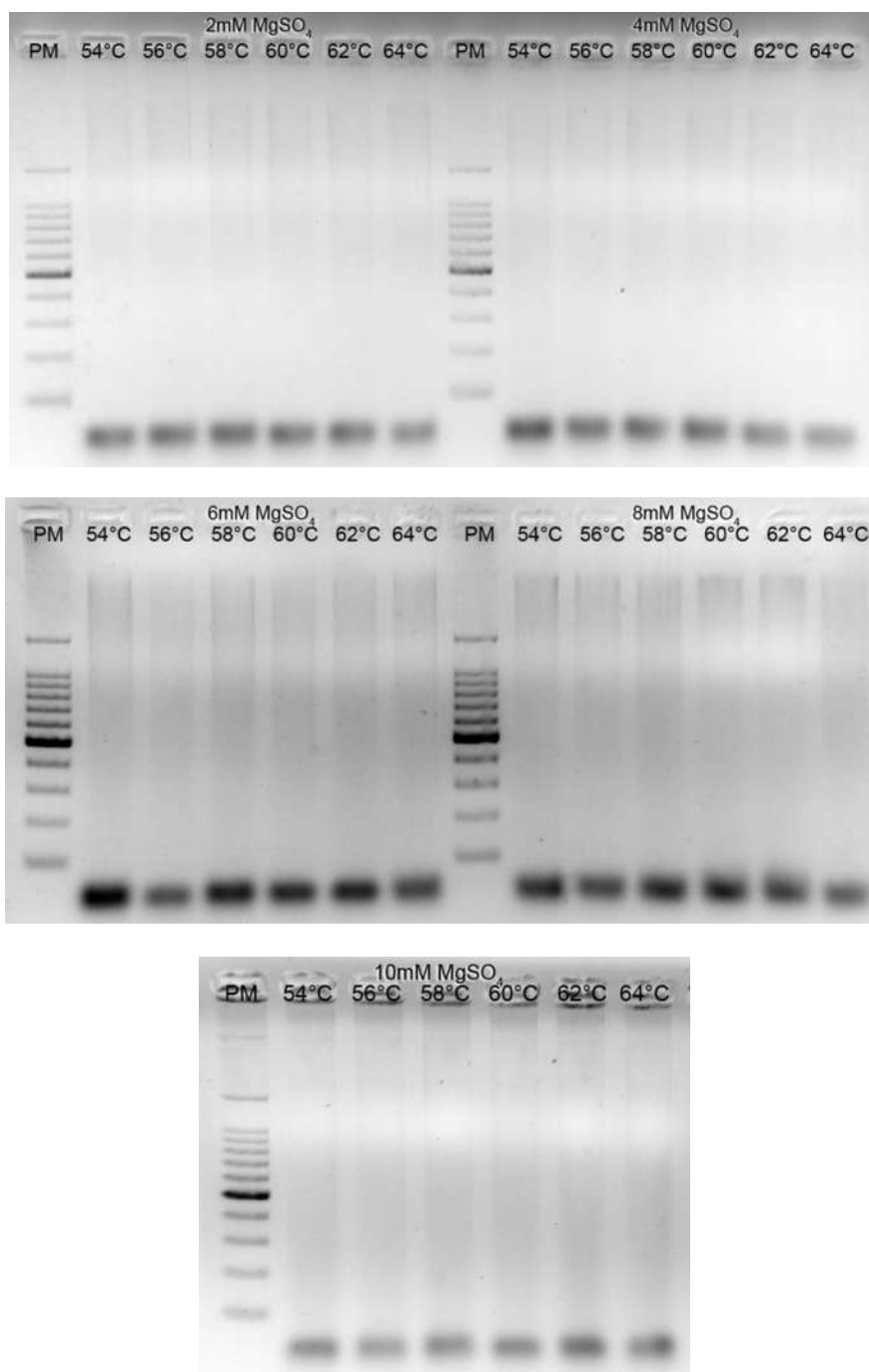


Figura 39. *Primers Barcoding* en curva de temperatura y gradiente de sulfato de magnesio (MgSO_4). Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 μl /10ml TAE) bajo luz UV.

No se observó amplificado en ninguna concentración de MgSO_4 a ninguna temperatura. Por lo cual se descartan los *primers* de *Barcoding*, se seguirá estandarizando el LAMP para *Blastocystis* con los diseñados en los *ITS*.

IV.II.II Estandarización de control positivo y negativo.

Obtenidas la concentración de Mg^{2+} y temperatura adecuada, además de verificar una buena alineación de los *primers* se estandarizó el control positivo y negativo adicionando 1 μl de SYBR Green 1:10,000 para corroborar por fluorescencia una amplificación exitosa.

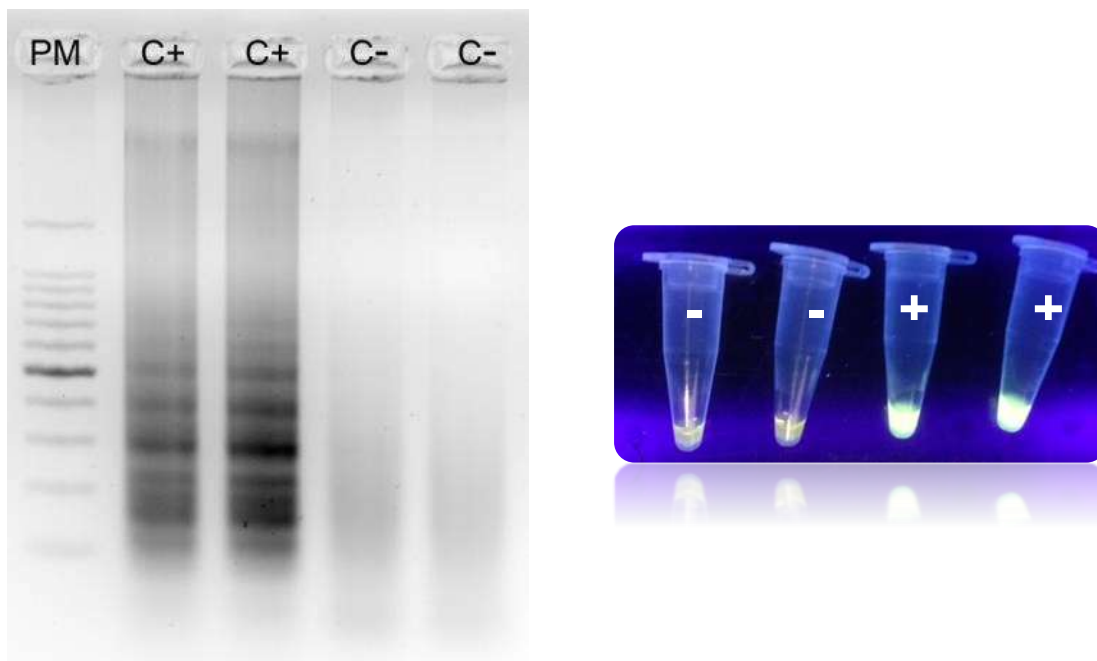


Figura 40. *Primers ITS*, control positivo y negativo. Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 μl /10ml TAE) y tubos de reacción bajo luz UV.

Se observó un correcto resultado, tanto por los controles positivos como los negativos. En la electroforesis se observó la mayor cantidad de amplicones a 200 pb. La fluorescencia es mayormente emitida por los controles positivos. Se sugiere ajustar la concentración de *primers* para obtener mejores bandas, por lo tanto, un máximo de amplicones.

IV.II.III Estandarización de concentración de *primers*.

Para no saturar el sistema y evitar dímeros de *primers* se realizó una curva de *primers* en ratios de 1:2, 1:4, 1:6 y 1:8, aumentando únicamente los *primers* interiores, ya que son los que se utilizan más, formando estos los *loops*.

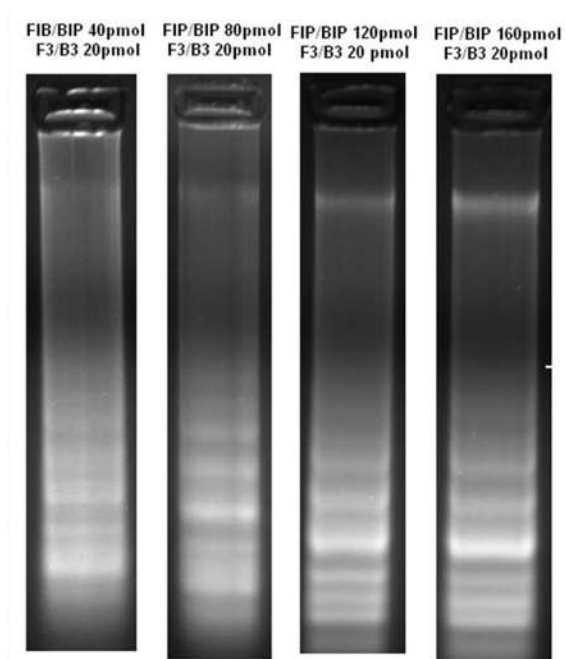


Figura 41. *Primers ITS*, ratios de *primers*: 1:2, 1:4, 1:6 y 1:8. Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 μ l/10ml TAE) bajo luz UV.

Se observaron mejores bandas en una concentración de *primers* interiores de 160 pmol y exteriores de 20 pmol, por lo tanto, se toman estas concentraciones como las adecuadas para seguir trabajando.

IV.II.IV Estandarización del tiempo de reacción.

LAMP, al ser una reacción constante, en un corto tiempo se puede obtener un confiable resultado. Se realizó una curva de tiempo llevando la reacción en tiempos de 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 minutos con controles positivo y negativo.

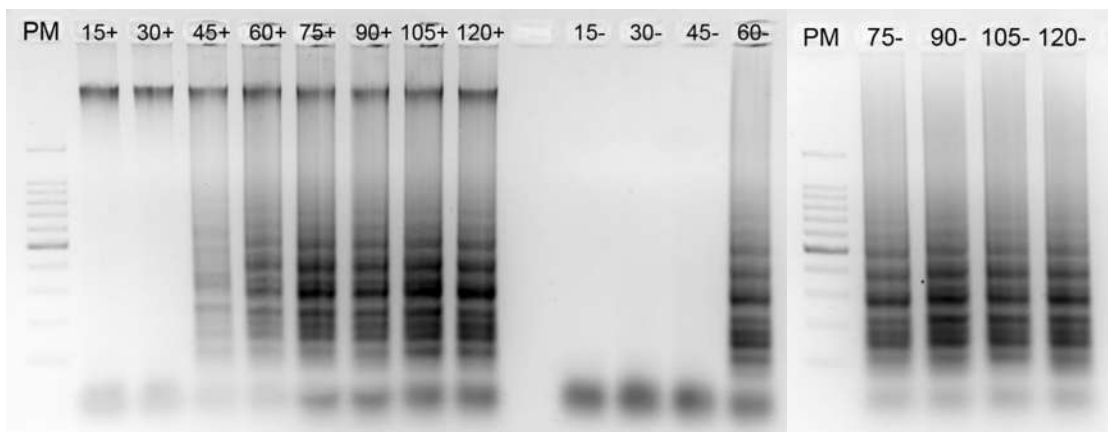


Figura 42. Amplificación de *primers ITS*, curva de tiempo. Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 μ l/10ml TAE) bajo luz UV.

Se observó una amplificación a partir de los 45 minutos en controles positivos, amplificando también a partir de los 60 minutos los controles negativos. Por lo cual se sugirió cambiar todos los reactivos para descartar contaminación de alguno de estos, además mejorar las condiciones del lugar de trabajo para evitar posible contaminación. Además, descender la concentración de *primers* interiores a 80 pmol y exteriores a 20 pmol para evitar saturar el sistema y obtener productos inespecíficos.

IV.II.V Descartar contaminación de reactivos.

Para descartar posible contaminación de algún reactivo, se reemplazaron todos los reactivos.

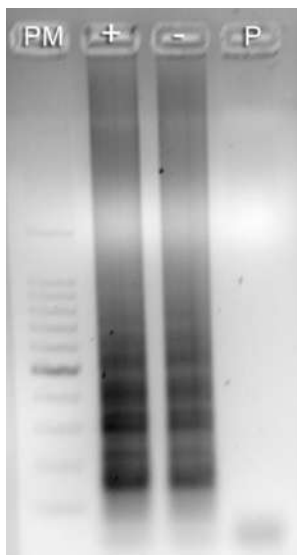


Figura 43. Amplificación de *primers ITS*, control positivo, negativo y P(H₂O). Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 µl/10ml TAE) bajo luz UV.

Se observó amplificación en control positivo y negativo, el P o NTC no muestra amplificación, por lo que se considera posible contaminación de DNA control negativo, por lo que se recomendó utilizar nuevos controles negativos y además probar el *enhancer* Dimetil Sulfoxido en diferentes concentraciones.

IV.II.VI Estandarización del Dimetil Sulfóxido como *enhancer*.

El dimetil sulfóxido (DMSO) ayuda a mantener las hebras de DNA abiertas, por lo cual el alineamiento de los *primers* debería ser exitosamente, con la desventaja de que el DMSO inhibe a la enzima polimerasa en un alto porcentaje. Se realizó una curva de DMSO en concentraciones de 2.5%, 5% y 7.5%, llevando a reacción el control positivo, negativo y P(H₂O).

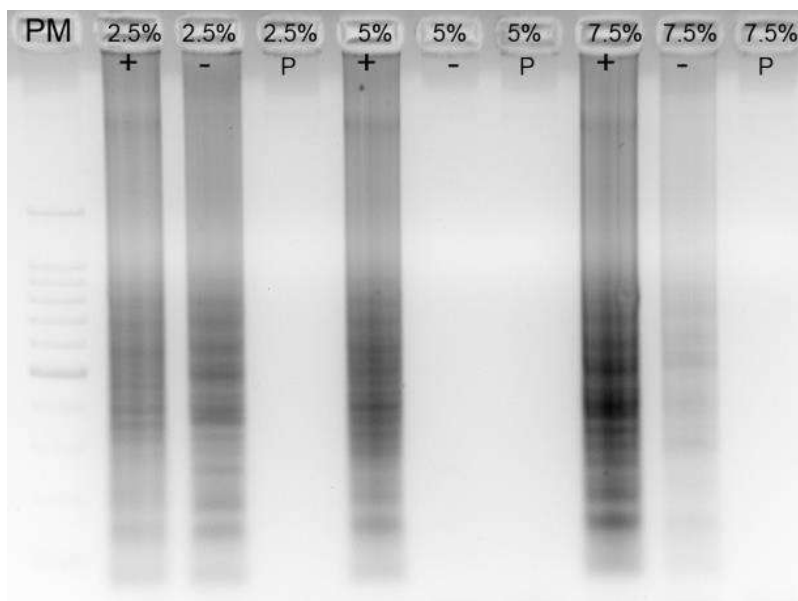


Figura 44. Amplificación de *primers ITS*, control positivo, negativo y P(H₂O), DMSO al 2.5%, 5% y 7.5%. Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 µl/10ml TAE) bajo luz UV.

Se observó amplificación en los controles positivos y negativos al 2.5 y 7.5% de DMSO, el control P no muestra amplificación. Se observó una gran mejora para obtener un resultado más fiable, pero se observó un menor rendimiento por parte de la enzima polimerasa, ya que el DMSO llega a inhibir un porcentaje del total agregado a la reacción. Aún se considera posible contaminación de DNA control negativo, por lo que se usaron varios controles negativos. Se descartó el uso del DMSO en la reacción.

IV.II.VII Descartar contaminación de DNA control.

Se utilizaron diferentes DNA control, tanto positivos como negativos, para descartar la contaminación de estos, además llevando a reacción dos NTC.

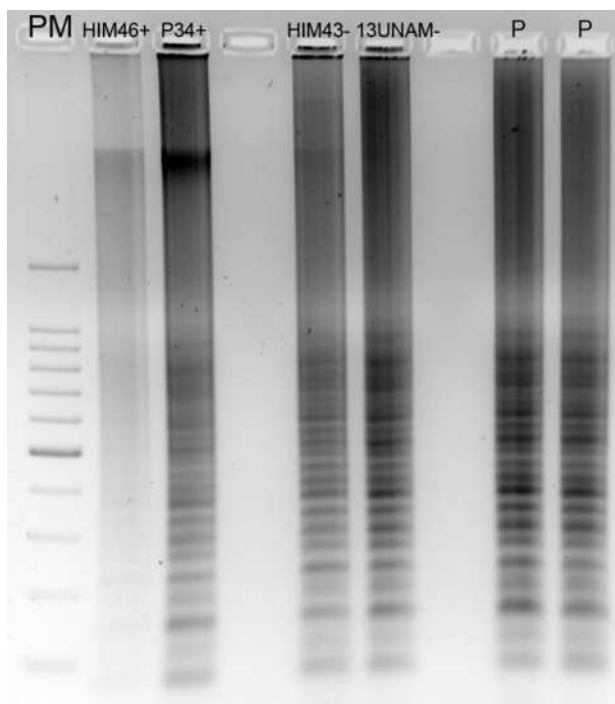


Figura 45. Amplificación de *primers ITS*, controles positivos (HIM46 y P34), negativo (HIM43 y 13UNAM) y P(H₂O). Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 µl/10ml TAE) bajo luz UV.

Se observó amplificación en control positivo P34, controles negativos HIM43 y 13UNAM, y los controles P cuando estos se adiciono H₂O como muestra a amplificar, además no amplifico uno de los controles positivos HIM46 cuando esta muestra se corrobora la existencia de *Blastocystis* por PCR por punto final. Por lo cual se sugirió descartar dímeros de *primers*, llevando únicamente en reacciones separadas *primers* exteriores, interiores, FIP y BIP.

IV.II.VIII Descartar dímeros de *primers*.

Las siguientes reacciones se prepararon sin DNA, llevando los *primers* por separado; BIP-FIP, los exteriores (F3/B3) y los interiores (FIP/BIP)

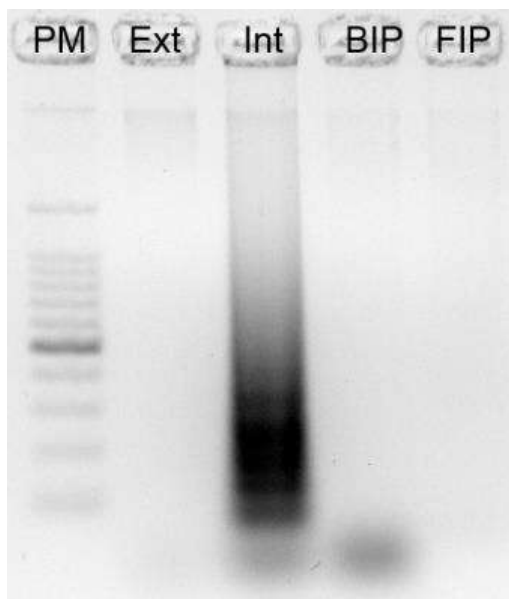


Figura 46. Amplificación de *primers* ITS, Ext (*Primers* F3/B3), Int (*Primers* FIP/BIP), primer BIP y primer FIP. Gel agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (1 μ l/10ml TAE) bajo luz UV.

Se observó dímeros de *primer* en la reacción donde se agregaron únicamente los *primers* interiores. Por el tamaño de los *primers* que se diseñaron como *primers* interiores FIP y BIP, puede que sea más factible que estos se complementen y así formen productos inespecíficos, recordar también que el contenido de bases guanina y citosina deber ser entre 50 y 60% para los *primers* de LAMP para mantener un mayor número de enlaces hidrogeno y así obtener un mejor alineamiento y más confiable ya que la reacción debe mantener condiciones astringentes por la temperatura constante a la que se mantiene. Se propone crear nuevos *primers* en las regiones ya elegidas apegándonos estrictamente a las características que deben cumplir para LAMP o estudiar algún nuevo gen o región de *Blastocystis* para en esta diseñar los *primers*, recordemos que LAMP es un método diagnóstico.

DISCUSIÓN

Durante el presente estudio, se analizaron 42 muestras fecales, de las cuales el 45%(19) fueron positivas a *Blastocystis*, y de estas el 42% se asoció a microorganismos comensales, el 5% a patógenos, 5% comensales y patógenos y el 48% como parasitosis única; asimismo, se observó que *Blastocystis* se vinculó con parásitos comensales como *Entamoeba coli* y en menor porcentaje a patógenos.⁷³ De las 42 pacientes incluidos, el 55% correspondió al sexo femenino (11) y 45% al sexo masculino (8), presentándose una diferencia entre sexos, y aun manteniéndose la misma prevalencia para este hospital,³⁶ pero contrastando con lo documentado en algunos reportes donde señalan cierta asociación con el sexo masculino.⁷³ Sin embargo, no se ha documentado la asociación de la colonización de *Blastocystis* con respecto al género.⁷⁴

Dentro de los parámetros demográficos, se observó una distribución por edad del 21% (4) para preescolar y 79% (15) para escolares, manteniéndose este grupo etario como el mayormente parasitado, similar a lo reportado en 2014 en este mismo hospital que fue del 70% (33/47)¹⁹ y en 2016 un 70% (34/48) en niños de Morelia y Hermosillo,³⁵ estableciéndose la edad, como una característica asociada al desarrollo de esta parasitosis.⁷⁴

Asimismo, se observó que el 48% (9) de los participantes viven en la ciudad de Morelia y el 52% (10) son foráneos, siendo estos principalmente del municipio de Charo 11% (2), no mostrándose gran significancia, ya que no se ha observado la asociación del estrato sociodemográfico y ubicación con esta parasitosis para Latinoamérica, siendo la mayoría países en desarrollo; sin embargo, en el presente estudio se observó cierta variación en cuanto a los subtipos de *Blastocystis* de acuerdo a la procedencia, ya sea rural o urbana donde se vive.⁷³ En el presente estudio prevaleció el ST3 (44.5%), seguido del ST1 (33.3%) y ST2 (22.2%) para la ciudad de Morelia, mientras que el ST2 (44.5%) fue el más frecuente en los municipios restantes del estado de Michoacán; cabe mencionar que en el estudio de 2014 se encontró en Morelia el ST1 como el más frecuente (47%), seguido del ST2 (29%) y ST3 (24%), mientras que para los foráneos, el mayormente encontrado fue el ST3 (36%), seguido de ST2 (32%) y ST1 (29%)³⁶. Es probable que estas diferencias en la distribución de los subtipos puedan deberse a un sesgo por el tamaño de muestras en el presente trabajo, por lo que si se hubiera incrementado el muestreo, probablemente las distribuciones de los ST hubieran sido similares. En otras investigaciones, los ST6 y ST7 son los que se diagnostican mayormente para zonas rurales,⁷³ no obstante siendo mamíferos como el ganado vacuno y porcino, así como los perros los reservorios de los STs 1, 2, 5 y 8,⁷ el estrecho contacto de los niños de zonas rurales con estos animales podrían ser los responsables de transmisión del parásito. Asimismo, ST1 a, ST2 y ST3 son los más frecuentemente encontrados en pacientes de edad pediátrica documentados, para Colombia en 2017, el ST3 fue el más frecuente en este grupo etario,⁷³ observándose diferencia en cuanto al subtipo más prevalente entre México y Colombia, siendo los dos países en desarrollo. Aunque para Nigeria en 2016 se ha reportado en pacientes pediátricos el ST1 el más prevalente seguido del ST2 y ST3, con gran similitud a nuestros resultados.⁷⁴

En los 19 pacientes con blastocistosis el síntoma mayormente referido fueron las flatulencias 84.2% (16) seguido del dolor abdominal 68.4% (13) en los niños incluidos en este estudio, mientras que, en el Hospital Pediátrico Universitario "William Soler" de la Habana Cuba, los síntomas mayor referidos por blastocistosis han sido el dolor abdominal y diarrea.³⁶ En un estudio en pacientes de variada edad, las flatulencias, estreñimiento,

diarrea (24%), dolor abdominal (20%) y náuseas (8%) fueron la principal sintomatología referida.¹¹ Observándose un mayor porcentaje de niños con flatulencias que lo referido en estos estudios. Además, se realizó la Chi cuadrada, con el 95% de confianza ($p>0.05$) y un grado de libertad ($v=1$), no mostrándose ninguna asociación entre la sintomatología y la parasitosis.

Mientras que la edificación de la casa ($RR=2.14$) y el consumo de agua no purificada ($RR=1.97$) representan un riesgo mayor para adquirir la blastocistosis ($RR>1$) en aquellos individuos expuestos a estos factores de riesgo que entre los individuos sin dichos factores. En acorde con los variados análisis realizados en niños y factores de riesgo para contraer una infección por protozoarios intestinales, el consumir agua sin tratamiento alguno de purificación representa un alto riesgo.⁷² En 2017 en Malasia se realizó un estudio en el cual se concluyó que ser menor de 15 años es un factor de riesgo para contraer la infección por *Blastocystis*, así como que el algún miembro de la familia sea portador del parásito.⁷⁵ Además, se realizó la Chi cuadrada, con el 95% de confianza ($p>0.05$) y un grado de libertad ($v=1$), no mostrándose ninguna asociación entre los factores de riesgo y la parasitosis.

El diagnóstico de este parásito suele ser difícil, sobre todo por microscopia de luz, la cual posee baja sensibilidad.¹⁰ La técnica más común para la detección de *Blastocystis* consiste en el examen directo en fresco por microscopia de luz. No obstante, dado el polimorfismo de *Blastocystis*, el deterioro causado por las condiciones ambientales o el tratamiento suministrado al paciente, además de que *Blastocystis* puede ser confundido con otro microorganismo, esta técnica parece haber subestimado en gran medida al parásito en el contexto de diagnóstico de parásitos entéricos. En 2009 en Dinamarca en un estudio realizado, 24 muestras fueron positivas por PCR, de las cuales 14 habían sido negativas por microscopia de luz, concluyendo baja sensibilidad para el diagnóstico por microscopía.⁷⁶

Por otra parte, cultivar este parásito consume prolongado tiempo. Por lo tanto, para sobrellevar estas limitaciones, se han desarrollado varios métodos moleculares como lo es la reacción en cadena de la polimerasa.⁷⁷

En algunas décadas pasadas, varios métodos moleculares han sido desarrollados para superar las deficiencias de los métodos clásicos para el diagnóstico. Tales enfoques podrían permitir rápidos diagnósticos con un grado de sensibilidad y especificidad comparado con o incluso mejor que los métodos clásicos.²³

Para la amplificación del SSU rDNA de *Blastocystis* por el método LAMP se diseñaron 5 juegos de *primers*, cada juego se conformó de 4 *primers* dos exteriores (F3/B3) y dos interiores (FIP/BIP) los cuales reconocen 6 distintas secuencias en total en el DNA diana, para el gen 18S y la región ITS, de los cuales ninguno logro amplificar correctamente ya que solamente se obtuvieron productos inespecíficos o dímeros de *primers*.

El diseño de los *primers* juega un papel importante para lograr una amplificación exitosa, ya que los *primers* interiores (FIP/BIP) se conforman de dos regiones, una en sentido y la otra en antisentido de la región del DNA a amplificar. Una de la principales características al diseñar estos *primers* es cuidar primordialmente su *melting temperature* (T_m), ya que es un sistema isotérmico,²⁵ la cual debe ser aproximadamente entre 60° y 65°C, en el caso de oligonucleótidos con abundantes pares de bases GC, aproximadamente entre 55° a 60°C para aquellos abundantes en pares bases AT.²² Por lo tanto debe también

cuidarse el contenido de bases GC, para obtener Tm adecuadas, el cual debe ser de entre 50 a 60% de pares bases GC y de 40 a 50% de pares bases AT.²²

En el diseño de los *primers* para *Blastocystis*, al ser genéticamente variable por los distintos subtipos existentes, se tomaron secuencias que contuvieran todos los subtipos del parásito. Los tres primeros juegos que se diseñaron (*Barcoding*, *ITS 522* e *ITS 432*), tenían entre 400 y 600 pares de bases como DNA diana, el tamaño sugerido de DNA diana para una amplificación exitosa debe ser entre 130 a 200 pares de bases. Secuencias de más de 500 pares de bases pueden llegar a amplificar, pero muy pobremente. Por lo que el máximo recomendado en el DNA diana debe ser menos de 300 pares de bases, incluyendo en esta las regiones F2 Y B2 de los *primers*, aunque los mejores resultados se obtienen entre 130 a 200 pares de bases.²⁵ En 2016 se estandarizo LAMP para *Leishmania*, en el que se diseñaron tres diferentes juegos de *primers* en diferentes longitudes 204, 353 y 458 pares de bases, los cuales todos amplificaron exitosamente, cuidando minuciosamente el contenido de bases GC para obtener Tm de cada primer de entre 60 y 65°C.⁷⁸ Además nuestros tres primeros juegos de *primers* tienen un bajo contenido de bases GC, todos por debajo del 50%, por lo tanto su Tm por debajo de 60°C, no logrando alinearse correctamente y recordando que la temperatura óptima de trabajo para la enzima polimerasa Bst es de entre 60 y 65°C, por lo que el sistema trabaja mejor entre estas temperaturas.

En el segundo intento, se diseñaron los *primers* (*Barcoding* e *ITS*) en una longitud de DNA diana de 200 pares de bases, apegándonos estrictamente a esta característica. No obstante, al ser *Blastocystis* variable genéticamente, esto represento un gran obstáculo para el diseño de los *primers* y el cuidado del contenido GC y obtener Tm de entre 60 y 65°C de estos, por lo que se diseñaron *primers* con un contenido de entre 40 y 60% de bases GC y calculando Tm para estos de entre 59 y 65°C. Por consiguiente, no se logró establecer el gradiente de Tm recomendado para los oligonucleótidos del primer ensayo de LAMP, en el cual se sugiere que los valores de Tm de las regiones F1c y B1c debe ser un poco más alto que el de las regiones F2 Y B2 para que la estructura con forma de *loop* u horquilla se forme inmediatamente después de producirse amplicones lineales. Además, la Tm de los *primers* exteriores, F3 y B3, deben ser más bajas que la de las regiones F2 y B2, para asegurar que la síntesis se lleve a cabo primero por los *primers* exteriores seguido de los *primers* interiores. Por lo que además deben utilizarse concentraciones 1:4 a 1:10 de *primers* externos contra internos.²⁵

El uso de *enhancers* como aditivos en las reacciones de PCR han sido de gran ayuda, sobre todo en aquellas secuencias ricas en bases GC o en *primers* que pudieran formar estructuras secundarias fácilmente, por lo estos resultan en gran beneficio para aumentar el rendimiento, la especificidad y estabilidad de la reacción y obtener una amplificación exitosa.^{79, 80} En este tipo de reacción, al contener gran cantidad de *primers* se adicionó Betaína para ayudar a un mejor alineamiento de estos, además ensayando DMSO para mantener la hebra de DNA abierta y fuese aún más fácil el alineamiento de los *primers*, no logrando obtener resultados favorables.

CONCLUSIÓN

El desarrollo de rápidos, precisos y sensibles métodos de diagnóstico para la identificación de patógenos es fundamental para tratar y controlar, o incluso erradicar, enfermedades infecciosas. Dado el polimorfismo de *Blastocystis* y su difícil identificación, LAMP sería una excelente herramienta de diagnóstico en aquellas muestras en las cuales se establezca la duda de la existencia de este parásito.

Esta es la primera vez, de nuestro conocimiento, que se ensaya el método de LAMP para el diagnóstico de *Blastocystis* y sus subtipos genéticos. Aunque se obtuvieron amplificaciones evidentes en los controles usados, inconsistencias en la reproducibilidad de los mismos sugieren que los marcadores de la SSU rDNA y de ITS no son adecuados para el diagnóstico de este microorganismo, probablemente debido a la naturaleza polimórfica del propio organismo y de las características innatas de los marcadores utilizados, tales como presentar diversas copias en tándem, así como un contenido bajo en la relación Guanina/Citosina. Por ello, es importante evaluar otros marcadores que puedan ser utilizados por la técnica de LAMP, y de esta manera proponer un diagnóstico sensible, específico y particularmente accesible en cualquier nivel de atención dentro de los Servicios de Salud.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Olgér Calderón Arguedas. *Parasitología General: Elementos Y Actividades*. (Editorial Universidad de Costa Rica). Pag. 2004; 21.
2. Tay, J., Gutiérrez, M., López, R., Molina, J. & Manjarrez, M. E. *Microbiología y Parasitología Médicas de Tay*. (MÉNDEZ EDITORES). 2012; 679-683.
3. Salud y grupos vulnerables. Citado el 8 de Julio del 2017. Disponible en: <https://www.insp.mx/lineas-de-investigacion/salud-y-grupos-vulnerables.html>
4. Niños y adultos mayores, principales afectados por la parasitosis. Citado el 8 de Julio del 2017. Disponible en: <http://www.gob.mx/salud/prensa/162-ninos-y-adultos-mayores-principales-afectados-por-la-parasitosis>
5. Maravilla, P., López Escamilla, E. & Martínez Hernández, F. *Blastocistosis*. Ciencia. 2017; 68, 18-21.
6. Subhash-Chandra P, Jeremiah SS. *Blastocystis: Taxonomy, biology and virulence*. Tro Par. 2013; 1(3): 17-25.
7. Amaya S, Alana M, Trejos SJ, Morales RE. *Blastocystis spp.: revisión literaria de un parásito intestinal altamente prevalente*. Rev Uni Ind San. 2015; 47(2): 199-208.
8. Denoeud et al.: *Genome sequence of the stramenopile Blastocystis, a human anaerobic parasite*. Genome Biol. 2011 12: 29.
9. Zapata-Valencia JI, Rojas-Cruz C. *Una actualización sobre Blastocystis sp*. Rev gastrohnp. 2012. 14(3): 94-100.
10. Santín M, Gómez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. *Development of a new PCR protocol to detect and subtype Blastocystis spp. from humans and animals*. Parasitol Res. 2011; 109: 205–212.
11. Hernández AK, Barrios EE, Sánchez L, Araque W, Delgado V. *Tipos morfológicos, número de parásitos por campo y carga parasitaria de Blastocystis sp proveniente de pacientes sintomáticos y asintomáticos*. Sal Onl. 2012; 16(3): 15-20.

12. Chandramathi S, Suresh K, Sivanandam S, Kuppusamy UR. *Stress Exacerbates Infectivity and Pathogenicity of Blastocystis hominis: In Vitro and In Vivo Evidences*. PLoS ONE. 2014; 9(5): 1-11.
13. Wu Z, Mirza H, Tan KSW. *Intra-Subtype Variation in Enteroadhesion Accounts for Differences in Epithelial Barrier Disruption and Is Associated with Metronidazole Resistance in Blastocystis Subtype-7*. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(5): 1-18.
14. Nagel R, Traub RJ, Kwan MMS, Bielefeldt-Ohmann H. *Blastocystis specific serum immunoglobulin in patients with irritable bowel syndrome (IBS) versus healthy controls*. Par & Vect. 2015; 8:453.
15. Wawrzyniak I, Poirier P, Viscogliosi E, Dionigia M, Texier C, Delbac F, et al. *Blastocystis, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis*. Ther Adv Infect Dis. 2013; 1(5): 167-178.
16. Mirza H, Wu Z, Teo JDW, Tan KSW. *Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by Blastocystis cysteine proteases*. Cell Micr. 2012; 14(9): 1474–1484.
17. Wu Z, Mirza H, Teo JDW, Tan KSW. *Strain-Dependent Induction of Human Enterocyte Apoptosis by Blastocystis Disrupts Epithelial Barrier and ZO-1 Organization in a Caspase 3- and 9-Dependent Manner*. BioMed Res Int. 2014; 1-11.
18. Stensvold CR, Clark CG. *Current status of Blastocystis: A personal view*. Par Int. 2016; 1-9.
19. Villalobos G, Orozco-Mosqueda GE, Lopez-Perez M, Lopez-Escamilla E, Córdoba-Aguilar A, Rangel-Gamboa L, et al. *Suitability of internal transcribed spacers (ITS) as markers for the population genetic structure of Blastocystis spp.* Par & Vec. 2014; 7:461.
20. Jiménez LF, Merchant H. *Biología Celular y Molecular*. Pearson Education. México, 2003; 3-37.
21. Scicluna SM, Tawri B, Clark CG. *DNA Barcoding of Blastocystis*. Protist. 2006. 157: 77-85.
22. Eiken Genome Site Co., Ltd; Japón, 2005. Citado el 18 de Octubre del 2016. Disponible en: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/>
23. Mori Y, Notomi T. *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases*. Jap Inf Chem. 2009; 165: 62-69.
24. Parida M, Sannarangaiah S, Kumar-Dash P, Rao PVL, Morita K. *Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases*. Rev Med Virol. 2008; 18: 407-421.
25. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. Nuc Aci Res. 2000; 28(12): e63.
26. Esmatabadi MD, Bozorgmehr A, Motalebzadeh H, Bodaghabadi N, Farhangi B, Babashah S. *Techniques for Evaluation of LAMP Amplicons and their Applications on Molecular Biology*. Asi Pac Jour Canc Prev. 2015; 16: 7409-7414.
27. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products*. Nat Pro. 2008; 3(5): 877-882.
28. Oscorbin IP, Belousova EA, Zakabunin AI, Boyarskikh UA, Filipenko ML. *Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP)*. BioTech. 2016; 61: 20-25.
29. Mori Y, Kanda H, Notomi T. *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development*. Jap Inf Chem. 2013: 1-9.

30. Roberts T, Bush S, Ellis J, Harkness J, Stark D. *In vitro* antimicrobial susceptibility patterns of *Blastocystis*. *Ant Age Che*. 2015; 59:4417– 4423.
31. Kiani H, Haghighi A, Rostami A, Azargashb E, Javad S, Tabaei S, et al. *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*. 2016; 58: 42.
32. Indelman P, Echenique C, Bertorini G, Racca L, Gómez C, Luque A, et al. *Enteric parasites in children in Rosario, Santa Fe, Argentina*. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2011; 45 (2): 329-334.
33. Casero RD, Mongi F, Sánchez A, Ramírez JD. *Blastocystis and urticaria: Examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation*. *Acta Tropica*. 2015; 148: 156–161.
34. Scanlan PD, Stensvold CR, Cotter PD. *Development and application of a Blastocystis subtype-specific PCR assay reveals that mixed-subtype infections are common in a healthy human population*. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81: 4071– 4076.
35. Villegas-Gómez I, Martínez-Hernández F, Urrea-Quezada A, González-Díaz M, Durazo M, Hernández J, et al. *Comparison of the genetic variability of Blastocystis subtypes between human carriers from two contrasting climatic regions of México*. *Inf Gen Evo*. 2016; 44: 334-340.
36. Martínez-Silva I, Ayllón-Valdés L, Sosa-Palacios O, Núñez-Fernández FA, Martínez-González MA. *Morbidity from Blastocystis spp. at “William Soler” university pediatric hospital*. *Rev Cub Ped*. 2015; 87(3): 327-334.
37. Yersal O, et al., *Blastocystis subtypes in cancer patients: Analysis of possible risk factors and clinical characteristics*. *Par Int*. 2015; 1-5.
38. Supaluk P, Ruenruetai U, Khuanchai K, Aongart M, Teera K, Jiraporn R, et al. *Subtype Distribution of Blastocystis in Thai-Myanmar Border, Thailand*. *Kor Jou Par* 2015; 53(1): 13-19.
39. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. *Update on the pathogenic potential and treatment options for Blastocystis sp*. *Gut Path* 2014, 6: 17.
40. Hernández AK, Barrios EE, Sánchez L, Araque W, Delgado V. *Tipos morfológicos, número de parásitos por campo y carga parasitaria de Blastocystis sp proveniente de pacientes sintomáticos y asintomáticos*. *Sal Onl*. 2012; 16(3): 15-20.
41. Nagel R, Gray C, Bielefeldt-Ohmann H, Traub RJ. *Features of Blastocystis spp. in xenic culture revealed by deconvolutional microscopy*. *Parasitol Res* (2015) 114: 3237–3245.
42. Nourrisson C, Scanzi J, Pereira B, NkoudMongo C, Wawrzyniak I, et al. *Blastocystis Is Associated with Decrease of Fecal Microbiota Protective Bacteria: Comparative Analysis between Patients with Irritable Bowel Syndrome and Control Subjects*. *PLoS ONE*. 2014; 9(11): e111868.
43. Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Uche-Onuoha ES, Fagbenro-Beyioku AF, Graham-Clark C. *Variable geographic distribution of Blastocystis subtypes and its potential implications*. *Act Tro*. 2013; 126(1): 11-18.
44. Sánchez E, Nina M, Aguirre P, Arce M, Toro N, Vilela R. *Amplificación isotérmica mediada por loop (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico*. *Rev con-cien*. 2014; 1(2): 125-138.
45. Ado DE, Rivera WL. *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of the sexually-transmitted parasite, Trichomonas vaginalis*. *Ann of Par*. 2016; 62(1): 25-31.
46. Kothalawala HS, Karunaweera ND. *Loop-mediated isothermal amplification assay as a sensitive diagnostic tool for Leishmania donovani infections in Sri Lanka*. *Cey Med Jou*. 2016; 61: 68-70.

47. Lucchi NW, Ljolje D, Silva-Flannery L, Udhayakumar V. *Use of malachite green-loop-mediated isothermal amplification for detection of Plasmodium parasites*. PLoS ONE. 2016; 11(3): 1-9.
48. Ortigoza-Gutiérrez DS, Cruz-Aguilar DM. Manual de procedimientos para el laboratorio E. E. Parasitología General. 2011 Citado el 23 de Septiembre del 2016. Disponible en: [www.uv.mx/personal/sortigoza/files/2011/05/manual para gral 2012.pdf](http://www.uv.mx/personal/sortigoza/files/2011/05/manual_para_gral_2012.pdf)
49. Orozco-Mosqueda QG. *Manual de Procedimientos de Parasitología*. 2015.
50. Fernandez DN. *Coprología. Coproparasitario*. Citado el 23 de Septiembre de 2016. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/Cp.pdf>
51. Navone GT, Gamboa MI, Kozunbsky LE, Costas ME, Cardozo MS, Sisliauskas MN, et al. *Estudio comparativo de recuperación de formas parasitarias por tres diferentes métodos de enriquecimiento coproparasitológico*. Par Lat. 2005; 60(3-4):178 - 181.
52. ZR Fecal DNA MiniPrep™; 2017. Citado 5 de Julio de 2017. Disponible en: <http://www.zymoresearch.com/dna/microbial-environmental-dna-isolation-1/soil-fecal-plant-dna/quick-dna-fecal-soil-microbe-miniprep-kit>
53. Shiraho EA, Eric AL, Mwangi IN, Maina GM, Kinuthia JM, Mutuku MW et al. *Development of a Loop Mediated Isothermal Amplification for Diagnosis of Ascaris lumbricoides in Fecal Samples*. Jour Parasit Res. 2016; 1-7.
54. Koloren Z, Ayaz E. *Genotyping of Cryptosporidium spp. in environmental water in Turkey*. Act Parasit. 2016; 61(4): 671-679.
55. Rivera WL, Ong VA. *Development of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Entamoeba histolytica*. Asian Pac Jour Trop Med. 2013; 457-461.
56. Arifin MI, Höglund J, Novobilský A. *Comparison of molecular and conventional methods for diagnosis of Fasciola hepatica infection in the field*. Veter Parasit. 2016; 232: 8-11.
57. Li J, Wang P, Zhang A, Zhang P, Alsarakibi M, Li G. *Sensitive and Rapid Detection of Giardia lamblia Infection in Pet Dogs using Loop-Mediated Isothermal Amplification*. Korean J Parasitol. 2013; 51(2): 237-241.
58. Kothalawala HS, Karunaweera ND. *Loop-mediated isothermal amplification assay as a sensitive diagnostic tool for Leishmania donovani infections in Sri Lanka*. Ceylon Med Jour. 2016; 61: 68-70.
59. Mahittikorn A, Mori H, Popruk S, Roobthaisong A, Sutthikornchai C, Koompaong K et al. *Development of a Rapid, Simple Method for Detecting Naegleria fowleri Visually in Water Samples by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)*. PLoS ONE. 2015; 10(3): 1-15.
60. Mugambi RM, Agola EL, Mwangi IN, Kinyua J, Shiraho EA, Mkoji GM. *Development and evaluation of a Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique for the detection of hookworm (Necator americanus) infection in fecal samples*. Par & Vec. 2015; 574(8): 1-7.
61. Britton S, Cheng Q, Sutherland CJ, McCarthy JS. *A simple, high-throughput, colourimetric, field applicable loop-mediated isothermal amplification (HtLAMP) assay for malaria elimination*. Malaria Jour. 2015; 335(14): 1-12.
62. Watts MR, James G, Sultana Y, Ginn AN, Outhred AC, Kong F et al. *A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Strongyloides stercoralis in Stool That Uses a Visual Detection Method with SYTO-82 Fluorescent Dye*. Am J Trop Med Hyg. 2014; 90(2): 306-311.
63. Nkouawa A, Sako Y, Okamoto M, Ito A. *Simple Identification of Human Taenia Species by Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification in Combination with Dot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Am J Trop Med Hyg. 2016; 1-16.

64. Trisciuglio A, Zanet S, Marengo G, Chiesa F, Nucera DM, Bergallo M et al. *The use of loop-mediated isothermal amplification improves Toxoplasma gondii detection in wildlife*. Jour Vet Diag Inv. 2015; 27(6): 754-757.
65. Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab DJ, Suzuki H et al. *Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of African Trypanosomes*. Jour Clin Micro. 2003; 41(12): 5517-5524.
66. New England BioLabs Inc. 2017. Citado el 27 de Agosto de 2017. Disponible en: <https://www.neb.com/protocols/2014/11/21/typical-lamp-protocol-m0275>
67. Boorom, K., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Spanakos, G., Parkar, U. et al. *Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, Blastocystis, and asymptomatic infection*. Parasit Vectors. 2008; 1: 40.
68. Tan, K. *New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp.* Clin Microbiol Rev 2008; 21: 639-665.
69. Alfellani, M., Taner-Mulla, D., Jacob, A., Imeade, C., Yoshikawa, H., Stensvold, C. et al. *Genetic diversity of Blastocystis in livestock and zoo animals*. Acta Trop. 2013; 126: 11-18.
70. Lee, L., Chye, T., Karmacharya, B. and Govind, S. *Blastocystis sp: waterborne zoonotic organism, a possibility?*. Parasit Vectors. 2012; 5: 130.
71. Nagel, R., Cuttall, L., Stensvold, C., Mills, P., Bielefeldt-Ohmann, H. and Traub, R. *Blastocystis subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy*. Intern Med J. 2012; 42: 1187-1195.
72. Rebolla MF, Silva EM, Gomes JF, Falcao AX, Rebolla MVF, Franco RMB. *High Prevalence of Blastocystis spp. Infection In Children and Staff Members Attending Public Urban Schools In Sao Paulo State, Brazil*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2016; 58(31): 1-8.
73. Ramírez JD, Flórez C, Olivera M, Bernal MC, Giraldo JC. *Blastocystis subtyping and its association with intestinal parasites in children from different geographical regions of Colombia*. PLoS ONE. 2017; 12(2): e0172586.
74. Poulsen CS, Efunshile AM, Nelson JA, Stensvold CR. *Epidemiological Aspects of Blastocystis Colonization in Children in Ilero, Nigeria*. Am J Trop Med Hyg. 2016; 95(1): 175-179.
75. Mohammad NA, Al-Mekhlafi HM, Moktar N, Anuar TS. *Prevalence and Risk Factors of Blastocystis Infection Among Underprivileged Communities in Rural Malaysia*. As Pac J Trop Med. 2017; 10(5): 491-497.
76. Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, Porsbo LJ, Nielsen SS, Arendrup MC et al. *Blastocystis: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite*. Epidemiol Infect. 2009; 1-9.
77. Roberts, T., Barratt, J., Harkness, J., Ellis, J. and Stark, D. *Comparison of microscopy, culture, and conventional polymerase chain reaction for detection of Blastocystis sp. in clinical stool samples*. Am J Trop Med Hyg. 2011; 84: 308-312.
78. Sriworarat C, Phumee A, Mungthin M, Leelayoova, Siriyasatien P. *Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of Leishmania infection*. Para & Vec. 2015; 591(8): 1-8.
79. Frackman S, Kobs G, Simpson D, Storts D. *Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR*. Promega Notes. 1998; 65: 27.
80. Wang D, Brewster J, Paul M, Tomasula M. *Two Methods for Increased Specificity and Sensivity in Loop-Mediated Isothermal Amplification*. Molec. 2015; 20: 6048-6059.

ANEXOS

I. Anexo 1 INDICACIONES DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

A) PACIENTES FORÁNEOS

Se requiere una muestra fresca y dos muestras con conservador (formol).

Muestra fresca:

1. Colocar un pedazo de excremento del tamaño de una nuez en un frasco limpio con tapadera.
2. La muestra no debe extraerse de la taza del baño.
3. Remitir al laboratorio antes de 24 horas de haber sido colectada, la muestra puede ser obtenida a cualquier hora del día, no es necesario el ayuno.

Muestras con conservador (formol):

1. Colocar un pedazo de excremento del tamaño de una nuez en un frasco con Formol al 10%.
2. Homogenizar perfectamente con ayuda del abatelenguas hasta dejar una consistencia de un atole espeso.
3. Repetir el procedimiento hasta completar las 2 muestras (de días diferentes).

B) PACIENTES LOCALES

1. Colocar un pedazo de excremento del tamaño de una nuez en un frasco limpio con tapadera.
2. La muestra no debe extraerse de la taza del baño.
3. Remitir al laboratorio antes de 24 horas de haber sido colectada. La muestra puede ser obtenida a cualquier hora del día. No es necesario el ayuno.

Repetir el procedimiento hasta completar 3 muestras (de tres días diferentes).

II. Anexo 2 EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO EN FRESCO

Esta técnica es sencilla y simple para el análisis de las muestras fecales y particularmente cuando son diarreicas. Esta técnica nos ayuda a detectar la presencia y movilidad de trofozoítos de protozoarios, así como, quistes y ooquistes de los mismos, formas de *Blastocystis*, así como huevos y larvas de nematodos.

En esta técnica los reactivos más utilizados son:

1. Solución salina isotónica (ssi).
2. Yodo-lugol.
3. Azul de metileno amortiguado (AMA).

La observación en fresco con Solución Salina Isotónica se usa para el examen inicial microscópico de las heces y se emplea para conservar condiciones semejantes a las del cuerpo humano y de esta manera observar los huevos y larvas de los gusanos, trofozoítos y quistes de protozoarios.⁴⁸

El examen en fresco con Yodo-lugol se utiliza para teñir el glucógeno y el núcleo de los quistes, por lo que si éstos están presentes pueden identificarse específicamente con este método.

El examen directo en fresco con Azul de metileno amortiguado, debe ser efectuado cada vez que se observen trofozoítos de amiba en la preparación en fresco con Solución salina isotónica o cuando se sospeche la presencia de éstos. El Azul de metileno amortiguado va a teñir trofozoítos de amibas pero no a quistes, ni trofozoítos o quistes de flagelados. El Azul de metileno amortiguado es apropiado exclusivamente solo para muestras que estén frescas y no debe usarse en muestras preservadas en donde los organismos han muerto.

Material:

- Aplicadores de madera.
- Hisopos.
- Portaobjetos de 26X76 mm.
- Cubreobjetos de 22X22.

Reactivos:

- Solución salina isotónica.
- Solución Yodo – Lugol.
- Solución de azul de metileno amortiguado (AMA)
- Solución 1:1 de parafina y vaselina.

Equipo:

- Microscopio.

Procedimiento:

1. Colocar 1 gota de solución salina isotónica en el centro del portaobjetos.
2. Con el aplicador, tomar la muestra, calculando más o menos de 1.5 a 2 mg. de heces y hacer una suspensión uniforme con la gota de solución salina isotónica.
3. Cubrir la preparación con el cubreobjetos.
4. Con un hisopo limpiar las orillas del cubreobjetos para quitar el exceso de muestra.
5. Sellar la preparación con parafina.
6. Repetir el procedimiento en otros 2 portaobjetos adicionando a la suspensión hecha con solución salina isotónica, yodo-lugol y azul de metileno amortiguado respectivamente.
7. Finalmente observar al microscopio con objetivos 10X y 40X. ⁴⁹

III. Anexo 3 TÉCNICA DE CONCENTRACIÓN POR SEDIMENTACIÓN MÉTODO DE RITCHIE O FORMOL-ÉTER.

técnicas de concentración por sedimentación por el método de Ritchie o Formol-Éter El fundamento de esta técnica se basa en lavados sucesivos de una muestra de terminada de materia fecal, con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de restos vegetales así como también grasas presentes en dicha muestra, ya que pueden obstaculizar la observación microscópica.⁵⁰

Es una técnica de concentración que demuestra la presencia de huevos, quistes, ooquistes y larvas, no importa la densidad que estos tengan. El éter se emplea, para la eliminación de muchos detritus orgánicos y el formol, tiene una función como fijador, y poder así mantener la integridad de las formas parasitarias.⁴⁹

Material:

- Tubos cónicos para centrifuga, de 15ml.
- Vaso de plástico de 100 mL.
- Gasa cortada en cuadros de 16x16 cm
- Abatelenguas de madera .
- Pipetas Pasteur
- Bulbos de goma.
- Porta objetos de 38 X 76 mm.
- Cubre objetos 22 X 22 mm.
- Tapones de hule
- Pizeta con agua
- Embudos de plástico de 5 cm de diámetro
- Hisopos
- Gradilla
- Parafina-vaselina 1:1

Reactivos:

- Solución de yodo-lugol.
- Solución de formol al 10%.
- Éter.
- Cloro como desinfectante al 10%.

Equipo:

- Microscopio compuesto.
- Parrilla.
- Centrifuga.
- Vortex.

Procedimiento:

1. Con ayuda de un aplicador, tomar una muestra de heces de aproximadamente 1 ó 2 gramos y hacer una suspensión 3:1 en un vaso de plástico.
2. Filtrar a través de gasa húmeda a un tubo cónico de 15 ml utilizando un embudo de plástico.
3. Centrifugar el tubo a 2,500 rpm durante un minuto.
4. Descartar el sobrenadante.
5. Añadir 10 ml de formol al sedimento y con ayuda de un aplicador agitar perfectamente la muestra y dejar reposar por 5 minutos.
6. Agregar 1 ml. de éter.
7. Tapar el tubo con tapón de hule y agitar vigorosamente en el Vortex durante 15 segundos.
8. Retirar cuidadosamente el tapón del tubo cónico, teniendo cuidado de realizar este proceso lejos de la cara
9. Volver a centrifugar a 2,500 rpm por 1 minuto.
10. Al finalizar el proceso de centrifugación se obtienen 4 capas:
 - a) Sedimento.
 - b) Formol.
 - c) Detritus.
 - d) Éter.

11. Con apoyo de un aplicador desprender el tapón de detritus de todo alrededor, para posteriormente decantar los sobrenadantes de un solo movimiento de tal manera que solo quede el sedimento.
12. 11. Con un hisopo limpiar las paredes del tubo cónico.
13. Mezclar perfectamente el sedimento con formol y con ayuda de una pipeta pasteur transferir el sedimento a un portaobjetos (una gota) y agregar una gota de lugol, mezclar perfectamente y colocar un cubreobjetos.
14. Con un hisopo limpiar el exceso de muestra alrededor del cubreobjetos.
15. Sellar la preparación con parafina.
16. Finalmente observar al microscopio primero utilizando el objeto de 10x y posteriormente con el objetivo de mediana resolución para confirmar las estructuras de los quistes.⁴⁹

IV. Anexo 4 TÉCNICA DE CONCENTRACIÓN POR FLOTACIÓN MÉTODO DE SHEATHER O SACAROSA (FLOTACIÓN)

Esta técnica nos ayuda a Identificar las formas parasitarias de tamaño pequeño (ooquistes de *Cryptosporidium* y *Cyclospora*). Se utiliza una solución concentrada de sacarosa la cual posee una densidad de 1.20, lo que permite la flotación de parásitos menos densos.⁴⁹

Las estructuras parasitarias son recuperadas de la capa superficial y los residuos se mantienen en el fondo del tubo. Con esta técnica los preparados suelen ser más limpios que los que se obtienen por sedimentación.⁵¹

Material:

- Agua destilada 320 ml.
- Tubos de ensaye 13X100.
- Portaobjetos desengrasados de 26X76 mm.
- Cubreobjetos de 22X22 mm.
- Varilla de vidrio.
- Pizeta con agua.
- Vaso de plástico de 100 ml.
- Embudos de plástico de 5 cm de diámetro.
- Gasa en cuadros de 16X16 cm.
- Abatelenguas de madera.
- Aplicadores de madera.
- Hisopos.
- Asa bacteriológica con aro de 5mm de diámetro doblada con un ángulo de 90°.
- Gradilla.
- Parafina-vaselina 1:1.
- Solución parafina-vaselina 1:1.

Reactivos:

- Solución de Sheather densidad 1.180-1.200.
- Solución de yodo-lugol.
- Cloro al 10% para descartar el material.

Equipo:

- Microscopio compuesto
- Parrilla eléctrica
- Centrifuga
- Densímetro

Procedimiento:

1. Filtrar de 1 a 2 ml de heces con gasa en un tubo de centrifuga.
2. Lavar con agua de la canilla o agua destilada por centrifugación hasta sobrenadante limpio.
3. Agregar al sedimento la solución de Sheather hasta el borde del tubo.
4. Mezclar suavemente con varilla de vidrio.
5. Dejar reposar 3 minutos o centrifugar 1 minuto a 1500rpm.
6. Retirar 1 o 2 gotas de la película superficial con asa de alambre.
7. En un porta objetos colocar una gota de yodo-lugol, y homogeneizar con el cubreobjetos.
8. Con un hisopo limpiar el exceso de muestra alrededor del cubreobjetos.
9. Sellar la preparación con parafina.
10. Observar al microscopio, primeramente utilizando el objeto de 10x y posteriormente con el objetivo de mediana resolución para confirmar las estructuras de los quistes.⁴⁹

V. Anexo 5 MEDICIÓN MICROSCÓPICA DE PARÁSITOS

La medición de los parásitos y sus productos es un parámetro muy valioso ya que este nos ayuda a precisar el tamaño de los huevos y así como de los parásitos en sus estadios de su evolución, también permite una mejor diferenciación de ellos y un adecuado diagnóstico. Se puede realizar con un micrómetro ocular u ocular micrométrico y el micrómetro objetivo.⁴⁹

Principio: Los micrómetros oculares están grabados con una escala fija que consiste en 50 líneas paralelas. Cada división del micrómetro ocular representa diferentes medidas según el poder de resolución del juego de objetivos utilizados en un microscopio compuesto, por lo tanto para cada juego de oculares y objetivos utilizados, la escala ocular se debe comparar con una escala calibrada conocida. Es importante recordar que una vez efectuada la calibración con un determinado juego de oculares y objetivos, éstos no pueden ser intercambiables con los componentes correspondientes de otro microscopio.⁴⁹

Coefficiente micrométrico: se refiere a una cifra que expresa la equivalencia en μm de una división de la escala del micrómetro ocular al emplear cada objetivo del microscopio. Suele llamarse como “factor” y la operación para obtenerlo se le denomina “calibración del microscopio”. El coeficiente micrométrico es inversamente proporcional al poder de amplificación de los objetivos utilizados. Habitualmente se obtienen tres coeficientes micrométricos para cada microscopio usando un solo ocular micrométrico y los objetivos 10X y 45x (seco débil y seco fuerte) y de 90X ó 100X (de inmersión), pero puede hacerse cualquier combinación de ocular y objetivo. Para obtener el coeficiente micrométrico hay que seguir la siguiente técnica.⁴⁹

Equipo:

- Micrómetro ocular de escala fija:

Es un pequeño disco de vidrio de 12 mm de diámetro, en el cual puede verse grabada una escala de 5 mm, dividida en 50 partes y generalmente numerada de 10 en 10. Este disco se coloca sobre el diafragma de cualquier ocular, transformándolo así en ocular micrométrico. Cada división de esta escala mide $100\ \mu\text{m}$.⁴⁹

- Ocular micrométrico de platina con divisiones de 0.1 y 0.01mm:

Es esencialmente similar al micrómetro ocular, pero la lente va montada sobre un corto tubo que puede acortarse o alargarse a voluntad por deslizamiento en el tubo externo, permitiendo así enfocar con toda precisión la escala micrométrica intercalada entre él.⁴²

- Micrómetro objetivo:

Es un portaobjetos en cuyo centro se halla grabada una escala de 1 ó 2 mm, dividida en 100 ó 200 partes; cada división mide $10\ \mu\text{m}$.

- Microscopio compuesto estándar.⁴⁹

Procedimiento:

1. Retirar el ocular del microscopio. Si se utiliza un microscopio binocular, se acostumbra a retirar el ocular X10 derecho.
2. Desenroscar la lente superior del ocular e insertar la oblea del micrómetro de modo que se apoye en el anillo del diafragma dentro del ocular. Colocar el micrómetro con el lado grabado hacia abajo. El micrómetro se manipula con paño para lentes y se debe evitar por todos los medios que algún hilo quede adherido a la superficie.
3. Reinsertar el ocular. Al observar a través del ocular, la escala del micrómetro aparece como una serie de divisiones alineadas.
4. Colocar el micrómetro de platina bajo el objetivo del microscopio que se ha de calibrar. Enfocar la escala del micrómetro de platina que se ve como una serie de divisiones de 0.1 y 0.01 mm.
5. Ajustar el micrómetro de platina de modo que la línea "0" de la escala del micrómetro ocular se superponga exactamente con la línea "0" de la escala del micrómetro de platina.
6. Sin efectuar ninguna otra manipulación, observar ambas escalas y hallar el próximo par de líneas que coincidan exactamente. Con un aumento de 450 X, las líneas coincidentes son la marca 40 de la escala ocular y la marca de 0.09 mm de la escala del micrómetro de la platina.⁴⁹

Cálculos:

El objetivo de la calibración es determinar cuánto mide en μm cada división de la escala ocular cuando se calibra contra la escala del micrómetro objetivo. Por lo tanto, 40 unidades de la escala del ocular equivaldrán a 0.09 mm de la escala del micrómetro de platina y cada división del ocular es igual a $0.09\ \text{mm}/40$, o sea $0.00225\ \text{mm}$. Dado que hay $1000\ \mu\text{m}$ en cada milímetro, cada división del micrómetro es igual a 0.00225×1000 , o sea $2.25\ \mu\text{m}$.⁴⁹

VI. Anexo 6 HOJA DE CONSENTIMIENTO



**Secretaría
de Salud**
Gobierno del Estado de Michoacán



Hospital Infantil “Eva Sámano de López Mateos”

Laboratorio de Investigación de Microbiología y Parasitología

Hoja de consentimiento para la participación en el proyecto de investigación
**“ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA BASADA EN
HORQUILLAS (LAMP) PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Blastocystis* EN NIÑOS DEL
HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA”**

Manifiesto que he recibido información completa y precisa sobre los beneficios del proyecto de investigación, el cual no representa riesgo para mi hijo(a); dado que la información se obtendrá de la muestra de materia fecal y los datos que se piden se manejarán de forma anónima y confidencial.

Por lo anterior otorgo mi consentimiento para que el resultado del estudio de mi hijo(a), pueda ser utilizado con fines académicos y de investigación por el Laboratorio de Investigación en Microbiología y Parasitología, del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”.

Morelia, Michoacán a ____ de _____ del 2016.

Nombre y Firma
Padre o Tutor

Nombre y Firma
Testigo

Responsable de la Investigación
QFB Guadalupe Eréndira Orozco Mosqueda

VIII. Anexo 8 EXTRACCIÓN DE DNA



ZR Fecal DNA MiniPrep™

Catalog No. D6010

Muestra problema: agregar ≤ 150 mg de heces fecales

Antes de comenzar:

- **Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter** (tapa verde) necesita ser preparada previamente 1) Romper la punta de la base, 2) Insertar la columna en un tubo colector, y 3) Centrifugar en una microcentrifugaa 8,000 x g por 3 minutos exactamente.
- Para un rendimiento óptimo, agregar beta-mercaptoetanol (suministrado por el usuario) al Fecal DNA Binding Buffer a una dilución final de 0.5% (v/v) i.e., 500µl por 100 ml.

*El siguiente procedimiento debería ser preparado a temperatura ambiente (15-30°C).

1. Agregar 150 mg de heces fecales a un tubo de lisis **ZR BashingBead™**. Agregar 750 µl de **Lysis Solution** a el tubo.
2. Asegurar en flotador todos los tubos de lisis y sujetarlo en bortex para procesarlo a máxima velocidad por ≥ 5 minutos.
3. Centrifugar el tubo de lisis **ZR BashingBead™** en una microcentrifuga a $\geq 10,000$ x g por 1 minuto.
4. Transferir hasta 400 µl de sobrenadante a una columna **Zymo-Spin™ IV Spin Filter** (tapa naranja) en un tubo colector y centrifugar a 7,000 x g por un minuto.

Nota: Cortar la base de la columna **Zymo-Spin™ IV Spin Filter** antes de usarse.

5. Agregar 1,200 µl de **Fecal DNA Binding Buffer** a el filtrado en el tubo colector del paso 4.
6. Transferir 800 µl de la mezcla del paso 5 a una columna **Zymo-Spin™ IIC** en un tubo colector y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto.

Nota: La columna **Zymo-Spin™ IIC** tiene una capacidad máxima de 800 µl.

7. Descartar la solución filtrada del tubo colector y repetir el paso 6.
8. Agregar 200 µl de **DNA Pre-Wash Buffer** a la columna **Zymo-Spin™ IIC** en un nuevo tubo colector y centrifugar a 10,000 x f por 1 minuto.
9. Agregar 500 µl **Fecal DNA Wash Buffer** a la columna **Zymo-Spin™ IIC** y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto.
10. Transferir la columna **Zymo-Spin™ IIC** a un microtubo limpio de 1.5 ml y agregar 100 µl (minimo 35 µl) de **DNA Elution Buffer** directamente a la membrana de la columna. Reposar por dos minutos y después centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos para eluir el DNA.
11. Transferir el DNA eluido del paso 10 a una columna **Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter** (tapa verde), previamente preparada, en un microtubo limpio de 1.5 ml y centrifugar exactamente a 8,000 x g por 1 minuto.

El DNA esta ahora viable para utilizarse en PCR y en otras aplicaciones.⁵²

IX. Anexo 9 PCR PUNTO FINAL

Para la amplificación del SSU rDNA de *Blastocystis* se utilizaron los primers diseñados por SANTIN et al. 2011 que son: *Primer Forward* Blast 505–532 (5' GGA GGT AGT GAC AAT AAATC 3'), *Primer Backward* Blast 998–1017 (5' TGC TTT CGC ACT TGT TCATC 3'). La amplificación del fragmento es de 500 (479) pb, conteniendo una región variable que permite subtipificar los especímenes de *Blastocystis*. La localización de los primers en referencia a la secuencia de nucleótidos U51151 son a nucleótidos positivos 445–464 y 905–924.¹⁰

Cada reacción se llevó a un volumen total de 50 µl, conteniendo la mezcla de PCR 1X de Buffer B qTaq, libre de Mg²⁺ y detergente (Modificado), 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 2 U Taq (qARTA Bio, Inc.)(Modificado), 2 µl de BSA (0.1g/10ml) (Modificado), 2 µl de DNA (concentración de 5 a 500ng/µl), 25 pmol de cada *primer* (Modificado) y H₂O (libre de nucleasas) c.b.p. 50 µl. Un total de 38 ciclos (Modificado), cada ciclo consistía en 94°C por 30 segundos de desnaturalización (Modificado), 54°C por 30 segundos para el alineamiento, y 72°C por 30 segundos para el elongamiento, con previo calentamiento a 94°C por 5 minutos (Modificado), una extensión final a 72°C por 10 minutos (Modificado) y un enfriamiento al final de 25°C por 10 minutos (Modificado). Se utilizó termociclador Axygen.

El producto obtenido se analizó en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (1 µl/10ml TAE) por 45 minutos a 100 mA y 100 V, para después observarlo bajo luz UV en fotodocumentador Care Stream.