

Dinámica de la evolución de las formas de *Blastocystis* spp. en un medio de cultivo simple

- Elena Concepción Visciarelli^{1a*}, Norma Esther Basabe^{2a}, Viviana Rosa Randazzo^{1a}, Leandro Damián Lucchi^{2a}, María Celeste Bauer^{3a}, Evangelina Chazarreta^{3a}, Marcelo Rinaldo Occhionero^{4b}

Resumen

Blastocystis spp. es un parásito muy frecuente en materia fecal humana, pero la naturaleza polimórfica y el número de *Blastocystis* en la muestra pueden complicar su detección por microscopía. El objetivo del trabajo fue describir la dinámica de los morfotipos de *Blastocystis* a corto plazo en un medio de cultivo simple y determinar su aplicabilidad para utilizarlo como complemento del análisis coproparasitológico y para estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares del parásito. Se sembraron 10 muestras de materia fecal con *Blastocystis* en un medio Pavlova adaptado, se examinaron diariamente por examen microscópico durante 6 días y se registraron las formas y el recuento. El desarrollo fue regular y abundante y las formas fueron de tamaños variables y claramente identificables. El cultivo ensayado puede ser útil para la detección de *Blastocystis* cuando existan dudas diagnósticas por microscopía, para estudios de sensibilidad y especificidad diagnóstica o cuando se requiera aumentar la carga para realizar otros estudios.

Palabras clave: *Blastocystis* spp.; Cultivo; Formas de *Blastocystis*; Medio Pavlova; Análisis coproparasitológico

Dynamics of the evolution of the forms of Blastocystis spp. in a simple culture medium

Abstract

Blastocystis spp. is a very frequent parasite in human fecal matter, but the polymorphic nature and the number of *Blastocystis* in a sample can complicate its detection by microscopy. The objective of the present work was to describe the dynamics of *Blastocystis* morphotypes in the short term in a simple culture medium and to determine its applicability to use it as a complement to coproparasitological analysis and for morphological, biochemical and molecular studies of the parasite. Ten stool samples with *Blastocystis* were cultured in an adapted Pavlova medium and examined during 6 days by microscopy to record the forms and the count. The development was regular and abundant and the shapes were of variable sizes and clearly

¹ Bioquímica. Dra. en Bioquímica. Especialista en Bioquímica Clínica, Área Parasitología.

² Bioquímica/o. Especialista en Bioquímica Clínica, Área Parasitología.

³ Bioquímica.

⁴ Bioquímico. Dr. en Bioquímica.

^a Cátedra de Parasitología Clínica. Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

^b Cátedra de Bacteriología y Micología, Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

* Autora para correspondencia.

identifiable. The tested culture could be used for the detection of Blastocystis when microscopic diagnosis is dubious, for studies of diagnostic sensitivity and specificity or when it is necessary to increase the load to perform other studies.

Keywords: *Blastocystis spp.; Culture; Blastocystis forms; Pavlova's medium; Coproparasitological analysis*

Dinâmica da evolução das formas de Blastocystis spp. em um meio de cultura simples

Resumo

Blastocystis spp. é um parasita muito frequente nas fezes humanas, mas a natureza polimórfica e o número de Blastocystis na amostra podem complicar a sua detecção através do microscópio. O objetivo do trabalho foi descrever a dinâmica dos morfotipos de Blastocystis no curto prazo em um meio de cultura simples e determinar sua aplicabilidade para ser utilizado como complemento da análise coproparasitológica e para estudos morfológicos, bioquímicos e moleculares do parasita. Foram semeadas dez amostras de fezes com Blastocystis em um meio Pavlova adaptado e examinadas diariamente através de exame microscópico durante 6 dias, registrando as formas e fazendo recontagem. O desenvolvimento foi regular e abundante e as formas foram de tamanhos variáveis e claramente identificáveis. A cultura testada pode ser útil para a detecção de Blastocystis quando houver dúvidas diagnósticas por microscopia; para estudos de sensibilidade e especificidade diagnóstica ou quando for necessário aumentar a carga para a realização de outros estudos.

Palavras-chave: *Blastocystis spp.; Cultura; Formas de Blastocystis; Meio de cultura Pavlova; Análise coproparasitológica*

Introducción

Blastocystis spp. es el parásito unicelular del intestino del hombre y otros animales que se halla con mayor frecuencia en la materia fecal humana (1). Es un parásito polimórfico con seis formas descritas: vacuolar, granular, ameboide, avacuolar, multivacuolar y quística (2). La forma vacuolar o forma de cuerpo central es redondeada, presenta una vacuola que ocupa aproximadamente el 90% del volumen de la célula y deja un anillo citoplasmático periférico donde se encuentran las organelas y los núcleos. La vacuola puede tener aspecto vacío o contener material homogéneo o granuloso. Mide entre 2 y 200 μm , pero en las muestras fecales predominan las formas pequeñas con valores entre 5 y 15 μm (3).

La forma granular se asemeja a la forma vacuolar, pero con gran cantidad de gránulos dentro del cuerpo central y en el citoplasma. Los gránulos intracelulares son heterogéneos y se describen como inclusiones similares a la mielina, vesículas pequeñas, gránulos cristalinos y gotas de lípidos (2).

La forma ameboide no es fácilmente identificable en heces y rara vez se informa. A partir de su aislamiento en medios de cultivo, se han descrito con un tamaño de 10 a 15 μm , con características similares a las formas vacuolares, pero con uno o dos seudópodos (2) (3).

Los quistes son muy pequeños, de forma variable, pero en su mayoría son esféricos u ovoides, miden de 3

a 10 μm , generalmente 2 a 5 μm y aparecen rodeados por una cubierta celular suelta. Esa cubierta externa es fina y se observa un espacio entre ésta y el quiste, el cual es muy refringente (2) (3).

La forma avacuolar carece de la vacuola central y la forma multivacuolar contiene múltiples vacuolas pequeñas (2) (3).

La identificación en el laboratorio se realiza fundamentalmente por la observación microscópica de alguna de ellas. La forma vacuolar, seguida por la granular, es la que se halla con más frecuencia, tanto en las muestras fecales como en los cultivos (2).

Los métodos de diagnóstico recomendados, con mayor sensibilidad analítica, son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el cultivo (4). La PCR, considerada la prueba de elección, es más sensible que la microscopía (5), pero la mayoría de los laboratorios no puede utilizarla porque requiere de insumos y equipamiento costosos. Por lo tanto, el examen microscópico de materia fecal, la aplicación de métodos de enriquecimiento, las coloraciones y el cultivo *in vitro* son los métodos más factibles para la detección de *Blastocystis* (4). Aunque en los laboratorios asistenciales la técnica más utilizada es el examen microscópico de materia fecal en preparación húmeda, la naturaleza polimórfica, la variación de tamaño y el número de *Blastocystis* en la muestra son factores que pueden complicar su detección por microscopía (4).

El objetivo del presente trabajo fue describir la dinámica de los morfotipos de *Blastocystis* a corto plazo en un medio de cultivo simple y determinar la aplicabilidad del medio para utilizarlo como complemento del análisis coproparasitológico convencional y para estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares del parásito.

Materiales y Métodos

Muestras

Se utilizaron 10 muestras de materia fecal sin conservantes con formas vacuolares pequeñas y escasas (menos de una forma por campo de 40X). El criterio de inclusión de las muestras fue que se diagnosticaran en la observación microscópica como *Blastocystis* positivas por presentar formas vacuolares menores de 10 μm . Se consideraron grandes las formas de *Blastocystis* ≥ 10 μm y pequeñas las < 10 μm .

Medio de cultivo

Se utilizó un medio que se denominó Pavlova adaptado, que resultó del medio Pavlova modificado con plasma humano (6) al que se le introdujeron ligeras variaciones. El medio Pavlova modificado contiene $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (8,95 g); fosfato de potasio (1,15 g); cloruro de sodio (20 g); extracto de levadura (4 g); agua destilada c.s.p. 2740 mL; plasma humano al 5% (137,5 mL); almidón de arroz estéril (2,75 g); hidróxido de sodio (1 N) para ajustar el pH a 7,2-7,4; penicilina G sódica 1000 UI/mL y estreptomina 50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el medio Pavlova adaptado se utilizó almidón de maíz en lugar de almidón de arroz y los antibióticos fueron penicilina G benzatínica Richet® 1000 UI/mL y estreptomina sulfato Richet® 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El medio se distribuyó en tubos de vidrio con tapa a rosca estériles a razón de 10 mL cada uno y se almacenó a 4 °C hasta su uso (máximo un mes).

Inóculo

Las muestras sólidas se diluyeron en solución fisiológica y, después de la microscopía, cada muestra (n=10) se homogenizó por inversión 5 veces y se sembraron 100 μL de heces, con una carga parasitaria “escasa” (menos de una forma por campo de 40X), en tubos con 10 mL de medio de cultivo. La siembra se realizó por duplicado. Los tubos se incubaron a 37 °C, sin ningún sistema de anaerobiosis adicional, se examinaron diariamente por examen microscópico durante 6 días y se registraron las formas y el recuento de *Blastocystis*.

El cultivo fue considerado positivo cuando se observaron formas reproductivas y se registró un aumento significativo del número de formas *Blastocystis* respecto de la

carga inicial en el medio, es decir, con un recuento en el medio de cultivo, regular o abundante. Aquellos que no mostraron desarrollo temprano se observaron hasta el día 15 posinoculación antes de considerarlos negativos.

Morfotipos y tamaños

Las formas se clasificaron morfológicamente empleando un microscopio Leica DM500 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania), se fotografiaron con la cámara Leica ICC50 HD (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania), y se midieron con el *software* Leica LAS EZ (v3.2.1). Se consideraron grandes las formas de *Blastocystis* ≥ 10 μm y pequeñas las < 10 μm . Las formas de *Blastocystis* se registraron fotográficamente en fresco y con tinción de Lugol.

Recuento de *Blastocystis*

Se estimó el número de *Blastocystis* por campo de 40X realizando la observación de una gota de 25 μL de materia fecal y/o del medio de cultivo, entre porta y cubreobjetos. Se contaron los parásitos hallados en 100 campos microscópicos, distribuidos como sigue: 20 campos en cada uno de los cuatro extremos del cubreobjetos y 20 centrales. Se realizó por duplicado. La carga parasitaria se valoró como: “escasa” con menos de una forma por campo, “regular”: 1 a 4 por campo y “abundante”: 5 o más por campo.

Resultados

El desarrollo de *Blastocystis* en el medio Pavlova adaptado fue predominantemente regular y abundante y las formas de *Blastocystis* presentaron evidentes variaciones de tamaño. En dos muestras no hubo desarrollo hasta el día 15 de seguimiento. En los días 1 y 2 se observaron *Blastocystis* vacuolares en tamaños variados (10 a 20 μm), con predominio de formas grandes (Fig. 1. a, b y c) y en los días 2 y 3 numerosas formas vacuolares en división (Fig. 1. d y e) y formas granulares (10 a 15 μm) (Fig. 1. f). Las formas vacuolares y granulares continuaron presentes hasta el final de las observaciones el día 6. El máximo desarrollo se observó al cuarto día (Fig. 2. a), y el quinto día se detectaron formas quísticas (5 a 12 μm) (Fig. 2. b) que fueron, además, las predominantes. En los cultivos del día 3 y posteriores se observaron formas atípicas o aberrantes (Fig. 2. c, d y e), y dos estructuras que podrían considerarse compatibles con formas ameboides (Fig. 2. d y e). En los cultivos del día 6 se observaron escasas formas típicas de *Blastocystis*, con predominio de quistes y formas no típicas o aberrantes. La dinámica del porcentaje promedio de las formas típicas de *Blastocystis* spp., observadas en los 6 días de seguimiento de los cultivos se muestra en la Figura 3.

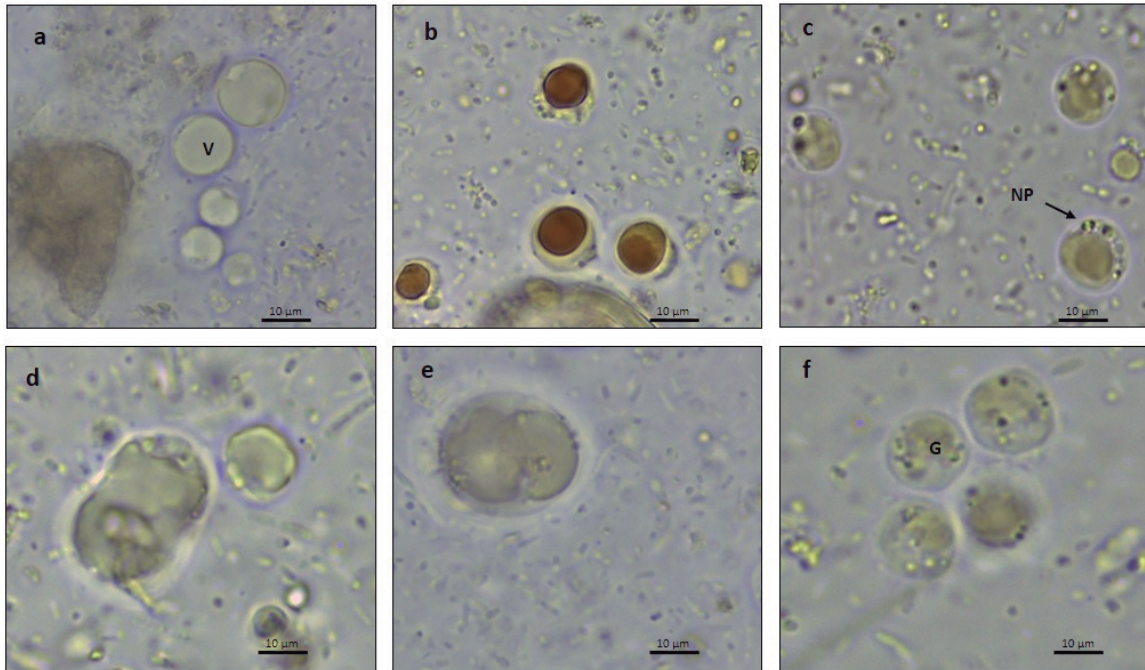


Figura 1. Fotografías obtenidas con un microscopio óptico en preparación húmeda de los diferentes morfotipos de *Blastocystis* spp. observados en cultivo. Formas vacuolares en los cultivos del día 1 (a y b) (b. con Lugol) y del día 2 (c). Formas en división en el cultivo del día 2 (d) y del día 3 (e). Formas granulares (f) en cultivo del día 3.

V: vacuola; NP: núcleos periféricos

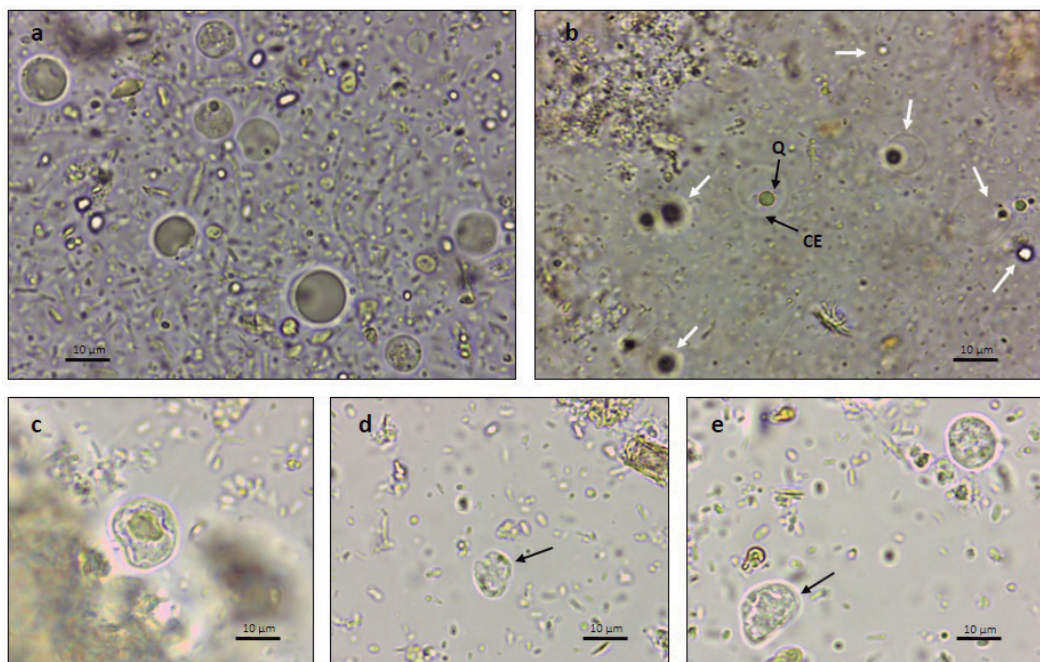


Figura 2. Fotografías obtenidas con un microscopio óptico en preparación húmeda de los diferentes morfotipos de *Blastocystis* spp. observados en cultivo. Numerosas formas vacuolares y granulares en el cultivo del día 4 (a). Formas quísticas en el cultivo del día 5 (b). Las flechas blancas indican quistes en distintos planos. Formas atípicas en el cultivo del día 3 (c, d y e); formas compatibles con ameboides (flechas en d y e).

CE: cubierta externa; Q: cuerpo del quiste refringente.

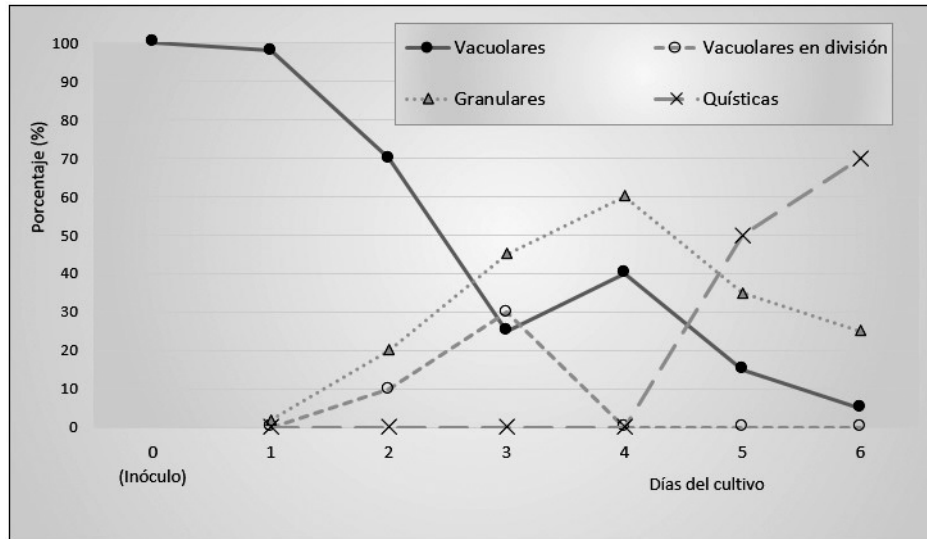


Figura 3. Dinámica del porcentaje de los morfotipos de *Blastocystis* spp. observados en el cultivo en medio Pavlova adaptado durante 6 días.

Discusión y Conclusiones

En el presente estudio se observó que las formas de *Blastocystis* obtenidas en el cultivo *in vitro* fueron claramente identificables. Las formas vacuolares se desarrollaron en distintos tamaños y la mayoría en un tamaño mayor (15 a 20 μm) al observado en la materia fecal inoculada (10 μm); el medio se fue enriqueciendo con formas granulares y el desarrollo abundante de formas quísticas permitió la identificación inequívoca de este morfotipo, que no se halla con frecuencia en las muestras fecales. De esta manera, el medio de cultivo aumentó no sólo el número de formas parasitarias, sino también el tamaño y la variedad de las mismas, lo que facilitó su determinación por microscopía óptica. La identificación de formas ameboides fue muy dudosa dado que sólo se observaron dos estructuras morfológicamente compatibles, pero que no evidenciaron movimiento. El aumento en la proporción de formas granulares durante el cultivo ocurriría en correspondencia con el agotamiento de los nutrientes (7). Lo mismo sucede con la aparición de los quistes que son la forma de resistencia en un medio empobrecido.

Según Irikov *et al.* (8), el tiempo de generación en el medio Pavlova es de 21,5 horas. La dinámica observada en el cultivo ensayado mostró las formas en división a las 48 h con una mayor proporción a las 72 h. Sólo se pudo evidenciar la reproducción por fisión binaria. Otros autores (7) (9) han informado, además de la reproducción binaria, procesos como la gemación o la esquizogonia, pero las observaciones en el presente estudio fueron realizadas por microscopía óptica convencional y la resolución necesaria para detectar deta-

lles sobre mecanismos reproductivos puede haber sido insuficiente.

En el cultivo de día 4 se hallaron formas variadas y abundantes y sería una buena elección para estudios moleculares. Esto estaría en concordancia con algunos autores que informaron que el recuento máximo de células de *Blastocystis* en cultivos se observa en los días 3 a 5 (8). El día 5 el cultivo se enriqueció en formas quísticas, consideradas las formas infectantes y esta información es importante si se pretende obtener inóculos para realizar ensayos de infección experimental.

Existen numerosas técnicas de cultivo de *Blastocystis*: medio de Boeck-Drbohlav modificado (MBDM), de Locke, medio de Dulbecco modificado de Iscove, medio de Robinson, TYSGM-9 y medio de Jones, entre otros; con diferencias en cuanto a composición, condiciones de incubación y resultados. La utilidad del cultivo en el diagnóstico de *Blastocystis* ha sido demostrada por distintos investigadores en todo el mundo (10) (11) y para algunos autores es una técnica de detección más sensible que las observaciones microscópicas fecales y los métodos de concentración (10), pero menos sensible que la PCR (12). Esto indica que no todas las muestras con *Blastocystis* darán cultivos positivos. Las razones de este comportamiento no están claras, se especula que podría existir una dependencia del crecimiento del parásito con la composición de la microbiota de cada individuo (13) y, además, se sabe que *Blastocystis* spp. puede alterarse fácilmente en las muestras de materia fecal, lo que reduciría las posibilidades de que se replique y sea detectable en cultivo (12); estas variables podrían explicar la falta de desarrollo en dos de las muestras ensayadas.

Blastocystis es considerado un microorganismo anaerobio, pero su desarrollo en un medio de cultivo sin aplicar sistemas de anaerobiosis simplifica en gran medida el procedimiento. Se sabe que las bacterias anaerobias facultativas, presentes en las heces en cultivo, aportan un ambiente anaeróbico que favorece el crecimiento de *Blastocystis* (7). Por otra parte, Tsaousis *et al.* (14) afirmaron que el genoma de *Blastocystis* codifica una oxidasa alternativa y que, a través de ella, puede llevar a cabo el proceso de respiración y esto podría explicar que se adapte a las condiciones establecidas en el medio Pavlova.

Estudios para la detección de *Blastocystis* realizados en muestras de heces humanas mediante microscopía, cultivo y PCR concluyeron que cuando se aplica solamente microscopía, más de la mitad de los resultados son falsamente negativos. La tasa más alta de positividad se obtuvo mediante PCR, pero cuando se empleó microscopía y cultivo se detectó un mayor número de infecciones por *Blastocystis* (7). Si se considera que la mayoría de las muestras de heces presentan *Blastocystis* pequeños y escasos (15), lo que puede conducir a resultados falsamente negativos, el procedimiento coproparasitológico sumado al cultivo Pavlova adaptado podría mejorar la identificación de *Blastocystis* en laboratorios de menor complejidad.

El cultivo *in vitro* ensayado es sencillo en composición y condiciones de incubación, aplicable en cualquier laboratorio bioquímico y ha demostrado un buen rendimiento con una dinámica de generación de las formas de *Blastocystis* en un tiempo breve, algo muy importante cuando se debe informar un resultado de laboratorio.

Se concluye que el cultivo a corto plazo en medio Pavlova adaptado puede ser una herramienta útil para la detección de *Blastocystis* cuando existan dudas diagnósticas por microscopía, para estudios de sensibilidad y especificidad diagnóstica o cuando se requiera aumentar la carga para realizar estudios biológicos, bioquímicos o moleculares.

Fuentes de financiación

El presente trabajo ha sido financiado con los fondos recibidos para el Proyecto de Grupo de Investigación (PGI) "Especies *Blastocystis*: validación de pruebas diagnósticas y asociación con el estado salud-enfermedad". Código 24/B239. Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia. Secretaría de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional del Sur. Dirigido por la Dra. Elena Concepción Visciarelli y codirigido por el Dr. Marcelo Occhionero.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dra. ELENA CONCEPCIÓN VISCIARELLI
Cátedra de Parasitología Clínica. Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur, San Juan 670. (8000) BAHÍA BLANCA, Argentina.
Correo electrónico: evisciar@criba.edu.ar, dra.elenavisciarelli@gmail.com

Referencias bibliográficas

1. Cian A, El Safadi D, Osman M, Moriniere R, Gantois N, Benamrouz-Vanneste S, *et al.* Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two french zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS ONE* 2017; 12 (1): e0169659.
2. Zhang X, Zhang S, Qiao J, Wu X, Zhao L, Liu Y, *et al.* Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 2012; 110 (3): 1165-72.
3. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21 (4): 639-65.
4. Mohammad NA, Mastuki MF, Al-Mekhlafi HM, Mokhtar N, Anuar TS. Comparative study of Wheatley's trichrome stain and *in-vitro* culture against PCR assay for the diagnosis of *Blastocystis* sp. in stool samples. *Iran J Parasitol* 2018; 13 (1): 127-36.
5. 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.
6. Zerpa L, Huicho L, Naquira C, Espinoza I. A simplified culture method for *Blastocystis hominis*. *Rev Mex Patol Clin* 2000; 47 (1): 17-9.
7. Padukone S, Mandal J, Rajkumari N, Bhat BV, Swaminathan RP, Parija SC. Detection of *Blastocystis* in clinical stool specimens using three different methods and morphological examination in Jones' medium. *Trop Parasitol* 2018; 8 (1): 33-40.
8. Irikov OA, Antokhin AI, Romanov YA. Study of the dynamics of *Blastocystis hominis* reproduction *in vitro*. *Bull Exp Biol Med* 2009; 148 (1): 99-102.
9. Yamada M, Yoshikawa H. Morphology of human and animal *Blastocystis* isolates with special reference to reproductive modes. En: Mehlhorn H, Tan KS, Yoshikawa H, editores. *Blastocystis: pathogen or passenger? an evaluation of 101 years of research*. New York, Berlin, Heidelberg: Springer; 2012. p. 9-35.
10. Eida AM, Eida MM. Identification of *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome using microscopy and culture compared to PCR. *Parasitol United J* 2008; 1 (2): 87-92.
11. Hassan MA, Rizk EM, Wassef RM. Modified culture methodology for specific detection of *Blastocystis hominis* in stool samples. *J Egypt Soc Parasitol* 2016; 46 (3): 541-8.

12. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Mølbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59 (3): 303-7.
13. Clark CG, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Rev Clin Microbiol* 2002; 15: 329-41.
14. Tsaousis AD, Hamblin KA, Elliott CR, Young L, Rosell-Hidalgo A, Gourlay CW, *et al.* The human gut colonizer *Blastocystis* respire using complex II and alternative oxidase to buffer transient oxygen fluctuations in the gut. *Front Cell Infect Microbiol* 2018 Oct 22; 8: 371.
15. Visciarelli EC, Basabe NE, Pedersen D, Randazzo VR, Lucchi LD, Muñoz JI, *et al.* *Blastocystis*: estudio coproparasitológico, clínico-epidemiológico y de prevalencia de subtipo 3 en pacientes de hospitales de Bahía Blanca, Argentina. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2021; 55 (2): 195-206.

Recibido: 14 de diciembre de 2021

Aceptado: 12 de julio de 2022