



Laura Sante Fernández
Patricia Capón González
Antonio Moreno Flores
Patricia Coira Marín
Pilar Alonso García

Microscopía vs. biología molecular en el diagnóstico de infecciones protozoarias intestinales, ¿es el momento del cambio?

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Lucus Augusti (Lugo), España

Article history

Received: 18 August 2022; Revision Requested: 21 October 2022; Revision Received: 22 October 2022;
Accepted: 27 October 2022; Published: 1 December 2022

RESUMEN

Introducción. El examen microscópico de las parasitosis intestinales, a partir de las heces concentradas del paciente, presenta una menor sensibilidad si se compara con las técnicas de diagnóstico molecular. Por ello, el objetivo del presente estudio ha sido comparar ambas técnicas, así como evaluar si existe correlación entre el examen microscópico y los ciclos umbrales (Ct) obtenidos para *Blastocystis hominis*.

Material y métodos. Estudio retrospectivo de las muestras recibidas en el laboratorio de Microbiología durante septiembre de 2021. Se realizó la prueba de concentración MiniParasep SF® para la visualización microscópica y posteriormente se realizó la PCR con el panel Seegene Allplex™ Parasite Assay.

Resultados. Un 27% (n=74) de las muestras fueron positivas por diagnóstico molecular, con un total de 87 parásitos detectados. El 53% (n=39) fueron mujeres con una edad media de 47 ± 24 años. En el 76% (n=56) de los casos el servicio de procedencia fue Atención Primaria. El parásito hallado con más frecuencia fue *B. hominis*, 85% (n=64), seguido de *Dientamoeba fragilis* 20% (n=15) y *Giardia lamblia* 11% (n=8). En 13 casos se detectaron co-infección por dos parásitos (en 6 casos *B. hominis* + *D. fragilis*, y en 7 casos *B. hominis* + *G. lamblia*). En el diagnóstico microscópico se obtuvo un 9,5% (n=26) de positividad. El parásito hallado con más frecuencia fue *B. hominis*, 84% (n=23), seguido de *G. lamblia* se visualizó en tres casos por microscopía. *D. fragilis* no se visualizó en ningún caso. En una muestra se observó coinfección de *B. hominis* + *G. lamblia*.

Conclusiones. Las técnicas para el diagnóstico molecular de las parasitosis intestinales son rápidas, fiables y más sensibles que las técnicas microscópicas, mejorando el diagnóstico microbiológico y la calidad asistencial.

Palabras clave: parasitosis intestinal, microscopía, PCR, *Blastocystis hominis*

Microscopy vs. molecular biology in the diagnosis of intestinal protozoal infections, is it time for a change?

ABSTRACT

Introduction. Microscopic examination of the intestinal parasites, from the patient's concentrated feces, has a lower sensitivity when compared to molecular diagnostic techniques. Therefore, the objective of this study has been to compare both techniques, as well as to evaluate whether there is a correlation between the microscopic examination and the threshold cycles (Ct) obtained for *Blastocystis hominis*.

Material and methods. Retrospective study of the samples received in the Microbiology laboratory during September 2021. The MiniParasep SF® concentration test was performed for microscopic visualization and then PCR was performed with the Seegene Allplex™ Parasite Assay panel.

Results. A 27% (n=74) of the samples were positive by molecular diagnosis, with a total of 87 parasites detected. 53% (n=39) were women with a mean age of 47 ± 24 years. In 76% (n=56) of the cases the service of origin was Primary Care. The most frequently found parasite was *B. hominis*, 85% (n=64), followed by *Dientamoeba fragilis* 20% (n=15) and *Giardia lamblia* 11% (n=8). Co-infection by two parasites was detected in 13 cases (*B. hominis* + *D. fragilis* in 6 cases, and *B. hominis* + *G. lamblia* in 7 cases). In the microscopic diagnosis, 9.5% (n=26) positivity was obtained. The most frequently found parasite was *B. hominis*, 84% (n=23), followed by *G. lamblia*, which was seen in three cases by microscopy. *D. fragilis* was not seen in any case. Coinfection of *B. hominis* + *G. lamblia* was observed in one sample.

Conclusions. Techniques for molecular diagnosis of intestinal parasites are fast, reliable and more sensitive than microscopic techniques, improving microbiological diagnosis and quality of care.

Keywords: intestinal parasitosis, microscopy, PCR, *Blastocystis hominis*

Correspondencia:

Laura Sante Fernández

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Lucus Augusti (Lugo).

C/ Rúa Dr. Ulises Romero, 1. C.P.: 27003, Lugo, España

E-mail: laurasante@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales presentan una alta prevalencia en áreas tropicales y países en desarrollo, pero también son frecuentes en países industrializados. Estas infecciones suponen un importante problema de salud pública global [1,2]. En España se estima que las parasitosis intestinales suponen el 10% de las diarreas infecciosas [3] y que su incidencia está aumentando, como es el caso de las criptosporidiosis, con un incremento del 175% en 2018 con respecto al año anterior [4]. El Sistema de Información Microbiológica (SIM) recoge datos sobre estas infecciones, pero las cifras son aproximadas y la incidencia actual está infraestimada, ya que las parasitosis intestinales no son enfermedades de declaración obligatoria y hay muchos casos asintomáticos que no se han filiado [4].

En el intestino del ser humano es posible detectar las especies de protozoos patógenas reconocidas (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*), y otras de menor, o incluso, controvertida patogenicidad (*Dientamoeba fragilis*, *Blastocystis hominis*) [5-7]. *Cryptosporidium* spp., *G. lamblia* y *E. histolytica* se consideran los agentes causantes de diarrea de origen protozoario más relevantes en todo el mundo. Estas tres especies representan el 70% de las muestras positivas para cualquier parásito intestinal diagnosticadas en hospitales europeos anualmente [8].

Tradicionalmente, el diagnóstico se ha realizado mediante examen microscópico, tras concentración de las heces del paciente. Esta técnica muestra una baja sensibilidad, exige la toma de muestras seriadas que son laboriosas en cuanto al procesamiento y requieren de cierta especialización para su visualización. En los últimos años, el avance en el estudio molecular ha posibilitado el desarrollo del diagnóstico microbiológico, mejorando el manejo clínico, permitiendo el seguimiento de los tratamientos y facilitando los estudios epidemiológicos [9].

En este estudio, realizamos una comparativa entre el diagnóstico microscópico y el diagnóstico molecular de las parasitosis protozoarias intestinales. Los objetivos fueron, comparar el diagnóstico parasitológico microscópico frente al molecular, así como, comparar la concentración microscópica de *B. hominis* (número/campo) con el ciclo umbral (Ct, siglas en inglés de Cycle threshold) de la PCR para observar una posible correlación entre la visualización microscópica y la carga parasitaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo en el área sanitaria del Hospital Universitario Lucus Augusti (Lugo, España) de las muestras recibidas en el laboratorio de Microbiología durante el mes de septiembre de 2021. Se incluyó una muestra por paciente y episodio, independientemente del servicio peticionario, edad y/o sexo, con solicitud de estudio parasitológico. Se realizó la prueba de concentración MiniParasep SF® para la visualización microscópica. En las muestras positivas se

valoró el número de parásitos/campo (40x) para su cuantificación. Posteriormente todas las muestras fueron congeladas a -80 °C para, en un segundo diagnóstico, realizar PCR con el panel Seegene Allplex™ Parasite Assay que detecta *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis*, *E. histolytica*, *D. fragilis* y *B. hominis*.

RESULTADOS

Se incluyeron 278 pacientes, de los cuales 160 (57,5%) fueron mujeres, siendo la edad media de 47 ± 27 años. Los servicios de procedencia fueron principalmente Atención Primaria (69,4%), seguido de la consulta de Digestivo (10%), Urgencias (6,4%), consulta de Medicina Interna (3,5%) y consulta de Alergología (2,5%) (Figura 1).

Un 27% (n=74) de las muestras fueron positivas por diagnóstico molecular, con un total de 87 parásitos detectados. El 53% (n=39) fueron mujeres con una edad media de 47 ± 24 años. En el 76% (n=56) de los casos el servicio de procedencia fue Atención Primaria. El parásito hallado con más frecuencia fue *B. hominis*, 85% (n=64), seguido de *D. fragilis* 20% (n=15) y *G. lamblia* 11% (n=8). En 13 casos se detectaron co-infección por dos parásitos (En 6 casos *B. hominis* + *D. fragilis*, y en 7 casos *B. hominis* + *G. lamblia*).

En el diagnóstico microscópico se obtuvo un 9,5% (n=26) de positividad. El parásito hallado con más frecuencia fue *B. hominis*, 84% (n=23), seguido de *G. lamblia* se visualizó en tres casos por microscopía. *D. fragilis* no se visualizó en ningún caso. En una muestra se observó coinfección de *B. hominis* + *G. lamblia*.

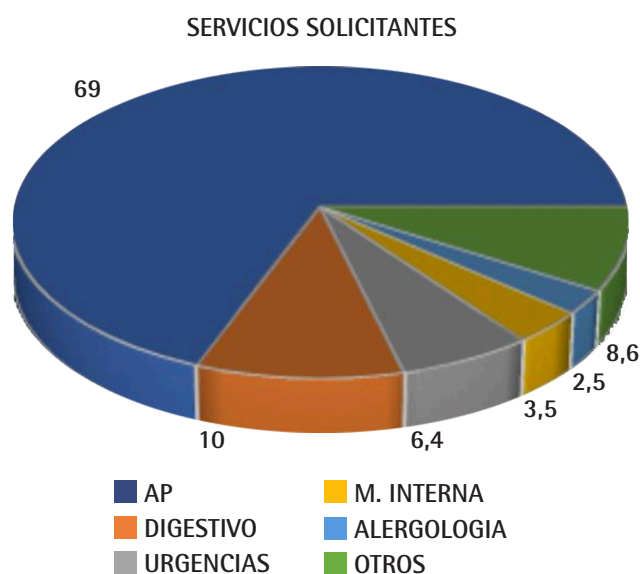


Figura 1 Servicios solicitantes de estudio parasitológico en heces (datos en porcentaje).

Tabla 1 Comparación de la microscopía vs Ct de la PCR			
Ct	PCR +	Microscopía +	% ++
< 20-30	58	25	36
30-40	29	1	3

++: porcentaje de positivos por PCR y microscopio.

En la tabla 1 se muestran los resultados del diagnóstico molecular y del recuento microscópico. En el caso de la microscopía, en todas las preparaciones se observaron <5 parásitos/campo.

DISCUSIÓN

Pese a que se trata de microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza [10-12], existen pocos estudios que describan la prevalencia de las parasitosis intestinales, tanto en nuestra área geográfica como en el resto de España. Al no tratarse de enfermedades de declaración obligatoria, su prevalencia e incidencia reales probablemente se encuentren infravaloradas [4]. Además, los diferentes protocolos de diagnóstico que existen entre los laboratorios de Microbiología dificultan la comparación entre las diferentes zonas de salud.

En nuestro estudio se describe un mayor número de diagnósticos de parasitosis intestinal en mujeres de edad adulta procedentes de Atención Primaria. Sin embargo, en el SIM, los casos declarados mayormente son varones en edad pediátrica [4]. Estas diferencias probablemente se deban a la selección aleatoria de pacientes llevada a cabo en este estudio.

Los protozoos intestinales más frecuentes en España son *G. lamblia*, *B. hominis*, *Cryptosporidium* spp. y *E. histolytica* (procedente de zonas tropicales) [3]. En nuestra área sanitaria, el microorganismo más frecuentemente identificado fue *B. hominis*, seguido de *D. fragilis* y *G. lamblia*. En ningún caso se diagnosticó *Cryptosporidium* spp., probablemente debido al escaso número de pacientes pediátricos incluidos en el estudio (n=36, 13%) y a unas correctas pautas de tratamiento administrado en pacientes inmunodeprimidos. Así mismo, tampoco se obtuvo ningún resultado positivo para *E. histolytica*, debido probablemente a la baja tasa de inmigración en nuestra zona.

Al comparar el diagnóstico convencional por microscopía con el diagnóstico molecular, se observó un mayor diagnóstico de parásitos intestinales al emplear la PCR, como se describió anteriormente en otros estudios publicados [13]. Teniendo en cuenta que en los países industrializados, en los que las tasas de infección por parásitos entéricos en la población autóctona son típicamente bajas o muy bajas [14], la sensibilidad de las técnicas de detección adquiere una relevancia crítica. Este hecho, unido a los elevados costes laborales, al incremento constante en el volumen de muestras y peticiones diagnósticas, así como a la necesidad de optimizar los flujos de trabajo de los laboratorios de Microbiología Clínica, hace necesario un cambio ra-

dical en la estrategia diagnóstica a adoptar [15,16]. Con estas técnicas, además de mejorar considerablemente el rendimiento diagnóstico de la microscopía, se consigue un elevado grado de automatización, posibilitando así la comparación de resultados, permitiendo el estudio de la prevalencia en la población, el cribado de muestras en estudios epidemiológicos y la caracterización molecular de los microorganismos.

Por otro lado, con las técnicas de diagnóstico molecular se podrían sobreestimar el diagnóstico parasitológico de aquellos pacientes que están colonizados por parásitos intestinales de patogenidad incierta, como es el caso de *B. hominis*. Aunque su patogenidad es cuestionada por algunos autores, hay estudios que relacionan este protista con diversos trastornos intestinales (incluyendo síndrome de colon irritable) y urticaria [9]. Algunos autores señalan que el parásito debe señalarse como responsable de las manifestaciones clínicas en todo paciente que cumpla con los siguientes criterios: *Blastocystis* spp. en muestra fecal (>5 formas parasitarias/campo); presencia de formas de cuerpo central grandes (>10 µm) en ausencia de otras causas parasitarias, virales, bacterianas o funcionales que expliquen la sintomatología y desaparición de los síntomas después del tratamiento antiparasitario específico [17]. Otros autores, basándose en sus propios resultados, destacan el valor del Ct como marcador de corte entre colonización e infección [18]. En nuestro estudio, se valoró el Ct obtenido en la PCR y su correlación con la visualización microscópica (Tabla 1), pudiendo observarse un mayor rendimiento diagnóstico cuando se emplean las técnicas de diagnóstico molecular. Dicho rendimiento alcanzó valores del 67% en los casos en que el Ct fue mayor o igual a 30, demostrando la gran utilidad de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico de las parasitosis intestinales. No obstante, son necesarios más estudios para poder utilizar el valor del Ct en la predicción del estado de colonización/infección de un paciente. Por todo ello, consideramos que se deben realizar más estudios estandarizados sobre el empleo de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico de las infecciones parasitarias intestinales.

En conclusión, el ensayo Seegene Allplex™ GI-Parasite Assay permitió la detección rápida, más sensible y fiable de los principales protozoos intestinales, así como una reducción en la carga de trabajo y una disminución significativa en el tiempo hasta la obtención de un resultado. Puede implementarse en un flujo de trabajo rutinario como ensayo principal y tiene amplias ventajas en un entorno con una alta tasa de detección negativa.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este trabajo.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Binnicker MJ. Multiplex Molecular Panels for Diagnosis of Gastrointestinal Infection: Performance, Result Interpretation, and Cost-Effectiveness. *J Clin Microbiol*. 2015 Dec;53(12):3723-8. doi: 10.1128/JCM.02103-15
- 2 Humphries RM, Linscott AJ. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Diagnosis of Bacterial Gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jan;28(1):3-31. doi: 10.1128/CMR.00073-14..
- 3 Martín del Barco ÓH, Álvarez Manzanares P, López Izquierdo R. Parasitosis intestinal. *FMC Formación Médica Continuada en Atención Primaria*. 2009;16(1):14-24. doi: 10.1016/S1134-2072(09)70098-2.
- 4 Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. 2017-2018. 2021. doi: 10.4321/repisalud.11822.
- 5 Álvarez Martínez MJ, Belhassen García M, Flores Chávez MD, Pérez de Ayala A, Sulleiro E. Diagnóstico de parasitosis importadas en España, Procedimientos en Microbiología Clínica núm. 69, Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), 2020. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento69.pdf>
- 6 Stark D, Barratt J, Chan D, Ellis JT. *Dientamoeba fragilis*, the Neglected Trichomonad of the Human Bowel. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Jul;29(3):553-80. doi: 10.1128/CMR.00076-15.
- 7 Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog*. 2014 May 28;6:17. doi: 10.1186/1757-4749-6-17
- 8 Laude A, Valot S, Desoubreux G, Argy N, Nourrisson C, Pomares C, Machouart M, Le Govic Y, Dalle F, Botterel F, Bourgeois N, Cateau E, Letierrier M, Le Pape P, Morio F. Is real-time PCR-based diagnosis similar in performance to routine parasitological examination for the identification of *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*/*Cryptosporidium hominis* and *Entamoeba histolytica* from stool samples? Evaluation of a new commercial multiplex PCR assay and literature review. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Feb;22(2):190.e1-190.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2015.10.019
- 9 Dacal E, Köster PC, Carmena D. Diagnóstico molecular de parasitosis intestinales. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2020 Jan;38 Suppl 1:24-31. English, Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2020.02.005.
- 10 Reboredo-Fernández A, Ares-Mazás E, Cacciò SM, Gómez-Couso H. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). *Parasitology*. 2015 Jun;142(7):917-25. doi: 10.1017/S0031182015000049.
- 11 Díaz P, Quílez J, Prieto A, Navarro E, Pérez-Creo A, Fernández G, Panadero R, López C, Díez-Baños P, Morrondo P. *Cryptosporidium* species and subtype analysis in diarrhoeic pre-weaned lambs and goat kids from north-western Spain. *Parasitol Res*. 2015 Nov;114(11):4099-105. doi: 10.1007/s00436-015-4639-0.
- 12 Castro-Hermida JA, González-Warleta M, Mezo M. *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* as pathogenic contaminants of water in Galicia, Spain: the need for safe drinking water. *Int J Hyg Environ Health*. 2015 Jan;218(1):132-8. doi: 10.1016/j.ijheh.2014.09.001.
- 13 Avolio M, Tedeschi R, Camporese A. Diagnosis of Acute Gastrointestinal Infections in Hospitalized Patients: A Molecular-Based Screening Approach. *J Med Diagn Meth*. 2019;8:1-6
- 14 Fletcher SM, Stark D, Harkness J, Ellis J. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Jul;25(3):420-49. doi: 10.1128/CMR.05038-11.
- 15 Verweij JJ. Application of PCR-based methods for diagnosis of intestinal parasitic infections in the clinical laboratory. *Parasitology*. 2014 Dec;141(14):1863-72. doi: 10.1017/S0031182014000419.
- 16 van Lieshout L, Roestenberg M. Clinical consequences of new diagnostic tools for intestinal parasites. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Jun;21(6):520-8. doi: 10.1016/j.cmi.2015.03.015.
- 17 Devera R, Velasquez A. V, Vásquez M, Azacón B, Jiménez M, *Blastocystis hominis*: criterios de patogenicidad, Saber, Univ. Oriente, Venez. 2000;12(2):23-28.
- 18 Fernandez-Suarez J, Boga J, Rodriguez-Guardado A, Sabater C, Fernández-Blazquez A, Leal A, In: e-Poster of 27th Congress ECCMID, Viena, Austria, 2016. "Blastocystis hominis and PCR : contributions and doubts,"