

Prueba de susceptibilidad antiparasitaria in vitro para *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica*-*E. dispar*, *Balantidium coli*

In vitro antiparasite susceptibility test for *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica*-*E. dispar*, *Balantidium coli*

Rito Zerpa Larrauri^{1,2}, Yrma Espinoza Blanco¹, Alina Floralia Huiza Franco¹

¹ Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión", Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

² Instituto Especializado de Salud del Niño.

Resumen

Antecedentes: Pruebas de susceptibilidad antiparasitaria in vitro para *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica*-*E. dispar* y *Balantidium coli*, así como el cultivo para protozoarios intestinales, han sido publicados escasamente en la literatura médica. En nuestro medio aún no se ha comunicado pruebas de susceptibilidad in vitro para los parásitos mencionados. **Objetivos:** Plantear una alternativa de prueba de susceptibilidad antiparasitaria in vitro y conocer su resistencia frente a los antimicrobianos. **Diseño:** Estudio prospectivo, descriptivo. **Instituciones:** Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión", Universidad Nacional Mayor de San Marcos, e Instituto Especializado de Salud del Niño, Lima, Perú. **Material biológico:** Cultivos de *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica*-*E. dispar* y *Balantidium coli* frente a cinco antimicrobianos. **Métodos:** Se trabajó con 64 cultivos de *Blastocystis hominis*, 16 de *Entamoeba histolytica*-*E. dispar* y 16 de *Balantidium coli*, frente a cinco antimicrobianos: metronidazol, cotrimoxazol, tetraciclina, furazolidona y ciprofloxacina. Las cepas de *B. hominis*, *E. histolytica*-*E. dispar* fueron cultivadas en el medio de Pavlova modificado, de 500 muestras de heces de niños con diagnóstico de parasitosis intestinal y las de *B. coli* de heces de cerdo. Las pruebas de susceptibilidad in vitro se realizaron con el método de microcultivos en el medio de Pavlova modificado, en pocitos con 200 uL del medio sin antiparasitarios (control) y con antiparasitarios en 10 concentraciones, desde 128 ug/mL hasta 0,25 ug/mL; luego de incubación a 36° C por 48 horas, la lectura por examen microscópico directo comparó el desarrollo en el medio control con el desarrollo en los pocitos conteniendo los antimicrobianos. **Principales medidas de resultados:** Concentración inhibitoria mínima (CIM). **Resultados:** Se encontró para *B. hominis*, con metronidazol CIM 90: 64 ug/mL y CIM 50: 2 ug/mL; para *E. histolytica*-*E. dispar* con metronidazol, CIM 90: 1 ug/mL y CIM 50: 0,5 ug/mL; para *B. coli* con tetraciclina, CIM 90: 0,25 ug/mL y CIM 50: 0,25 ug/mL. **Conclusiones:** Estos datos preliminares, a ser validados, muestran un comportamiento de las cepas de los parásitos mencionados, y es una alternativa de utilidad potencial (en caso de ser validada) para su aplicación en el tratamiento dirigido contra los protozoarios estudiados, así como en la vigilancia de resistencia.

Palabras clave: Prueba de susceptibilidad antiparasitaria, concentración inhibitoria mínima, protozoarios.

Abstract

Background: In vitro antiparasite susceptibility test for *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica*-*E. dispar* y *Balantidium coli*, as well as intestinal protozoaria cultures, have rarely been reported in the medical literature. In vitro susceptibility tests for those parasites have not been published locally. **Objectives:** To determine an alternative in vitro antiparasite susceptibility test and its resistance to antimicrobials. **Design:** Prospective, descriptive study. **Settings:** Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión", Universidad Nacional Mayor de San Marcos, and Instituto Especializado de Salud del Niño, Lima, Peru. **Biologic material:** *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica*-*E. dispar* and *Balantidium coli* cultures against five antimicrobials. **Methods:** Sixty-four *Blastocystis hominis*, 16 *Entamoeba histolytica*-*E. dispar* and 16 *Balantidium coli* cultures were used against five antimicrobials: metronidazole, cotrimoxazole, tetracycline, furazolidone and ciprofloxacin. *B. hominis*, *E. histolytica*-*E. dispar* strains were cultured in modified Pavlova's media, from 500 feces samples of children with intestinal parasitosis diagnosis, and *B. coli* from pig feces. In vitro susceptibility tests were done by microculture methods in modified Pavlova's media, in 200 uL media little pools without antiparasites (control) and with antiparasites in 10 concentrations going from 128 ug/mL through 0,25 ug/mL; after incubation at 36° C for 48 hours, direct microscope exam reading compared development in control media and pools containing antimicrobials. **Main outcome measures:** Minimum inhibiting concentration (MIC). **Results:** For *B. hominis* with metronidazole CIM 90 was 64 ug/mL and CIM 50: 2 ug/mL; for *E. histolytica*-*E. dispar* with metronidazole, CIM 90: 1 ug/mL and CIM 50: 0.5 ug/mL; for *B. coli* with tetracycline, CIM 90: 0.25 ug/mL and CIM 50: 0.25 ug/mL. **Conclusions:** This preliminar information to be validated showed strains behavior of mentioned parasites, and represents a potential alternative use (in case of validation) in treatment of studied protozoa, as well as in resistance surveillance.

Key words: Antiparasitary susceptibility test, minimum inhibiting concentration, protozoa.

INTRODUCCIÓN

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son de importancia médica, en muchos casos vitales para la salud del paciente. Conociendo el agente causal y su comportamiento frente a los antimicrobianos, permite un tratamiento dirigido contra los mismos con drogas a las cuales el microorganismo ha sido demostrado ser sensible. En la literatura médica especializada, las pruebas de susceptibilidad in vitro para los parásitos intestinales *B. hominis*, *E. histolytica* y *B. coli* han sido publicadas escasamente ⁽¹⁻⁶⁾. En los laboratorios de centros hospitalarios, usualmente no se realiza dichas pruebas para los parásitos mencionados. Stenzel y Boreham mencionan que *B. hominis* es un parásito anaerobio estricto, difícil para su aislamiento, costoso, requiere mucho tiempo y personal especializado ⁽¹⁾, lo cual se plantea como un factor limitante para estudiar al parásito; y la posibilidad de realizar pruebas de susceptibilidad antiparasitaria sería más difícil. Asimismo, no se menciona usualmente las pruebas referidas (in vitro) para los otros parásitos intestinales mencionados. En nuestro medio se conoce algunas alternativas simples y de costo bajo para el cultivo de parásitos como *B. hominis* ⁽¹⁰⁾, aún no se ha publicado pruebas de susceptibilidad antiparasitaria in vitro.

El objetivo de nuestro estudio es presentar una prueba de susceptibilidad antiparasitaria in vitro que permita conocer el comportamiento de los pa-

rásitos mencionados frente a las drogas antiparasitarias, conocer la frecuencia de resistencia de los parásitos y averiguar las drogas a las cuales dichos parásitos son sensibles.

MÉTODOS

El presente es un estudio descriptivo observacional. En una primera etapa se realizó cultivos para estos protozoarios de 500 muestras de heces frescas de niños atendidos en el Instituto Especializado de Salud del Niño, con diagnóstico clínico de parasitosis intestinal, logrando 64 cultivos positivos de *B. hominis*, 16 de *E. histolytica*-*E. dispar* y se complementaron otras 16 de *B. coli* con el cultivo de muestras fecales de cerdos. Los cultivos positivos de los protozoarios mencionados fueron mantenidos con repicajes cada 3 días, utilizando el medio de Pavlova modificado ⁽¹⁰⁾.

En una segunda etapa, se procedió a realizar las pruebas de susceptibilidad antiparasitaria con los antimicrobianos utilizados para cada uno de estos microorganismos, trabajando por el método de microcultivos descrito por el primer autor ⁽¹¹⁾, en el medio de Pavlova modificado, sin y con los antimicrobianos correspondientes: metronidazol, furazolidona, tetraciclina, ciprofloxacina y norfloxacina, de la marca Sigma, y trimetoprim/sulfametoxazol, conseguido como medicamento (*Septtrin*). Fueron preparados con los disolventes y diluyentes correspondientes ⁽¹²⁾ y se agregó

estas en el medio de Pavlova modificado, de manera de tener 10 concentraciones de cada droga, desde 128 ug/mL hasta 0,25 ug/mL, para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), en forma similar a métodos utilizados en el estudio de bacterias (método de dilución en caldo). El inóculo fue preparado a partir de un cultivo de 48 horas en el medio de Pavlova modificado; una gota de la suspensión de los parásitos *B. hominis*, *E. histolytica* (20 uL) fue depositada con un dispensador en cada uno de los medios sin antimicrobianos (como control) y con antimicrobianos, en las diferentes concentraciones y previamente calentados a 42°C por 15 minutos, lo cual también es posible realizar a 36°C por ½ hora. Para el caso de *B. coli*, se tomó en consideración incrementar la luz de la punta utilizada con el dispensador. La lectura se realizó luego de incubación a 36°C por 48 horas, por observación microscópica directa de 1 gota (20 uL) de los cultivos, con objetivos de 10x, comparando el desarrollo en el medio control con el desarrollo en los pocitos con los antimicrobianos, para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).

RESULTADOS

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad antiparasitaria con los antimicrobianos utilizados, se presenta en la tabla adjunta.

Tabla 1. Concentración Inhibitoria mínima de antimicrobianos en *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica-dispar* y *Balantidium coli*.

Parásitos	Antimicrobiano									
	Metronidazol		Furazolidona		Trimetoprim / Sulfametoxazol		Ciprofloxacina		Tetraciclina	
	CIM (µg/mL)		CIM (µg/mL)		CIM (µg/mL)		CIM (µg/mL)		CIM (µg/mL)	
	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%
<i>B. hominis</i> (n=64)	64	2	8	1	128	64	128	16	128	32
<i>E. histolytica-dispar</i> (n=16)	1	0,5	32	8	128	64	64	8	64	8
<i>B. coli</i> (n=16)	1	1	8	1	8	0,25	32	2	0,25	0,25

DISCUSIÓN

Según los resultados de las pruebas de susceptibilidad antiparasitaria con cinco antimicrobianos, se encontró para *B. hominis* con metronidazol CIM 90: 64 ug/mL y CIM 50: 2 ug/mL; para *E. histolytica* - *E. dispar* con metronidazol CIM 90: 1 ug/mL y CIM 50: 0,5 ug/mL; para *B. coli* con tetraciclina CIM 90: 0,25 ug/mL y CIM 50: 0,25 ug/mL. En la literatura médica se menciona como drogas útiles para el tratamiento de *B. hominis* al metronidazol y como alternativa al trimetoprim/sulfametoxazol ^(1,2). Sin embargo, según los resultados obtenidos en el presente estudio y de acuerdo a la CIM de este último antimicrobiano, no sería útil si se utilizara como tratamiento de los pacientes con las cepas aisladas; en cambio el metronidazol y furazolidona serían las drogas más adecuadas. Con respecto a *E. histolytica*-*E. dispar*, se encontró un resultado similar con el metronidazol y furazolidona. Para *B. coli*, la CIM 90 más baja correspondió a la tetraciclina, seguida del metronidazol y furazolidona. Estos datos preliminares, por validarse, muestran un comportamiento de

las cepas de los parásitos mencionados y se presentan como una alternativa de utilidad potencial para su aplicación en el tratamiento dirigido contra los protozoarios estudiados, así como en la vigilancia de resistencia.

En conclusión, la prueba de susceptibilidad antiparasitaria que se presenta para conocer el comportamiento de los parásitos *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica*-*E. dispar* y *Balantidium coli* frente a diversos antimicrobianos, constituye una alternativa (en caso de validarse) de utilidad potencial para su aplicación en el tratamiento contra los protozoarios, así como en la vigilancia de la resistencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stenzel DJ, Boreham PFL. *Blastocystis hominis*. Revisited. Clin Microbiol Rev. 1996;9:563-84.
2. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*—past and future. Clin Microbiol Rev. 1991;4:61-79.
3. Dunn LA, Boreham PFL. The in-vitro activity of drugs against *Blastocystis hominis*. J. Antimicrob Chemother. 1991;27(4):507-16.
4. Diamond LS, Bartgis IL. Axenic cultures for in vitro testing of drugs against *Entamoeba histolytica*. Arch Invest Med (Méx). 1971;2(Suppl 1):339-48.
5. Gillin FD, Diamond LS. Inhibition of clonal growth of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica* by

metronidazole, quinacrine and other antimicrobial agents. J Antimicrob Chemother. 1981;8:305-16.

6. Cedillo-Rivera R, Chávez B, Gonzalez-Robles A, Tapia A, Yépez-Mulia L. In vitro effect of nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites. J Eukaryotic Microbiol. 2002;49(3):201-8.
7. Fonte Galindo L, Fernández Ferrer M, Sánchez Valdés L, Marín Iglesias H y col. Eficacia antiamebiana del metronidazol demostrada en un estudio realizado en la provincia de Cienfuegos. Rev Cubana Med Trop. 2002;54(2):101-5.
8. Graham Clark C, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clin Microbiol Rev. 2002;15(3):329-41.
9. Diamond LS. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-like amebae. J Parasitol. 1968;54:1047.
10. Zerpa LR, Huicho L, Náquira C, Espinoza Y: A simplified culture method for *Blastocystis hominis*. Rev Mex Patol Clín. 2000;47(1):17-9.
11. Zerpa LR. Micrométodo para cultivo de *Blastocystis hominis*. Libro de Resúmenes del XIII Congreso Latinoamericano y IV Congreso Peruano de Patología Clínica, Lima Perú, 8 al 12 de noviembre de 1998. Pág. 103.
12. Anhalt JP, Washington II JA. Preparation and storage of antimicrobial solutions. En: Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (ed). Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. 1991:1199-1200. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Correspondencia:

Dr. Rito Zerpa Larrauri

Correo electrónico: rzerpa43@yahoo.com