

---

## ACTUALIZACION

---

### *Diagnóstico de protozoarios intestinales frecuentes en niños*

*Diagnostic of intestinal parasite in children*

**Dr.: Edgar Chávez Navarro\***

#### **Introducción**

La Organización Mundial de la Salud define que la diarrea es la segunda causa de morbilidad y mortalidad en menores de 5 años, dentro de este grupo de enfermedades se encuentran las producidas por parásitos intestinales, principalmente protozoarios intestinales, siendo los más importantes *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium*.

El diagnóstico de infecciones parasitarias a menudo es complicado, especialmente cuando el paciente no proviene de zonas endémicas o no tiene muchos factores de riesgo para adquirirlas. Dentro de la gran variedad de parásitos que afectan a niños, los protozoarios intestinales suelen ser de difícil identificación debido a factores como variaciones en la cantidad eliminada de sus formas de resistencia (quistes) o la detección de los trofozoitos no es posible por que las muestras no llegan a laboratorio en buenas condiciones.

La eosinofilia frecuentemente es considerada como indicador de parasitosis, pero esta se presenta en infecciones por helmintos, pero son pocos los protozoarios que se relacionan con la misma; este es un motivo más por el que surge la necesidad de contar con pruebas más orientadoras.

Las técnicas de diagnóstico parasitológico para protozoarios intestinales pueden dividirse en directas e indirectas. Las directas permiten observar al pará-

sito ya sea como trofozoito o quiste, en cambio las pruebas indirectas detectan antígenos del parásito o anticuerpos generados en el hospedero producto de la infección.

*Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*, son considerados como los protozoarios intestinales más frecuentes en niños, quedan otros que pueden coexistir con los antes mencionados o no ser tomados en cuenta debido a que el común de los laboratorios no informa su presencia o porque no solicitamos las pruebas correspondientes para evidenciarlos. Entre estos tenemos al *Cryptosporidium*, muy frecuentemente asociado a *Giardia lamblia*, también debemos considerar a *Ciclospora* y *Blastocystis hominis*, este último, cada vez mas mencionado como agente de cuadros diarreicos agudos dejando de lado la suposición que solo se trata de un comensal. A continuación se realiza un recordatorio breve de las características más importantes de estos parásitos.

#### **Criptosporidiosis**

Es una infección producida por un protozoario coccidio, del género *Cryptosporidium*, que afecta al aparato digestivo de varios vertebrados incluido el hombre, ocasionalmente encontrado en el epitelio respiratorio. (Ver figura #1).

*Giardia Lamblia* y *Cryptosporidium* son parásitos protozoarios muy frecuentes en niños y pueden aparecer en brotes de infecciones intestinales, general-

---

\* Médico Pediatra – Enfermedades Tropicales y Parasitarias  
Hospital Municipal Boliviano Holandés

mente asociados. En estos casos, el 90% ocurre por ingesta de agua contaminada y el 10% por alimentos contaminados. La transmisión directa entre persona y persona es muy importante en especial en guarderías o centros donde los niños están hacinados. Los brotes relacionados con ingesta de agua contaminada pueden deberse a piscinas contaminadas, ríos, estanques o lagos.

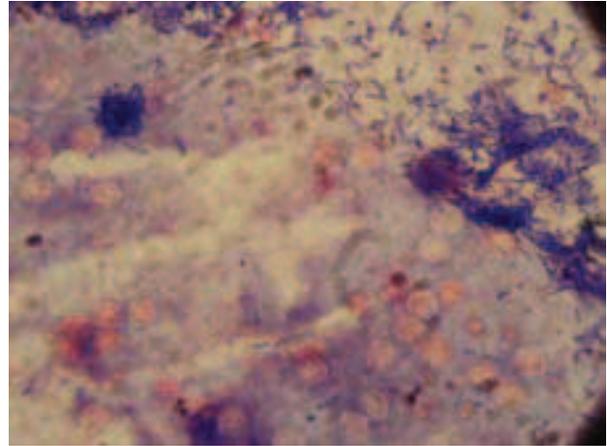
La especie más descrita en el hombre es el *Cryptosporidium parvum*, tiene etapas sexuadas y asexuadas que ocurren entre el hombre y el medio ambiente, que culminan con la formación del ooquiste, que es el elemento infectante de esta parasitosis. Este mide 4 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro y contiene 4 esporozoitos en su interior, que son liberados en tracto digestivo por acción del ácido clorhídrico y enzimas digestivas, estos terminan colonizando las células epiteliales del intestino y se multiplican en la zona apical de las microvellosidades intestinales. En esta fase comienzan la fase asexuada de su multiplicación, algunas de las células formadas se transforman en gametos masculino y femenino, con lo que comienza la fase sexuada, fecundándose el macrogameto (femenino) por el microgameto (masculino), formando así el ooquiste (forma infectante) que es eliminado con las heces fecales, siendo inmediatamente infectante.

En el ser humano es causante de diarrea, aunque el mecanismo de producción no está totalmente esclarecido. Estudios experimentales sugieren que la mala absorción de nutrientes es la causa de la misma, provocado por las alteraciones en las vellosidades y microvellosidades. Este proceso de mala absorción permitiría una sobrepoblación bacteriana que empeora el cuadro. También se menciona la posible existencia de una toxina aún no definida completamente. Se describe frecuentemente en niños menores de 5 años, teniendo mayor incidencia en el grupo de 2 años de edad.

La presentación del cuadro depende de la inmunocompetencia del paciente, pudiendo autolimitarse o ser portadores y diseminadores de esta parasitosis,

hasta cuadros severos de diarrea aguda o crónica en pacientes con SIDA.

**Figura # 1.** *Cryptosporidium* spp.



### Ciclosporiosis

Es la infección por un coccidio, *Cyclospora cayentensis* causante de un síndrome diarreico prolongado en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos. (Ver figura # 2).

Este síndrome diarreico ha sido descrito acompañado de anorexia y gran astenia en pacientes inmunocompetentes. Hasta el momento no se conoce completamente el ciclo evolutivo, tiene características similares al *Cryptosporidium*, principalmente por su apetencia la tinción de Ziehl Nielsen, pero el ooquiste (forma infectante) tiene 2 esporozoitos y 2 esporoquistes además de ser de mayor tamaño (8 a 10  $\mu\text{m}$ ).

Afecta principalmente al duodeno distal, provoca inflamación y atrofia de las vellosidades de la zona además de hiperplasia de las criptas.

Característicamente el paciente presenta fiebre de más o menos dos días de duración, seguido de evacuaciones líquidas explosivas (5 a 7 diarias), anorexia, náuseas, dolor abdominal intenso, vómitos ocasionales y gran astenia. La diarrea suele durar 3 a 4 días, cede espontáneamente durante algunos días y se repite nuevamente toda la signo-sintomatología.

**Figura # 2.** *Ciclospora* spp.



### **Blastocistosis**

Es una infección producida por *Blastocystis hominis*, protozoo asociado principalmente a signo-sintomatología inespecífica, tanto aguda como crónica. Estudios en niños con diarrea aguda evidencian una prevalencia entre el 10 al 18% de todos los casos estudiados, (ver figura # 3).

Este parásito es de forma esférica, multinucleado, de aproximadamente 4 a 15  $\mu\text{m}$ , que característicamente tiene muchos organelos citoplasmáticos, se moviliza por pseudópodos y a pesar de que es conocido desde 1911, no se conoce completamente su ciclo evolutivo, probablemente porque durante muchos años no se le dio la importancia debida, considerándolo solo un comensal del intestino.

Su transmisión es fecal oral, incluyendo agua y alimentos contaminados, su diseminación está altamente relacionada con malas condiciones higiénicas, hacinamiento y desnutrición.

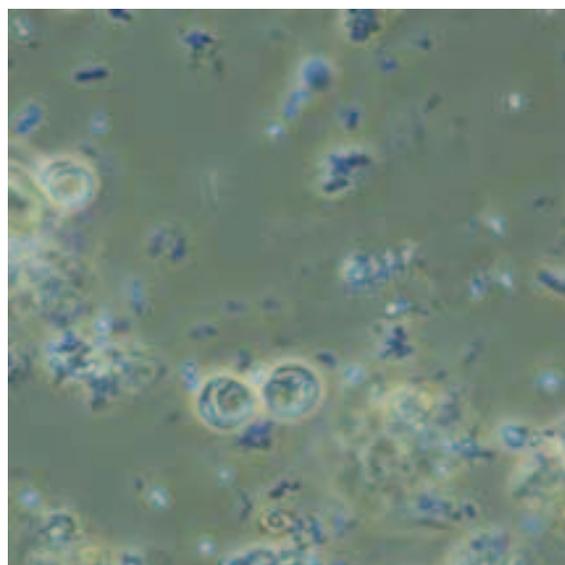
La signo-sintomatología incluye deposiciones líquidas abundantes, tenesmo, náuseas, vómitos, dolor abdominal, prurito anal, malestar general, fiebre y disminución de peso.

Si bien puede identificarse mediante microscopía muchas veces no es tomado en cuenta por el laboratorista, considerando que se trata de un comensal de intestino; también puede desarrollarse en medios de

cultivo apropiados pero demora aproximadamente 72 horas en ser informado, por lo tanto recientemente se está utilizando la reacción en cadena de polimerasa que da el informe en tres horas con poca muestra, alta especificidad y sensibilidad.

Existen tres subtipos de *Blastocystis* (1,2 y 3) que pueden ser diferenciados y adecuadamente catalogados gracias a la prueba de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real, permitiendo además determinar si se trata de un brote o de un caso aislado. Esta prueba puede detectar hasta 8 células en 100 mg de muestra.

**Figura # 3.** *Blastocystis hominis*.



### **Estudios para el diagnóstico de protozoarios intestinales**

#### **1. Métodos directos**

Para este tipo de pruebas, la calidad de la muestra enviada a laboratorio tiene gran importancia, debido a que el transporte en pañal absorbente o muestras recolectadas de bacinicas, no es de utilidad ya que solo se obtienen falsos negativos o simplemente no son útiles por encontrarse mezcladas con orina, motivo por el cual se recomienda que en caso de niños que aún usan pañales, la muestra sea recolectada co-

locando el pañal invertido (la cara impermeable en contacto con la piel) o aplicando una bolsa colectora de orina alrededor del ano, especialmente cuando las muestras son francamente líquidas. En el primer caso la muestra debe ser recogida del pañal a un recipiente apropiado de plástico o vidrio y en el segundo la bolsa sirve para transportar la muestra tal cual.

De igual forma, el tiempo de envío reviste mucha importancia, en el caso de que se sospeche amebas o se desee buscar trofozoitos de *Giardia* u otros protozoarios, para dicho efecto la intención es que la muestra recolectada mantenga adecuada temperatura ya que al enfriarse los trofozoitos inician su enquistamiento. Por lo tanto si este es el objetivo, debe solicitarse al laboratorio que facilite a los familiares envases térmicos o que la muestra sea recolectada en el mismo laboratorio.

También debe tomarse en cuenta si el paciente recibe medicamentos como bismuto, aceite mineral, antibióticos o antimaláricos, ya que alteran los resultados provocando generalmente falsos negativos.

Idealmente las muestras deben haberse obtenido en las últimas dos horas, antes de procesarlas en el laboratorio.

**Examen coproparasitológico:** nos informa desde características macroscópicas como la consistencia, la presencia de sangre, moco y parásitos observables a simple vista o partes de estos como las proglótides de las tenias. La observación microscópica arroja datos importantes que hacen pensar en un proceso inflamatorio agudo como la presencia de leucocitos abundantes, glóbulos rojos, cristales de Charcot Leyden que aparecen por destrucción de eosinófilos en intestino, glóbulos de grasa relacionados con problemas de absorción, la presencia de levaduras, el pH de las heces fecales y principalmente la descripción de las formas parasitarias encontradas, cantidad y características tintoriales.

**Exámenes coproparasitológicos mediante técnicas de concentración:** existen varias técnicas de concentración, las más aplicadas generalmente son las de flotación por diferencia de densidades entre la solución y los huevos o quistes que son más livianos y terminan flotando en la solución preparada (técnica de Willis) y la técnica de Ritchie, consistente en la centrifugación y aplicación de soluciones de diferentes densidades que buscan concentrar a las formas parasitarias, esta técnica toma más tiempo pero tiene mayor sensibilidad y especificidad que la anterior.

La técnica de sedimentación espontánea en tubo, demostró que puede mejorar el rendimiento de estas pruebas hasta en un 50% comparadas con el método directo (23%) y el de flotación (25%), por lo que puede solicitarse al laboratorio cuando uno desea que se realicen pruebas por concentración. Tiene como gran ventaja que su costo es mucho menor y con menos riesgo para el personal de laboratorio una vez que no utilizan éter o formol.

**Tinciones permanentes:** Son utilizadas cuando existen dudas diagnósticas y es necesario identificar las características morfológicas del parásito, caso típico de las semejanzas entre la *Entamoeba histolytica* y la *Entamoeba coli*; las más utilizadas son la tricrómica y la hematoxilina férrica.

### Cultivo

El cultivo de protozoarios intestinales es poco frecuente por las elevadas exigencias del parásito, que encarecen el estudio y no todos los laboratorios implementan el mismo como prueba habitual. En caso de requerirse y de contar con todos los medios se logra el desarrollo de *Entamoeba histolytica*, *Trichomona vaginalis*, *Acanthamoeba* y *Naegleria sp.* Los medios más utilizados son el de Robinson y el polixénico.

En el cuadro # 1, se describen las distintas técnicas de recolección de muestras para estudios parasitológicos directos.

**Cuadro # 1. Técnicas de recolección de muestras para estudios directos**

Sitio de recolección	Técnica	Parásitos
Perianal	Cinta adhesiva	Enterovirus vermicularis y proglótides de Tenia
Recto sigmoides	Sigmoidoscopia	Entamoeba histolytica
Duodeno	Aspirado duodenal	Giardia lamblia, Isospora, Cryptosporidium, larvas de <i>Strongyloides</i>
Hígado	Aspirado de absceso hepático	Entamoeba hystolitica
Boca	Recolección de esputo	Entamoeba histolytica, Cryptosporidium, larvas de <i>Strongyloides</i> y <i>Ascaris</i>

## 2. Métodos de diagnóstico indirectos

Debido a que el diagnóstico de varias parasitosis incluso las intestinales puede resultar desalentador mediante pruebas habituales en heces fecales, se recomienda realizar pruebas indirectas especialmente para aquellos parásitos cuya identificación en heces es difícil por su número y/o características tintoriales o para aquellos que pueden tener localización tisular ya sea en la pared intestinal u otros sitios de difícil acceso incluso por biopsia.

Los métodos indirectos hacen evidente la respuesta inmune especialmente humoral del hospedero ante antígenos parasitarios. La mayor parte permite identificar anticuerpos, pero también existen pruebas para encontrar células sensibilizadas, complejos antígeno anticuerpo llamados complejos inmunes y células efectoras de la respuesta inmune como reacciones del complemento y citocinas.

Las reacciones inmunológicas dependen principalmente de dos factores, la capacidad de detectar mínimas cantidades de antígenos o anticuerpos (sensibilidad) que depende de la reacción inmunoquímica y la capacidad de detectar específicamente los anticuerpos y/o antígenos inducidos por la infección parasitaria (especificidad), que depende de la calidad de los antígenos utilizados.

La mayoría de las pruebas serológicas están basadas en la detección de la respuesta específica de anticuerpos ante la presencia del parásito. Estas incluyen aglutinación clásica, fijación de complemento, métodos de difusión en gel, inmunofluorescencia, ELISA y Western Blot.

La detección de anticuerpos contra el parásito se transforma en un problema cuando se debe determinar si el cuadro es agudo o crónico, debido a la persistencia de niveles elevados de anticuerpos desde meses hasta años luego de la infección. Por lo tanto la detección de antígenos ya sea en sangre, orina o heces fecales aporta un marcador más apropiado para determinar la presencia de una infección activa. Estas pruebas pueden realizarse por ELISA e inmunocromatografía, ambas con buenos niveles de sensibilidad y especificidad, en especial para *Giardia*, *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* y *Cryptosporidium* en heces fecales. También se desarrollaron pruebas de inmunofluorescencia para *Giardia*, *Cryptosporidium* y *Trichomonas*.

Adicionalmente a los métodos de inmunodiagnóstico, el diagnóstico de enfermedades parasitarias ha logrado un avance significativo gracias a la aplicación de métodos de diagnóstico molecular basados en la hibridación del ácido nucleico. Estos estudios son factibles ya que todos los organismos contienen secuencias de ácido nucleico que pueden ser usados en estudios de hibridación que ayudan a determinar cepas, especies y género. Pueden detectarse simultáneamente varios parásitos dependiendo de la especificidad del ácido nucleico utilizado.

Otra gran ventaja de este tipo de estudio es que puede identificarse al agente causal sin importar el estado inmunológico del paciente, lo cual es una desventaja de las pruebas inmunológicas que se ven alteradas cuando la inmunidad del paciente está afectada.

La técnica de reacción en cadena de polimerasa ha logrado incrementar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de infecciones de una manera impresionante porque además de llegar a un diagnós-

tico más preciso, permite establecer incluso diferencias de un nucleótido entre genotipos del parásito, determinando así si se trata de un caso aislado o de un brote al comparar los agentes aislados en infecciones similares, situación que antes era muy difícil en el caso de protozoarios por la dificultad para obtener desarrollo en cultivos de alta exigencia.

Las posibilidades de establecer el diagnóstico definitivo aumentan de manera exponencial al sumar más de una prueba directa e indirecta.

En el cuadro # 2, se describen los métodos para el diagnóstico de las parasitosis intestinales más frecuentes en pediatría.

## Métodos de diagnóstico según el parásito en estudio

### 1. *Entamoeba histolytica*

**Materia fecal:** se recomiendan por lo menos 3 muestras de heces fecales, si el cuadro es agudo se recomienda que sean frescas o referidas al laboratorio en frascos térmicos y mejor aún, si se las obtiene en el mismo laboratorio. Se las estudia por medio de hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta o ELISA y se requiere de un microscopista experto, por lo difícil de diferenciar entre amebas patógenas de las que no lo son.

**Cuadro # 2.** Métodos de diagnóstico frecuentes según el parásito en estudio.

PARASITO	OPCIONES PARA OBTENER MUESTRAS	METODOS DE RECOLECCION Y CONSERVACION	PROCEDIMIENTO DIAGNOSTICO
<b>Tracto Gastrointestinal</b>			
Entamoeba histolytica	Heces frescas Heces preservadas Sigmoidoscopia Suero	Frascos con termo para transporte Formol M.I.F.	Frotis directo con solución fisiológica Frotis con lugol Frotis y fijación con tinción tricrómica Serología: Heces (en busca de antígenos) Suero (en busca de anticuerpos)
Giardia	Heces frescas Heces preservadas Aspirado duodenal Biopsia Suero	Frascos con termo para transporte Formol M.I.F.	Frotis directo con solución fisiológica Frotis con lugol Frotis y fijación con tinción tricrómica Inmunofluorescencia ELISA Cultivo
Cryptosporidium	Heces frescas Heces preservadas Biopsia	Frascos con termo para transporte Heces con solución salina	Tinción ácido alcohol modificada ELISA
Microsporidium	Heces frescas Heces preservadas Aspirado duodenal Biopsia Suero	Frascos con termo para transporte Heces con solución salina	Tinción Giemsa Tinción Gram
<b>HIGADO</b>			
Entamoeba histolytica	Aspirado Biopsia Suero	Conservación de muestras en alícuotas separadas	Frotis en fresco Tinción tricrómica Serología por ELISA
<b>PULMONES</b>			
Entamoeba histolytica	Espuito Aspirado bronquial Biopsia	Recolección de muestras en alícuotas sin conservantes	Frotis en fresco Tinción tricrómica Serología por ELISA

Biopsia Intestinal: requiere tomar la muestra mediante sigmoidoscopia

**Cristales de Charcot Leyden:** deben considerarse sugestivos de esta infección sumando a otros datos laboratoriales encontrados.

**Coprocultivo:** se realiza en Medio de Robinson y Medio Polixénico

**Serología:** Detecta anticuerpos, estas pruebas pueden distinguir entre patógenas y no patógenas.

Detección de antígenos amebianos en heces fecales por contraelectroforesis, ELISA y ELISA FAC, esta última permite distinguir entre *Entamoeba histolytica* y *E. dispar* con una sensibilidad del 93% y especificidad del 96%.

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa, que busca detectar el ADN genómico, tiene una sensibilidad del 95% y 99% de especificidad al realizarse en muestras de heces fecales.

Cuando la infección por *Entamoeba histolytica* ha vencido la pared intestinal y ha podido llegar al hígado produciendo un absceso hepático amebiano, teóricamente podemos utilizar técnicas directas para observar a los trofozoitos en el interior del absceso, pero la mayor parte de las veces esta prueba no es útil incluso utilizando tinciones específicas, por lo tanto la sensibilidad y especificidad de técnicas directas es muy baja, las pruebas como la reacción en cadena de polimerasa ha demostrado tener mejores resultados con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 100%.

## 2. *Giardia lamblia*

**Hemograma:** generalmente no tiene alteraciones significativas, ocasionalmente puede presentarse eosinofilia.

**Pruebas para intolerancia a la lactosa:** pueden ser positivas una vez que el paciente puede tener alteraciones por déficit de disacaridasas.

**Examen coproparasitológico:** la microscopía es positiva para la identificación de quistes o trofozoitos solo en el 68% de los casos, requiere por lo menos 3

muestras con un intervalo de 2 a 3 días, con un máximo de 10 días entre las tres. Pueden ser recolectadas sin conservante, pero el uso de formol o alcohol polivinílico puede aumentar la sensibilidad al preservar la muestra enviada a laboratorio. En fase temprana de la enfermedad puede resultar en falsos negativos.

**“String test” o prueba de la cuerda o de la cápsula de gelatina:** una vez que llega al duodeno donde permanece 40 minutos, se recoge la misma y se examina su extremo en busca de trofozoitos.

**Aspirado y biopsia duodenal mediante endoscopia:** en busca de trofozoitos.

Detección del antígeno específico GSA-65 por ELISA, este es un glucopéptido producido por el parásito en duodeno, tiene una sensibilidad del 93% y especificidad del 99% (16,20)

**Inmunofluorescencia con anticuerpos policlonales de inmunoenzaimoensayo:** usado para detectar antígenos en heces fecales. No es utilizado en nuestro medio por los elevados costos por prueba.

En busca de anticuerpos específicos para *Giardia*, se realizaron estudios mediante radioinmunoensayo (RIA), pero los hechos mediante la técnica de ELISA tienen mayores ventajas incluso para hacer efectivo el estudio una vez que no utilizan radioisótopos, por lo tanto son más fáciles de realizar y más económicos.

La prueba ELISA en el caso de infecciones por *Giardia* ha demostrado tener una sensibilidad del 99,2% y una especificidad de 98,2%.

Reacción en cadena de la polimerasa sirve para identificar (con el fin de encontrar) el ARN o el ADN del parásito, con una sensibilidad del 91% y una especificidad del 99%.

## 3. *Cryptosporidium*

**Examen coproparasitológico:** No es de utilidad por las características tintoriales del parásito, se debe sospechar de su presencia cada vez que se encuentran quistes o trofozoitos de *Giardia lamblia*, por su frecuente asociación que puede llegar al 61%.

Técnica de la D-xilosa: es positiva debido al aumento del contenido de grasa en heces fecales, provocado por las lesiones producidas a nivel duodenal por el parásito.

Biopsia intestinal: nos da el diagnóstico de certeza, más cuando encontramos basófilos en el borde en cepillo.

Tinción de Ziehl Nielsen modificada: muy útil para encontrar ooquistes del parásito que generalmente son eliminados en heces fecales, tiene como desventaja que requiere que el microscopista sea experimentado. Se realizaron estudios en los que se comparó a esta tinción con la de hematoxilina férrica, demostrándose que en manos expertas puede tener una sensibilidad de hasta 90% y una especificidad del 92%.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, demostró tener una sensibilidad del 94% y una especificidad del 100% (16), gracias a este estudio se pudieron establecer los dos genotipos del parásito: Genotipo 1, recientemente denominado *Cryptosporidium hominis* y el genotipo 2, conocido como *Cryptosporidium parvum*.

#### 4. *Isospora belli*

Coproparasitológico: si se realiza con lugol o solución fisiológica, no es de utilidad por las características tintoriales del parásito.

Tinción de Ziehl Nielsen modificada: permite ver ooquistes característicos por su contenido de dos esporoquistes, se logra mejorar la sensibilidad cuando se recolectan las muestras con un conservante como el alcohol polivinílico.

Tinción auramina – rodamina: puede ser de utilidad pero requiere de reactivos caros y un microscopista experimentado.

#### 5. *Ciclospora cayatanensis*

Coproparasitológico: no es de utilidad por las características tintoriales del parásito.

Tinción de Ziehl Nielsen modificada: de utilidad una vez que permite ver al parásito, requiere de un

microscopista experimentado.

Tinción de Kinyoun: de utilidad por las características tintoriales (ácido alcohol resistente).

#### 6. *Blastocystis hominis*

Examen coproparasitológico: requiere experiencia del microscopista, se aumenta la sensibilidad de la prueba cuando las heces son enviadas con un conservante como alcohol polivinílico, no así con formol debido a que altera la forma vacuolar del parásito, por lo que tampoco se recomienda realizar pruebas de concentración que usen este reactivo.

### Referencias

1. Guy R, Payment P, Krull U, Horgen P. Real-time PR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage. *Applied and Environmental Microbiology* 2003;69:5178-85.
2. Khan U, Samantaray M, Sharma M. Detection of *Entamoeba histolytica* using polymerase chain reaction in pus samples from amebic liver abscess. *Indian Journal of Gastroenterology* 2006;25:55-7.
3. Kucik C, Martin G. Common intestinal parasites. *American Family Physician* 2004;69:1161-8.
4. García LS, Schimizu RY, Bernard CN. Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*/dispar, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage Parasite panel enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 2000;38:3235-9. = *American Family Physician* ó *Am Fam Physician*
5. Carvalho M, Araujo A, Duarte R, Pereira Da Silva J, Reihard K, Bouchet F, Ferreira LF. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in coprolites using a commercially available enzyme –linked immunosorbent assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2002;96:640-3.
6. Saffol Jones II M, Ganac R, Hiser G, Hudson R, Le A, Whipps C. Detection for *Blastocystis* from stool samples using Real – Time PCR. *Parasitol Res* 2008;103:551-7.
7. Cuadros J, Orellana MA, Mazón A. *Blastocystis hominis* infection and diarrhoea. *Med Clin (Barc)* 2007;128:638-43.
8. Velarde del Rio L, Mendoza M. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en una población urbana mexicana. *Rev Cubana Pediatr* 2006;78:115-24.

9. Haque R, Roy S, Siddque A, Mondal U, Rahman M. Multiplex real time PCR assay for detection of Entamoeba histolytica, Giardia intestinalis, and Cryptosporidium spp. Am J Trop Med Hyg 2007;76:713-7.
10. Escobar E. Diagnóstico de parásitos intestinales emergentes en personas que viven con VIH/SIDA, que asisten a la Clínica familiar “Luis Angel García” del Hospital General San Juan de Dios. Rev Cub Infect 2005;26:121-4.
11. Koneman E, Allen S, Janda W, Scheckenberger P, Winn W, eds. Diagnóstico Microbiológico. 5a. ed. México: Ed. Médica Panamericana; 1999.
12. Pajuelo G, Luján D, Paredes B, Tello R. Aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el diagnóstico de parásitos intestinales. Rev Biomed 2006;17:96-101.