Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Esta licencia es la más restrictiva de las seis licencias principales Creative Commons, permitiendo a otras solo descargar sus obras y compartirlas con otras siempre y cuando den crédito, pero no pueden cambiarlas de forma alguna ni usarlas de forma comercial.

http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0

UNIVERSIDAD NACIONAL" SAN LUIS GONZAGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

EVALUACION DE ORIGINALIDAD

C O N S T A N C I A

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud TURNITIN ÍTHENTICATE 2.0 del INFORME FINAL DE TESIS titulada:

Evaluación de la viabilidad del cultivo in vitro de *Blastocystis spp.* a partir de muestras fecales

Presentado por:

Bach. CAMILA ALEJANDRA CENTENO PONCIANO

Que, conforme al informe automatizado de originalidad emitido por el Operador del Programa Informático Evaluador de Originalidad de la Facultad de **CIENCIAS BIOLOGICAS**, se concluye que:

El resultado obtenido es del 9%, por el cual se le otorga el calificativo APROBADO, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.

Para dar fe, se adjunta al presente el reporte de similitud de las bases de datos de Ithenticate.

Ica, 22 de junio de 2026

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
Dr. Wilder Enrique Melgarejo Angeles
Director de la Unidad de Investigación

UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA”

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Evaluación de la viabilidad del cultivo in vitro de *Blastocystis spp.* a partir de muestras fecales

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Salud pública y conservación del medio ambiente

INFORME FINAL DE TESIS

AUTOR

BACH. CENTENO PONCIANO CAMILA ALEJANDRA

ICA – PERU

2026

DEDICATORIA

Con profundo agradecimiento, dedico este proyecto a quienes guiaron y apoyaron mi trayectoria con enseñanzas que hicieron posible este estudio.

A mi madre, Fanny Ponciano, por enseñarme que con esfuerzo y esmero no hay meta inalcanzable; es ella mi motivación y el espejo donde deseo verme reflejada.

A mi abuela y mi tía, Cristel Altamirano y Giovanna Ponciano, por ser la razón de mi fortaleza y el impulso para culminar esta etapa profesional.

Y por supuesto a mi Michito, familia, amigos y todos los que me impulsaron cada día; gracias por creer en mí y por brindarme el honor de compartir con ustedes la satisfacción de este objetivo cumplido.

AGRADECIMIENTO

Mi más profundo y especial agradecimiento al Mg. Davis Márquez, mi asesor externo, cuya guía no solo fue técnica, sino fundamentalmente motivadora. Gracias por confiar en mi potencial desde el primer día, por brindarme todas las facilidades necesarias para materializar este proyecto y por ser el impulso principal que me permitió superar cada peldaño hasta alcanzar esta meta.

Al Mg. César Mendoza, por su asesoría y por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Asimismo, expreso mi gratitud por las instalaciones y espacio de investigación que me fue brindado para la ejecución; gracias por permitirme disponer de sus instalaciones, equipos y herramientas, las cuales fueron piezas clave para el desarrollo experimental de esta tesis.

Agradezco al Licenciado Remi Jiménez, por su apoyo y disposición durante el proceso. A mis compañeros y colegas, por el soporte mutuo, por las amenas jornadas de trabajo y por hacer este camino más grato y enriquecedor.

Finalmente, agradezco a todas las personas que, con pequeños y significativos gestos, palabras de aliento y apoyo invaluable, sumaron fuerzas para que hoy pueda culminar mi formación como bióloga.

Índice de contenidos

AGRADECIMIENTO iii
Índice de tablas v
Índice de figuras vi
RESUMEN vii
ABSTRACT viii
I. INTRODUCCIÓN 1
II. METODOLOGÍA 4
2.1 Tipo y diseño de la investigación 4
2.2 Obtención de muestras fecales 4
2.3 Confirmación de muestras positivas 4
2.4 Tamaño muestral 4
2.5 Preparación del Medio de Jones 5
2.6 Inoculación de las muestras fecales en el medio de cultivo 5
2.7 Condiciones de conservación de las muestras fecales 6
2.8 Evaluación del crecimiento in vitro de *Blastocystis spp.* en cultivo 6
2.9 Cuantificación celular mediante cámara de Neubauer 6
2.10 Análisis estadístico 7
2.11 Consideraciones éticas 8
III. RESULTADOS 9
IV. DISCUSIÓN 15
V. CONCLUSIONES 20
VI. RECOMENDACIONES 21
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 22
VIII. ANEXOS 26

Índice de tablas

Tabla 1. Comparaciones pareadas de la carga parasitaria de *Blastocystis spp.* según el tiempo de almacenamiento a 4 °C (prueba de Wilcoxon pareada con ajuste de Holm).. 10

Tabla 2. Resultados de las comparaciones pareadas de la viabilidad del cultivo de *Blastocystis spp.* entre los diferentes tiempos de almacenamiento a 4 °C (prueba de McNemar, ajuste de Holm)…… 12

Índice de figuras

Figura 1. Viabilidad de *Blastocystis spp.* tras el almacenamiento a 4 °C. Los diagramas de caja representan la distribución de la carga parasitaria, expresada como $\log_{10}$(células/mL + 1) en cada punto temporal..... 9

Figura 2. Proporción de cultivos viables de *Blastocystis spp.* tras el almacenamiento a 4 °C. Las barras representan el porcentaje de cultivos positivos (≥1 célula detectada) en cada punto temporal. Las barras de error indican intervalos de confianza del 95 % (método de Wilson)……. 11

Figura 3. Mapa de calor que muestra la dinámica de la viabilidad de *Blastocystis spp.* durante el almacenamiento a 4 °C. Cada fila representa una muestra individual (n = 50) y cada columna, un tiempo de almacenamiento. La intensidad del color indica la carga parasitaria expresada en $\log_{10}$ (células/mL + 1)…… 13

Figura 4. Dinámica individual de la carga parasitaria de *Blastocystis spp.* durante el almacenamiento a 4 °C……. 14

RESUMEN

La parasitosis intestinal por *Blastocystis* spp. constituye un problema relevante de salud pública debido a su alta prevalencia y a las limitaciones en su diagnóstico. El cultivo *in vitro* es una herramienta sensible para su detección; sin embargo, la viabilidad del parásito depende de las condiciones de conservación de las muestras fecales. El objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad del cultivo *in vitro* de *Blastocystis* spp. a partir de muestras fecales humanas conservadas a diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento. Se realizó un estudio aplicado, cuasi-experimental, longitudinal y prospectivo, utilizando 50 muestras fecales positivas para *Blastocystis* spp., confirmadas mediante técnicas coproparasitológicas. Las muestras fueron conservadas a 4 °C y −20 °C, y sembradas en medio de Jones en estado fresco y tras 72 horas, 7, 15 y 30 días de almacenamiento. La viabilidad se evaluó de forma cualitativa (presencia o ausencia de crecimiento) y cuantitativa mediante el recuento celular en cámara de Neubauer. El análisis estadístico incluyó pruebas de Friedman, Wilcoxon pareada, Cochran's Q y McNemar. Las muestras conservadas a −20 °C no mostraron crecimiento en ningún periodo evaluado. En contraste, las muestras refrigeradas a 4 °C mantuvieron una alta viabilidad durante los primeros 7 días y conservaron capacidad de crecimiento hasta los 30 días en una proporción considerable de los cultivos, aunque con marcada heterogeneidad interindividual. Se concluye que la refrigeración a 4 °C es una estrategia adecuada para preservar la viabilidad de *Blastocystis* spp. en cultivo *in vitro*, siendo especialmente útil en contextos con limitaciones logísticas.

Palabras clave: *Blastocystis spp.*, cultivo *in vitro*, viabilidad, muestras fecales.

ABSTRACT

Intestinal parasitosis caused by *Blastocystis* spp. represents a relevant public health concern due to its high prevalence and diagnostic limitations. *In vitro* culture is a sensitive method for its detection; however, parasite viability depends on fecal sample preservation conditions. The aim of this study was to evaluate the viability of *Blastocystis* spp. *in vitro* culture from human fecal samples stored under different temperatures and storage times. An applied, quasi-experimental, longitudinal, and prospective study was conducted using 50 fecal samples positive for *Blastocystis* spp., confirmed by coproparasitological methods and PCR. Samples were stored at 4 °C and −20 °C and inoculated into Jones' medium when fresh and after 72 hours, 7, 15, and 30 days of storage. Viability was assessed qualitatively (presence or absence of growth) and quantitatively through cell counting using a Neubauer chamber. Statistical analysis included Friedman, paired Wilcoxon, Cochran's Q, and McNemar tests. Samples stored at −20 °C showed no *in vitro* growth at any evaluated time point. In contrast, samples refrigerated at 4 °C maintained high viability during the first 7 days and preserved growth capacity up to 30 days in a considerable proportion of cultures, although with marked interindividual variability. These findings indicate that refrigeration at 4 °C is an appropriate strategy to preserve *Blastocystis* spp. viability for *in vitro* culture, particularly in settings with logistical limitations.

Keywords: *Blastocystis spp.*, *in vitro* culture, viability, fecal samples.

I. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis intestinales continúan representando un importante problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en países en vías de desarrollo, donde las condiciones sanitarias, el acceso limitado a agua potable y las deficiencias en los sistemas de diagnóstico favorecen su transmisión y persistencia (1). Dentro de este contexto, constituyen un grupo de particular relevancia debido a su elevada prevalencia y a las dificultades asociadas a su detección precisa y oportuna. Entre ellos, *Blastocystis* spp. ha cobrado creciente interés científico en las últimas décadas, tanto por su amplia distribución geográfica como por la controversia que rodea su rol patogénico (2). Este protozoario es considerado uno de los parásitos más frecuentes en muestras fecales humanas y animales. Se caracteriza por su amplia distribución mundial y su posible asociación con síntomas gastrointestinales, aunque su rol patógeno aún es motivo de debate (3,4).

Blastocystis spp., perteneciente al grupo de los Heterokonta o Stramenopiles, es un microorganismo de localización entérica con distribución cosmopolita, capaz de colonizar el tracto digestivo de diversos vertebrados, incluido el ser humano (1). Este microorganismo presenta una marcada diversidad genética; hasta la fecha se han identificado 26 subtipos basados en el análisis de la subunidad pequeña del gen del ARN ribosómico (ARNr SSU), los cuales muestran una distribución geográfica variable y una afinidad diferencial por distintos hospedadores (2).

Hasta el momento se ha descrito seis formas morfológicas para *Blastocystis spp* (forma vacuolar, avacuolar, multivacuolar, granular, ameboide y quística) en las cuales podría existir variación morfológica y de tamaño lo cual probablemente refleja diferencias genéticas entre cepas o por etapas diferentes del proceso de enquistamiento y desenquistamiento del parásito (5,6). La forma vacuolar, que representa el estadio más común en muestras clínicas y cultivos, posee un diámetro de 8 a 30 µm y se caracteriza por una prominente vacuola central que ocupa entre el 70% y 80% del volumen celular; esta estructura desplaza el citoplasma y sus núcleos (de uno a cuatro) hacia la zona periférica, cumpliendo roles fundamentales en la reserva de nutrientes y la replicación la cual se da rápidamente por fisión binaria (5,7,8).

Por su parte, la forma granular, con un tamaño de 10 a 60 µm, se distingue por un cuerpo central saturado de gránulos que actúan como organelas metabólicas bajo la presencia de hasta cuatro núcleos (7,8). En contraste, la forma ameboide (2.6 y 7.9 µm) se asocia a una mayor actividad patógena y captación de alimento, identificándose por la emisión de pseudópodos gruesos y núcleos voluminosos de contornos indefinidos (6,8). el quiste constituye la fase de resistencia y transmisión del parásito, caracterizándose por su morfología esférica o subsférica y dimensiones reducidas de 2 a 5 µm, albergando en su interior de uno a cuatro núcleos (9,10).

La capacidad patogénica de *Blastocystis* spp. no es uniforme y parece depender de múltiples factores, entre ellos el subtipo involucrado, la interacción con la microbiota intestinal y la respuesta inmunológica del hospedador. Diversas investigaciones realizadas en distintos contextos epidemiológicos han sugerido que *Blastocystis* spp. puede formar parte de la microbiota intestinal normal de humanos y otros mamíferos, logrando colonizar el intestino y persistir durante periodos prolongados sin generar manifestaciones clínicas (11).

A nivel mundial, la prevalencia de *Blastocystis* spp. varía ampliamente, oscilando entre 5 % en países industrializados y hasta 60 % en regiones en desarrollo (12). En el Perú, diversos estudios han reportado prevalencias superiores al 40 %, tanto en poblaciones humanas como en reservorios animales, lo que pone en evidencia su impacto en la salud pública nacional (13,14). No obstante, a pesar de esta alta frecuencia, su diagnóstico continúa enfrentando importantes limitaciones metodológicas.

Tradicionalmente, la detección de *Blastocystis* spp. se ha basado en técnicas coproparasitológicas convencionales, como el examen directo y los métodos de concentración. Sin embargo, estos procedimientos presentan una sensibilidad limitada, especialmente en muestras con baja carga parasitaria. En este contexto, diversos autores han demostrado que el cultivo *in vitro*, particularmente el medio de Jones, incrementa significativamente la sensibilidad diagnóstica. Padukone et al., en un estudio realizado en India, evidenciaron que el cultivo en medio de Jones supera ampliamente a la microscopía directa en la detección de *Blastocystis* spp., y que su rendimiento es comparable al de técnicas moleculares en entornos con recursos limitados (15). De manera similar, Süli et al. en Serbia y Boutahar et al. en Marruecos confirmaron que el cultivo *in vitro* constituye una herramienta diagnóstica valiosa, aunque señalaron que su eficacia depende en gran medida de las condiciones de conservación de las muestras fecales (16,17).

En el ámbito veterinario y zoonótico, Rauff-Adedotun et al. demostraron la presencia de *Blastocystis* spp. en diversas especies animales en Malasia, utilizando el cultivo en medio de Jones, lo que refuerza la importancia de este método para estudios epidemiológicos comparativos (18). En el Perú, Gallegos et al. (2010) evaluaron diferentes medios de cultivo *in vitro* en muestras fecales de cerdos, concluyendo que el medio de Jones es el más eficiente, incluso cuando la carga parasitaria inicial es baja. Estos antecedentes nacionales respaldan su elección como medio de referencia en estudios de viabilidad y crecimiento del parásito (19).

A pesar de los avances en el diagnóstico, uno de los principales desafíos para el uso rutinario del cultivo *in vitro* de *Blastocystis* spp. es la conservación adecuada de las muestras fecales cuando el procesamiento inmediato no es posible. Esta situación es especialmente frecuente en zonas rurales o de difícil acceso, donde las muestras deben ser almacenadas y transportadas a laboratorios de referencia. Clark y Stensvold señalaron que la viabilidad del parásito puede verse

severamente comprometida por condiciones inadecuadas de almacenamiento, particularmente por la congelación sin agentes crioprotectores (20).

La literatura científica muestra resultados divergentes respecto a la supervivencia de *Blastocystis spp*. bajo refrigeración. Chun-Lin Tian et al., en un estudio preliminar realizado en China, reportaron que *Blastocystis hominis* sobrevive menos de una semana a 4–6 °C, mientras que su conservación prolongada solo es posible mediante criopreservación con glicerol, DMSO o etilenglicol a temperaturas ultrabajas (21). No obstante, estos autores trabajaron con aislados previamente procesados y evaluaron la viabilidad mediante tinción con azul de tripán, un enfoque distinto al empleado en estudios basados en la capacidad de proliferación *in vitro*. Esta disparidad metodológica pone de manifiesto la necesidad de generar evidencia adicional bajo condiciones reales de diagnóstico parasitológico.

En el contexto local, no existen antecedentes de estudios que evalúen la viabilidad del cultivo *in vitro* de *Blastocystis spp*. en la provincia de Ica ni en otras zonas rurales de la región. Esta ausencia de información limita la implementación de estrategias diagnósticas adecuadas y dificulta el desarrollo de estudios epidemiológicos que permitan dimensionar el impacto real de este parásito en la población.

Frente a esta problemática, la presente tesis tiene como objetivo evaluar la viabilidad del cultivo *in vitro* de *Blastocystis spp*. a partir de muestras fecales humanas conservadas en dos temperaturas (4°C y -20°C) y tiempo de almacenamiento, utilizando el medio de Jones. Los resultados obtenidos permitirán establecer criterios técnicos para la conservación de muestras, optimizar los protocolos diagnósticos y generar información útil para investigaciones futuras sobre la epidemiología, diversidad genética y posible patogenicidad de *Blastocystis spp.* en el Perú.

II. METODOLOGÍA

2.1 Tipo y diseño de la investigación

La presente tesis es de tipo aplicada, ya que tuvo como propósito generar conocimientos prácticos orientados a mejorar los procedimientos de conservación de muestras fecales utilizadas en la detección de *Blastocystis spp.*

El diseño metodológico corresponde a un estudio cuasi-experimental, de enfoque cuantitativo, longitudinal y prospectivo, en el cual se manipularon deliberadamente las variables de conservación (tiempo y temperatura) con el fin de evaluar su influencia sobre la viabilidad del parásito en el cultivo.

2.2 Obtención de muestras fecales

Las muestras fecales fueron proporcionadas por el grupo de investigación VIGIA salud de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" (Resolución Vicerrectoral N°0170-VRI-UNICA-2025) y corresponden a población infantil de la provincia de Ica. Estas muestras fueron recolectadas previamente en el marco de actividades de investigación desarrolladas por dicho grupo.

2.3 Confirmación de muestras positivas

Para la selección de muestras positivas a *Blastocystis spp.*, se empleó los métodos coproparasitológicos de examen directo en fresco y técnica de sedimentación espontánea en solución salina (22).

2.4 Tamaño muestral

El tamaño muestral se determinó considerando el diseño longitudinal con medidas repetidas para evaluar la viabilidad del cultivo *in vitro* de *Blastocystis* spp. a lo largo de distintos tiempos de almacenamiento. Para su estimación se realizó un estudio piloto con 25 muestras fecales positivas, en el cual se observó una viabilidad del 100 % al día 1 y del 75 % al día 30 de almacenamiento bajo refrigeración.

Dado que el tiempo de almacenamiento de 30 días representó el punto crítico del estudio, al corresponder al periodo más prolongado evaluado y al que se esperaba una mayor pérdida de viabilidad, el cálculo del tamaño muestral se basó en la proporción de cultivos viables observada en dicho punto temporal.

Con base en estos resultados, se empleó la fórmula para la estimación de una proporción con un nivel de confianza del 95 %, asumiendo una proporción esperada de cultivos viables a los 30 días de $p = 0.75$ y una precisión absoluta de $d = 0.12$:

$$n = \frac{z^2 x\, p(1-p)}{d^2}$$

donde $Z = 1.96$ corresponde al valor de la distribución normal para un nivel de confianza del 95 %.

Al reemplazar los valores, se obtuvo un tamaño muestral de 50 muestras. Adicionalmente, este tamaño permitió considerar la posible pérdida de muestras por contaminación o fallas en el cultivo, así como captar la variabilidad interindividual observada en la viabilidad y carga parasitaria de *Blastocystis* spp.

2.5 Preparación del Medio de Jones

Para la preparación del medio de cultivo, se disolvió los siguientes componentes en 950 ml de agua desionizada:

Insumo	Cantidad
$Na_2HPO_412H_2O$	2,65 gr
KH_2PO_4	0,41 gr
NaCl	7,36 gr
Extracto de levadura	1,00 g

Mediante un agitador ultrasónico se facilitó la solubilidad de los componentes, asegurando la dispersión total de las partículas sólidas mediante vibraciones de alta frecuencia. Posteriormente, se distribuyó 95 mL de esta solución en frascos de 100 mL y se esterilizó en autoclave. Una vez esterilizados, los frascos se conservaron a 4 °C de forma indefinida hasta su uso. Paralelamente, el suero bovino se inactivó por calor manteniéndolo a 56 °C durante 30 minutos. Al momento de procesar las muestras, se adicionó 5 mL del suero inactivado a cada frasco de medio previamente autoclavado. Finalmente se agregó 1800 µl del medio en microviales estériles y se conservaron a 4°C (Ver Anexo 3 y 7) (20).

2.6 Inoculación de las muestras fecales en el medio de cultivo

Una vez preparado el medio de cultivo, se procedió a la inoculación mediante la transferencia de una porción de la muestra fecal del tamaño de un guisante, utilizando un asa bacteriológica de siembra desechable. Se homogenizó la muestra en el interior del microvial, con el fin de favorecer el crecimiento y la detección de *Blastocystis spp.* durante la incubación. Los microviales se incubaron verticalmente en una gradilla a 37 °C durante 48 horas (20). El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio clínico Analítica Avanzada localizado en la clínica Las Condes (Ver Anexo 4 y 8).

2.7 Condiciones de conservación de las muestras fecales

Las muestras fecales fueron divididas en alícuotas independientes, correspondientes a cada tiempo y temperatura de siembra, con la finalidad de evitar alteraciones en las condiciones de conservación derivadas de manipulaciones repetidas. Las alícuotas se conservaron a dos temperaturas, 4 °C y −20 °C, con el propósito de evaluar la viabilidad de *Blastocystis spp.* en cultivo tras distintos periodos de almacenamiento. Las muestras fueron sembradas en estado fresco y posteriormente a las 72 horas, 7, 15 y 30 días de conservación. Esta estrategia experimental permitió analizar de manera controlada el efecto combinado de la temperatura y la duración del almacenamiento sobre la capacidad de recuperación y crecimiento del parásito en condiciones de cultivo *in vitro* (21).

Se consideró la temperatura de 4 °C debido a que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la recomienda para la conservación de muestras fecales destinadas al examen parasitológico cuando existe retraso en su procesamiento (23). Asimismo, se incluyó la temperatura de −20 °C, ya que corresponde a la condición comúnmente empleada para la conservación de material biológico mediante congelación, especialmente cuando se requiere su almacenamiento para análisis posteriores (24).

2.8 Evaluación del crecimiento in vitro de *Blastocystis spp.* en cultivo

El crecimiento del cultivo fue verificado a los 48 horas posteriores a la inoculación. Para ello, se homogenizó el microvial y se tomó una alícuota de 40 µL de la parte media del cultivo utilizando una micropipeta. Luego se colocó sobre un portaobjetos para su observación al microscopio al objetivo de 40X. La identificación de *Blastocystis spp*. se realizó mediante la observación de sus formas morfológicas características, apoyándose en una guía de parasitología para su adecuada clasificación (25). Se consideraron muestras negativas aquellas en las que, tras un período de incubación de cinco días, no se evidencien estructuras parasitarias compatibles con *Blastocystis spp* (Ver anexo 5) (20).

2.9 Cuantificación celular mediante cámara de Neubauer

Para la preparación de la muestra destinada al conteo celular, se agitó suavemente el tubo de cultivo con el fin de homogeneizar el contenido. Posteriormente, se tomó una alícuota de 100 µL del medio y se adicionó 100 µL de lugol para facilitar la observación y el conteo. Para la lectura en la cámara de Neubauer, se colocó cuidadosamente el cubreobjetos sobre la superficie de la cámara. Luego, se introdujo 10 µL de la mezcla previamente preparada en uno de los compartimientos laterales, se evitó la formación de burbujas. Se dejó reposar la cámara durante dos minutos para permitir que los organismos se asienten en el fondo.

La observación microscópica se inició enfocando con el objetivo de 10x y luego se continuó con el objetivo de 40x. Para el recuento celular se emplearon los cuadros laterales (extremos) de la cámara de Neubauer, correspondientes a un área de 1 mm² por cuadro y subdivididos en 16 subcuadros. Se realizó 3 conteos independientes por microvial y se determinó el promedio (Ver Anexo 6) (26).

Para la determinación del número de células se aplicará la siguiente formula (27):

$$\frac{Células}{ml} = \left(\frac{número\ de\ células\ contadas}{número\ de\ cuadrados\ contados}\right) x\ factor\ de\ dilución\ x\ 10^4$$

Quedando :

$$\frac{Células}{ml} = \left(\frac{N}{4}\right) x\ 2\ x\ 10^4$$

2.10 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron registrados y organizados en una base de datos en Microsoft Excel y posteriormente analizados utilizando el software Rstudio 4.4.1. La viabilidad del cultivo se definió de manera cualitativa como la presencia de al menos una célula compatible con *Blastocystis spp.* en el cultivo a las 48 horas post-incubación, considerándose como cultivo negativo la ausencia de crecimiento detectable. Para el análisis cuantitativo, se empleó la carga parasitaria expresada en células/mL.

Posteriormente los recuentos celulares se transformaron mediante $\log_{10}$(células/mL + 1) con la finalidad de reducir la asimetría de la distribución de los datos, manejar la amplia variabilidad de los valores observados e incluir las muestras con recuentos iguales a cero en el análisis estadístico y la representación gráfica, facilitando así una interpretación más clara de los resultados.

Dado que las mismas muestras fueron evaluadas en distintos tiempos de almacenamiento (1 día, correspondiente a la muestra fresca, 72 horas, 7, 15 y 30 días), se utilizó un diseño de medidas repetidas. La comparación global de la carga parasitaria entre los diferentes tiempos de almacenamiento se realizó mediante la prueba no paramétrica de Friedman, al no asumirse normalidad en la distribución de los datos. Al detectarse diferencias estadísticamente significativas, se efectuaron comparaciones post hoc pareadas utilizando la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas, aplicando el ajuste de Holm para el control del error por comparaciones múltiples.

La proporción de cultivos viables en cada tiempo de almacenamiento se expresó como porcentaje, acompañado de intervalos de confianza al 95 %, calculados mediante el método de Wilson. Para evaluar diferencias globales en la viabilidad del cultivo a lo largo del tiempo, se empleó la prueba de Cochran's Q, adecuada para variables dicotómicas con medidas repetidas. Luego se consideraron comparaciones pareadas posteriores mediante la prueba de McNemar, con corrección por comparaciones múltiples.

Los resultados se representaron gráficamente mediante diagramas de caja con puntos individuales para la carga parasitaria, gráficos de barras con intervalos de confianza para la proporción de cultivos viables, mapas de calor (heatmaps) para visualizar la heterogeneidad interindividual y gráficos de líneas individuales (spaghetti plots) para ilustrar la dinámica de cada muestra a lo largo del tiempo. En el caso del spaghetti plot, los valores iguales a cero fueron omitidos únicamente para fines de visualización, mientras que dichos valores fueron conservados en todos los análisis estadísticos. En todos los análisis se consideró un nivel de significancia estadística de $p < 0.05$.

2.11 Consideraciones éticas

La presente investigación fue evaluada y aprobada por el Comité de Ética para la Investigación de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga", según consta en el Certificado CEI-UNICA-N016/09-2025 (Anexo 2). Durante el desarrollo del estudio se aseguró la confidencialidad de los datos mediante la codificación y anonimización de los participantes, garantizando la protección de su identidad. Asimismo, la investigación se llevó a cabo respetando los principios éticos fundamentales, tales como el respeto por las personas, la beneficencia y la justicia, de acuerdo con las normativas éticas vigentes aplicables a investigaciones con muestras biológicas humanas.

III. RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la viabilidad del cultivo *in vitro* de *Blastocystis spp.* a partir de muestras fecales almacenadas a 4 °C y -20 C durante distintos periodos de tiempo. La viabilidad del parásito fue analizada, mediante la determinación de la carga parasitaria expresada como células/mL, y a través de la proporción de cultivos viables definidos por la presencia o ausencia de crecimiento parasitario.

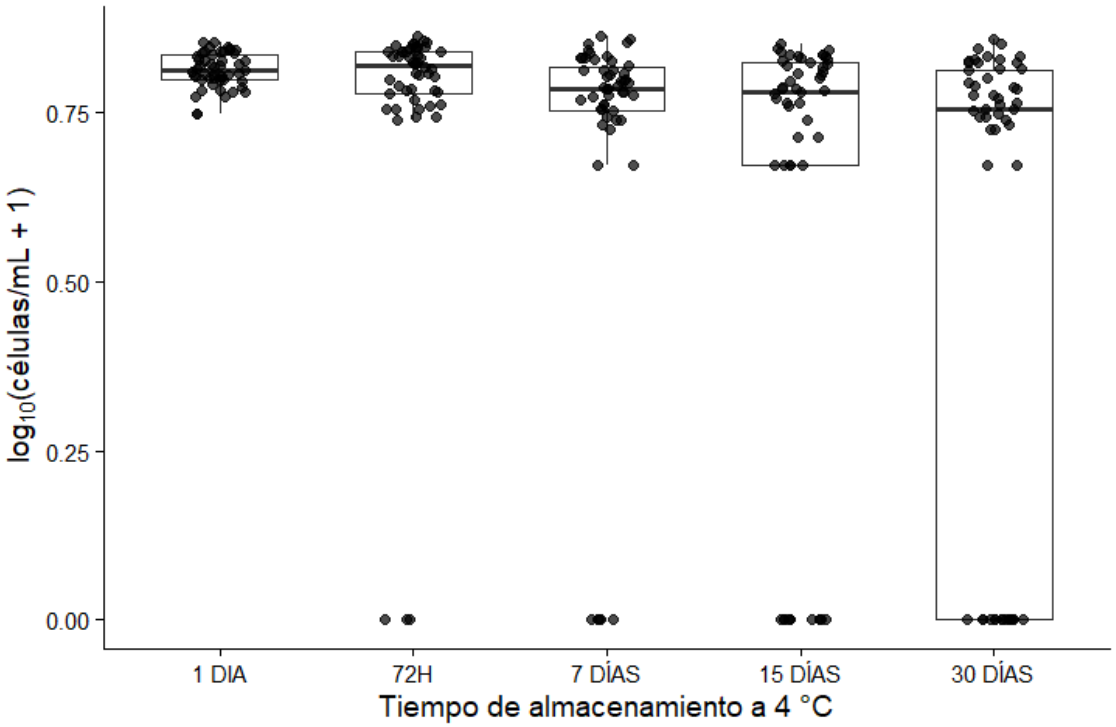


Figura 1. Viabilidad de *Blastocystis spp.* tras el almacenamiento a 4 °C. Los diagramas de caja representan la distribución de la carga parasitaria, expresada como $\log_{10}$(células/mL + 1) en cada punto temporal.

Tabla 1. Comparaciones pareadas de la carga parasitaria de *Blastocystis spp.* según el tiempo de almacenamiento a 4 °C (prueba de Wilcoxon pareada con ajuste de Holm).

Comparación	**W (Wilcoxon)**	**P valor**	**P valor ajustado (Holm)**
1 día vs 72 h	721	0.423	0.846
1 día vs 7 días	1070	0.0000304	< 0.001***
1 día vs 15 días	1097	0.00000938	< 0.001***
1 día vs 30 días	1120	0.00000335	< 0.001***
72 h vs 7 días	956	0.000645	0.003**
72 h vs 15 días	999	0.000123	< 0.001***
72 h vs 30 días	955	0.000171	0.001**
7 días vs 15 días	583	0.463	0.846
7 días vs 30 días	902	0.004	0.016*
15 días vs 30 días	682	0.212	0.636

NS: no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

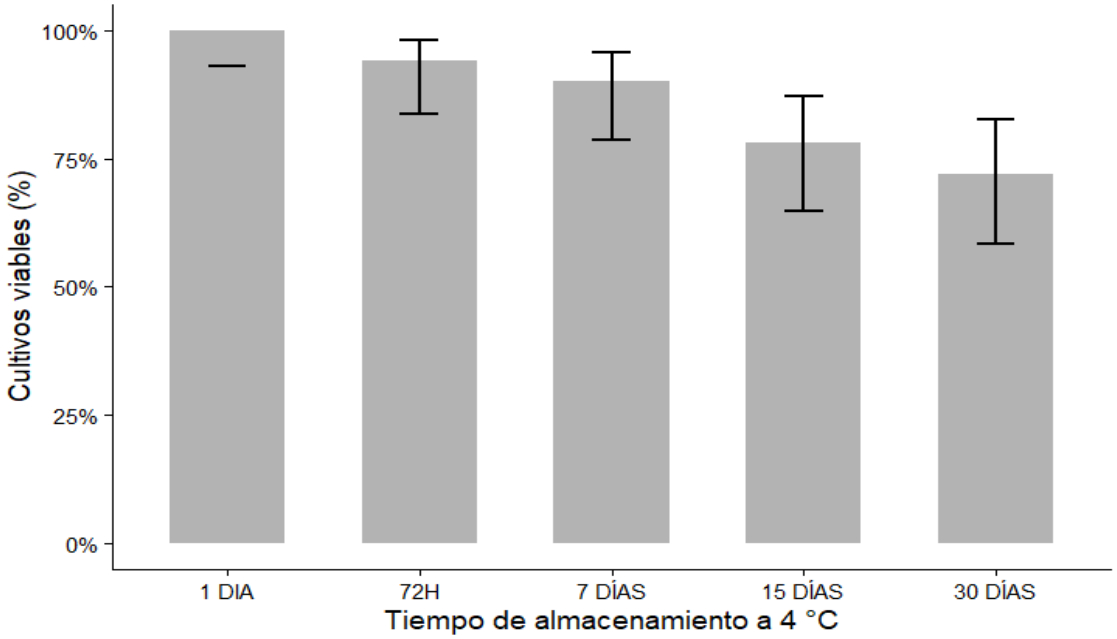


Figura 2. Proporción de cultivos viables de *Blastocystis spp.* tras el almacenamiento a 4 °C. Las barras representan el porcentaje de cultivos positivos (≥1 célula detectada) en cada punto temporal. Las barras de error indican intervalos de confianza del 95 % (método de Wilson).

Tabla 2. Resultados de las comparaciones pareadas de la viabilidad del cultivo de *Blastocystis spp.* entre los diferentes tiempos de almacenamiento a 4 °C (prueba de McNemar, ajuste de Holm).

Comparación	**P valor**	**P valor ajustado (Holm)**
1 día vs 72 h	0.24821	0.745
1 día vs 7 días	0.07364	0.368
1 día vs 15 días	0.00257	0.023*
1 día vs 30 días	0.00051	0.005**
72 h vs 7 días	0.68309	1.000
72 h vs 15 días	0.04331	0.303
72 h vs 30 días	0.00982	0.079
7 días vs 15 días	0.11385	0.455
7 días vs 30 días	0.05235	0.314
15 días vs 30 días	0.64636	1.000

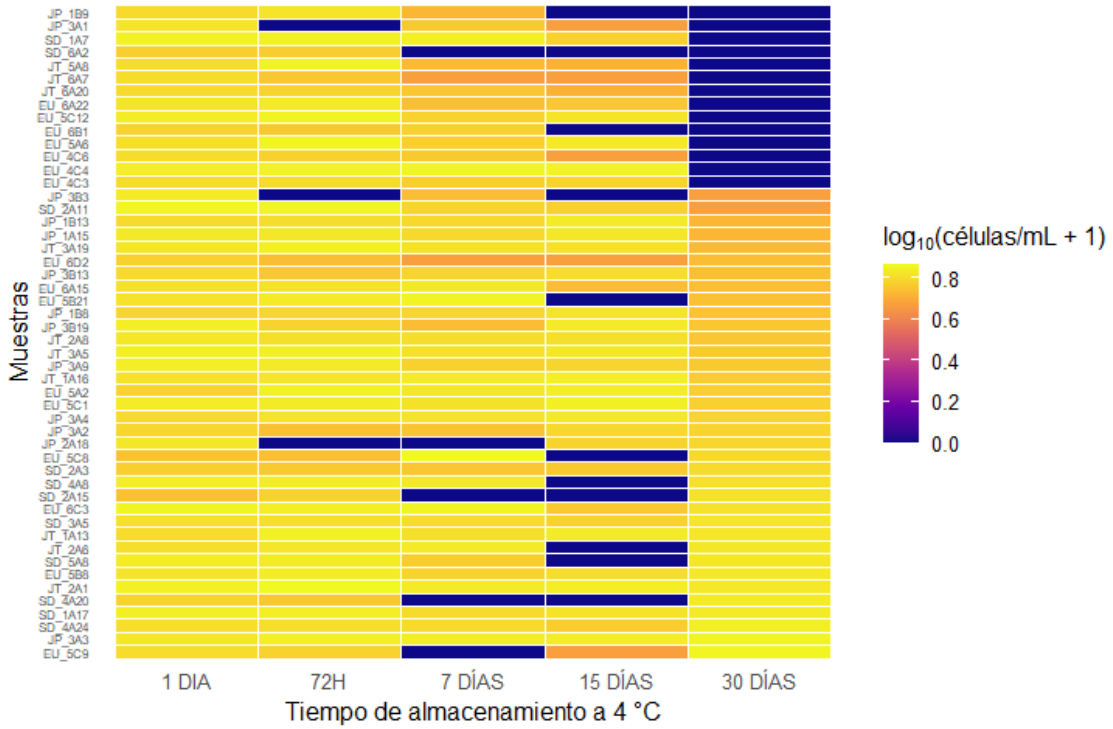


Figura 3. Mapa de calor que muestra la dinámica de la viabilidad de *Blastocystis spp.* durante el almacenamiento a 4 °C. Cada fila representa una muestra individual (n = 50) y cada columna, un tiempo de almacenamiento. La intensidad del color indica la carga parasitaria expresada en $\log_{10}$ (células/mL + 1)-

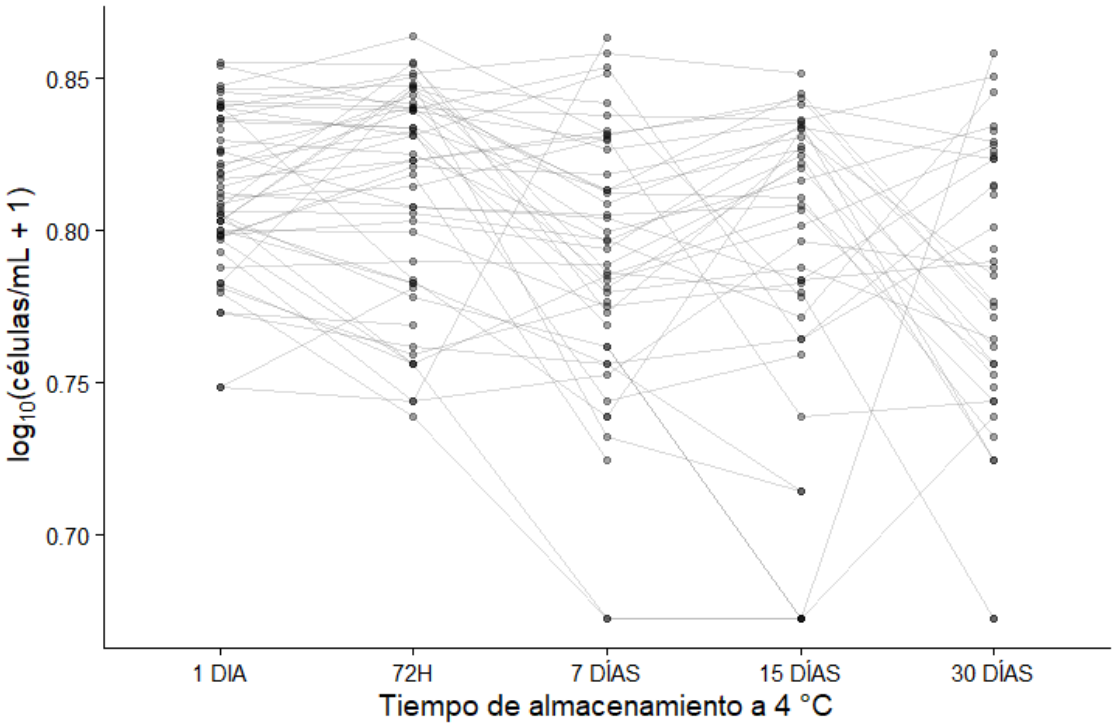


Figura 4. Dinámica individual de la carga parasitaria de *Blastocystis spp.* durante el almacenamiento a 4 °C

IV. DISCUSIÓN

El presente estudio evaluó la viabilidad del cultivo *in vitro* de *Blastocystis* spp. a partir de muestras fecales humanas sometidas a diferentes condiciones de conservación, específicamente refrigeración a 4 °C y congelación a −20 °C, durante distintos periodos de almacenamiento. Los resultados obtenidos aportan evidencia relevante sobre el comportamiento biológico de este parásito frente al estrés por almacenamiento y permiten contextualizar su recuperación en cultivo dentro de escenarios reales de diagnóstico parasitológico, particularmente en zonas con limitaciones logísticas.

Los parásitos del género *Blastocystis* corresponden a microorganismos unicelulares, eucariotas y de metabolismo anaerobio, capaces de colonizar el tracto gastrointestinal de diversos mamíferos, incluido el ser humano. Durante años fueron considerados organismos comensales del intestino grueso, debido a que con frecuencia se detectaban en individuos asintomáticos. No obstante, evidencias clínicas posteriores, junto con la sintomatología reportada por pacientes infectados, han permitido replantear su rol biológico, sugiriendo un potencial carácter patógeno. En la actualidad, *Blastocystis* spp. es reconocido como un posible agente causal de diarrea crónica, particularmente en personas con compromiso del sistema inmunológico, así como en pacientes que presentan trastornos funcionales intestinales, estados de desnutrición, neoplasias o antecedentes de trasplante de órganos (28,29).

Desde su hallazgo, la clasificación taxonómica de *Blastocystis spp*. ha mostrado gran variabilidad. Fue descrito por primera vez a inicios del siglo XX por Alexeieff en 1911, quien lo denominó *Blastocystis enterocola*. En su análisis, descartó que se tratara de un quiste de *Trichomona intestinalis*, como se había señalado previamente, y lo clasificó dentro de las levaduras (Ascomycetes) al identificar estructuras morfológicas semejantes a este grupo de hongos, posteriormente, el parasitólogo francés Brumpt en 1912, lo renombró como *Blastocystis hominis*, aunque mantuvo la consideración de que correspondía a “una levadura intestinal inocua” presente en muestras fecales humanas (30).

En 1991, se redefinió como protozoo, aunque de manera incorrecta se describió como el quiste de un flagelado; posteriormente, en 1996, gracias a estudios moleculares, se integró al grupo de los *Stramenopilas*, que incluye a las algas pardas, doradas y a las diatomeas. Dentro del sistema de clasificación de seis reinos (Monera, Protista, Cromista, Fungi, Plantae y Animalia) *Blastocystis* no es considerado un protozoario (Protista) siendo en 1998 que se le incluye en al reino Chromista, posición mantenida hasta la actualidad dentro del phylum Stramenopiles, clase Blastocystae, orden Blastocystida y familia Blastocystidae (31–33).

Las especies del género *Blastocystis* se caracterizan por presentar una notable diversidad morfológica, con variaciones en tamaño y estructura, y la capacidad de transformarse entre distintas formas en respuesta a condiciones ambientales. Entre las principales formas descritas se encuentran la vacuolar, avacuolar, multivacuolar, granular, ameboide y quística. La transmisión ocurre principalmente por la vía fecal-oral, siendo el quiste la forma infectante. Una vez ingerido por el huésped, el quiste experimenta un proceso de excistación en el tracto gastrointestinal, dando origen a formas vacuolares que se multiplican mediante fisión binaria. Posteriormente, estas formas se enquistan en la luz intestinal, generando nuevos quistes que son eliminados a través de las heces, lo que permite la continuidad del ciclo de transmisión (28,34).

Por lo expuesto anteriormente es fundamental seguir contribuyendo a la generación de conocimiento sobre este parásito. En este sentido, uno de los hallazgos más consistentes del estudio fue la ausencia total de crecimiento de *Blastocystis spp.* en las muestras conservadas a −20 °C, independientemente del tiempo de almacenamiento. Este resultado concuerda con lo reportado por Clark y Stensvold, quienes señalan que *Blastocystis* no tolera procesos de congelación en ausencia de crioprotectores adecuados, debido a la formación de cristales de hielo que comprometen la integridad celular (20). De manera similar, Padukone et al. describieron que la congelación directa de muestras fecales sin tratamiento previo afecta negativamente la recuperación del parásito en cultivo, aun cuando la detección molecular pueda mantenerse positiva (15). En este sentido, los resultados del presente estudio refuerzan la recomendación de evitar la congelación a −20 °C cuando el objetivo es el aislamiento *in vitro* del organismo.

En contraste, las muestras conservadas a 4 °C mostraron una elevada viabilidad durante los primeros días de almacenamiento, con un 100 % de cultivos positivos al día 1 y una viabilidad sostenida hasta los 7 días. Este comportamiento coincide con lo reportado por Gallegos et al. en Perú, quienes observaron un crecimiento óptimo de *Blastocystis* spp. en medio de Jones cuando las muestras eran procesadas en un corto intervalo tras su recolección (19). Asimismo, Boutahar et al. documentaron que el cultivo *in vitro* mantiene una sensibilidad aceptable cuando las muestras fecales se conservan bajo refrigeración, superando ampliamente al examen directo (17).

No obstante, a partir del día 7 de almacenamiento se evidenció una disminución progresiva de la carga parasitaria y de la proporción de cultivos viables, acompañada de una marcada heterogeneidad interindividual. Este patrón no lineal sugiere que la pérdida de viabilidad de *Blastocystis* spp. durante la refrigeración no ocurre de forma uniforme, sino que depende de factores intrínsecos de cada muestra. Estudios previos han propuesto que esta variabilidad podría estar asociada a diferencias entre subtipos. Karamati et al. demostraron que los subtipos ST1, ST2 y ST3 presentan tasas de crecimiento y tolerancia ambiental distintas en cultivo, lo que podría

explicar por qué algunas muestras conservan su capacidad de proliferación incluso tras periodos prolongados de almacenamiento (35).

La persistencia de cultivos viables hasta los 30 días en el 72.0% de las muestras representa un hallazgo de particular relevancia. Este resultado sugiere que, bajo condiciones de refrigeración, *Blastocystis spp.* puede sobrevivir durante lapsos prolongados sin perder completamente su capacidad replicativa. Wawrzyniak et al. plantearon que la plasticidad morfológica del parásito, especialmente la transición hacia formas quísticas o de bajo metabolismo, podría favorecer su supervivencia frente a condiciones adversas (12). En concordancia, el presente estudio observó patrones compatibles con una posible "recuperación tardía" del crecimiento, lo que refuerza la hipótesis de la existencia de subpoblaciones más resistentes al estrés por frío.

La heterogeneidad observada en los mapas de calor y gráficos individuales también podría estar influenciada por la carga parasitaria inicial de las muestras. Gallegos et al. (2010) demostraron que el éxito del cultivo está directamente relacionado con la carga inicial de *Blastocystis* spp., siendo el medio de Jones particularmente eficiente incluso cuando esta es baja. Sin embargo, cargas iniciales reducidas podrían ser más susceptibles a la pérdida de viabilidad durante el almacenamiento prolongado, lo que explicaría la aparición de cultivos negativos en algunos tiempos intermedios (19).

Desde una perspectiva diagnóstica, los resultados obtenidos respaldan el uso del cultivo *in vitro* como una herramienta sensible y viable en contextos donde el procesamiento inmediato de las muestras no es posible. Süli et al. destacaron que el cultivo presenta mayor sensibilidad que la microscopía directa, aunque inferior a la PCR; no obstante, en escenarios rurales o de recursos limitados, el cultivo continúa siendo una alternativa accesible y funcional (16). En este contexto, los hallazgos del presente estudio son particularmente relevantes para regiones como la provincia de Ica, donde no existen antecedentes previos y donde el transporte de muestras hacia laboratorios de referencia puede requerir varios días.

Un hallazgo relevante del presente estudio es la alta viabilidad de *Blastocystis* spp. en muestras fecales conservadas a 4 °C durante periodos prolongados, incluso hasta 30 días en una proporción considerable de las muestras analizadas. Este resultado contrasta con lo reportado por Chun-Lin Tian et al., quienes en un estudio preliminar sobre métodos de conservación de *Blastocystis hominis* indicaron que el parásito sobrevive menos de una semana cuando es almacenado a 4–6 °C, mientras que su supervivencia se prolonga únicamente bajo condiciones de criopreservación con agentes crioprotectores como glicerol, DMSO o etilenglicol y temperaturas ultrabajas (−20 °C y −196 °C) (21) .

Las diferencias observadas entre ambos estudios podrían atribuirse a variaciones metodológicas sustanciales. En primer lugar, Chun-Lin Tian et al. trabajaron con aislados previamente lavados y

procesados, sometidos a criopreservación controlada, mientras que en el presente estudio se evaluó la viabilidad de *Blastocystis spp.* directamente a partir de muestras fecales humanas, sin la adición de crioprotectores, lo que representa condiciones más cercanas a la práctica diagnóstica rutinaria. En segundo lugar, el estudio asiático evaluó la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripán, un método que detecta integridad de membrana, mientras que el presente trabajo definió la viabilidad desde una perspectiva funcional, basada en la capacidad real de proliferación en cultivo *in vitro*, lo cual constituye un criterio biológicamente más exigente.

Adicionalmente, las diferencias podrían estar relacionadas con la diversidad genética de *Blastocystis*. Estudios posteriores han demostrado que distintos subtipos presentan tasas de crecimiento y tolerancia ambiental variables, lo que sugiere que los aislamientos evaluados por Chun-Lin Tian et al. podrían corresponder a subtipos con menor tolerancia al almacenamiento en frío (21,35). En este sentido, la heterogeneidad interindividual observada en el presente estudio, con coexistencia de muestras altamente viables y otras con pérdida temprana de crecimiento, respalda la hipótesis de una respuesta diferencial al estrés por refrigeración.

Por lo tanto, lejos de invalidar los hallazgos previos, los resultados del presente estudio amplían el conocimiento existente, demostrando que, bajo condiciones reales de diagnóstico parasitológico, *Blastocystis* spp. puede conservar su capacidad replicativa a 4 °C durante periodos significativamente más largos de lo previamente descrito. Este hallazgo tiene implicancias prácticas importantes, especialmente para estudios epidemiológicos y diagnósticos en zonas rurales o de difícil acceso, donde la refrigeración constituye la principal estrategia de conservación de muestras fecales.

Asimismo, la evidencia generada contribuye a la estandarización de protocolos de conservación de muestras fecales para estudios epidemiológicos. Clark et al. (2013) subrayan que la falta de uniformidad metodológica ha sido una de las principales limitaciones en la comparación de estudios sobre *Blastocystis* spp. Al demostrar que la refrigeración a 4 °C permite una recuperación aceptable del parásito incluso hasta los 30 días, el presente trabajo ofrece información práctica para el diseño de futuras investigaciones de campo (20).

Finalmente, los resultados obtenidos refuerzan la necesidad de complementar los estudios de cultivo con análisis moleculares. La coexistencia de cultivos negativos con posibles infecciones subyacentes no detectables por métodos parasitológicos convencionales ha sido ampliamente documentada (16,17). En este sentido, la caracterización molecular de los subtipos presentes permitirá esclarecer si las diferencias observadas en viabilidad están asociadas a variaciones genéticas específicas, contribuyendo a una mejor comprensión de la biología, epidemiología y posible patogenicidad de *Blastocystis spp*.

Esta investigación aporta evidencia sólida sobre el impacto del tiempo y la temperatura de conservación en la viabilidad del cultivo *in vitro* de *Blastocystis spp.*, destacando la refrigeración a 4 °C como una condición adecuada para su recuperación en contextos diagnósticos y epidemiológicos, y señalando las limitaciones críticas del almacenamiento por congelación sin crioprotección.

Aportando información relevante y verificada sobre el manejo, tratamiento y conservación de muestras fecales positivas para *Blastocystis* spp., especialmente en contextos donde se requiere la referencia de muestras hacia laboratorios con mayor capacidad técnica para el diagnóstico parasitológico.

V. CONCLUSIONES

1. La viabilidad del cultivo *in vitro* de *Blastocystis spp.* se ve significativamente influenciada por las condiciones de conservación de las muestras fecales, evidenciándose diferencias estadísticamente significativas en función del tiempo y la temperatura de almacenamiento, lo que confirma que estos factores son determinantes para la recuperación exitosa del parásito en cultivo.

2. La refrigeración a 4 °C permite conservar la viabilidad de *Blastocystis* spp. en cultivo *in vitro* durante periodos prolongados, manteniéndose una alta proporción de cultivos viables durante los primeros 7 días y observándose crecimiento parasitario en una fracción considerable de las muestras incluso después de 30 días de almacenamiento.

3. La congelación a −20 °C sin el uso de agentes crioprotectores inactiva completamente a *Blastocystis spp.*, ya que ninguna de las muestras sometidas a esta condición evidenció crecimiento *in vitro*, lo que demuestra que este método de conservación no es adecuado cuando el objetivo es el aislamiento del parásito mediante cultivo.

4. La pérdida de viabilidad de *Blastocystis spp*. durante el almacenamiento a 4 °C no ocurre de manera homogénea, sino que presenta una marcada heterogeneidad interindividual, lo que sugiere la existencia de subpoblaciones con distinta tolerancia al estrés por refrigeración, posiblemente asociadas a variabilidad biológica intrínseca, como diferencias entre subtipos.

5. El cultivo *in vitro* en medio de Jones se confirma como una herramienta diagnóstica viable y aplicable en contextos con limitaciones logísticas, especialmente en zonas rurales o de difícil acceso, donde la refrigeración constituye la principal estrategia de conservación de muestras fecales, aportando una alternativa sensible para estudios epidemiológicos y diagnósticos de *Blastocystis spp.*

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda conservar las muestras fecales positivas para *Blastocystis spp*. bajo refrigeración a 4 °C cuando no puedan ser procesadas de inmediato, evitando la congelación a −20 °C sin agentes crioprotectores, con el fin de asegurar la viabilidad del parásito para su cultivo *in vitro*.

2. Se sugiere implementar y estandarizar protocolos de transporte y almacenamiento de muestras fecales en laboratorios clínicos y estudios de campo, especialmente en zonas rurales o de difícil acceso, considerando la refrigeración como la estrategia más adecuada para preservar la viabilidad de *Blastocystis spp.*

3. Se recomienda complementar el cultivo *in vitro* con estudios moleculares orientados a la identificación de subtipos de *Blastocystis spp.*, con el objetivo de determinar si las diferencias observadas en la viabilidad y tolerancia al almacenamiento están asociadas a la variabilidad genética del parásito.

4. Se propone evaluar el uso de agentes crioprotectores y condiciones de criopreservación controlada en estudios futuros, a fin de establecer protocolos eficaces para la conservación a largo plazo de *Blastocystis spp.* cuando se requiera mantener aislados viables para investigaciones experimentales o bancos de cepas.

5. Se recomienda ampliar este tipo de estudios a otras poblaciones y regiones del país, incluyendo diferentes grupos etarios y contextos epidemiológicos, con la finalidad de validar los resultados obtenidos y fortalecer el conocimiento sobre la viabilidad del cultivo *in vitro* de *Blastocystis spp.* a nivel nacional.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rojas-Velázquez L, Morán P, Serrano-Vázquez A, Portillo-Bobadilla T, González E, Pérez-Juárez H, et al. The regulatory function of *Blastocystis spp.* on the immune inflammatory response in the gut microbiome. Front Cell Infect Microbiol. 2022;12. https:// doi.org/10.3389/fcimb.2022.967724

2. Maloney JG, Lombard JE, Urie NJ, Shivley CB, Santin M. Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US pre-weaned dairy heifer calves. Parasitol Res. 2019;118(2):575–82. https:// doi.org/10.1007/s00436-018-6149-3

3. Vista de Blastocistosis. Actualización sobre su comportamiento epidemiológico [Internet]. [cited 2026 Jan 9]. Available from: https://revpanorama.sld.cu/index.php/panorama/article/view/1684/pdf_1

4. Robles Reyes RA, Yugcha Verdesoto AI. Prevalencia de parasitosis intestinal postratamiento. Unidad Educativa San Pablo, Guano, Chimborazo 2023. 2023 [cited 2026 Jan 9]; Available from: http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/11704

5. Falcone AC, Servián A, Lorena Zonta M, Navone GT. *Blastocystis sp.* (parásito intestinal potencialmente patógeno). In: Protozoos parásitos de importancia sanitaria: un abordaje transdisciplinar [Internet]. 2023. p. 176–82. Available from: http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/154565

6. Tan KSW, Singh M, Yap EH. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. Int J Parasitol [Internet]. 2002 [cited 2026 Jan 9];32(7):789–804. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S002075190200005X

7. Zierdt CH. Blastocystis hominis--past and future. Clin Microbiol Rev [Internet]. 1991 [cited 2026 Jan 9];4(1):61–79. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2004348/

8. Zierdt CH. Studies of Blastocystis hominis. J Protozool [Internet]. 1973 [cited 2026 Jan 9];20(1):114–21. https:// doi.org/10.1111/j.1550-7408.1973.tb06013.x

9. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Ng GC, et al. Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of Blastocystis hominis from human feces. Parasitol Res [Internet]. 1996 [cited 2026 Jan 9];82(5):439–44. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8738284/

10. del Coco VF, Molina NB, Basualdo JA, Córdoba MA. Blastocystis spp.: avances, controversias y desafíos futuros. Rev Argent Microbiol [Internet]. 2017 [cited 2026 Jan

9];49(1):110–8. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754116300876?via%3Dihub

11. Pandey PK, Verma P, Marathe N, Shetty S, Bavdekar A, Patole MS, et al. Prevalence and subtype analysis of *Blastocystis* in healthy Indian individuals. Infection, Genetics and Evolution. 2015 ;31:296–9. https:// doi.org/10.1016/j.meegid.2015.02.012

12. 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):167–78. https:// doi.org/10.1177/2049936113504754

13. Garaycochea Maria, Beltran Maria. Parasitosis intestinales en zonas rurales de cuatro provincias del departamento de Lima. Lima; 2023.

14. Ministerio de Salud del Perú. Plataforma digital única del Estado Peruano. 2022. INS: el 90 % de parásitos se transmiten mediante el consumo de alimentos contaminados.

15. Padukone S, Mandal J, Rajkumari N, Bhat B, Swaminathan R, Parija S. Detection of *Blastocystis* in clinical stool specimens using three different methods and morphological examination in Jones' medium. Trop Parasitol. 2018;8(1):33. https:// doi.org/10.4103/tp.TP_4_18

16. Süli T, Kozoderović G, Potkonjak A, Simin S, Simin V, Lalošević V. Comparison of Conventional and Molecular Diagnostic Techniques for Detection of *Blastocystis sp.* in Pig Faeces. Iran J Parasitol. 2018;13(4):594–601.

17. Boutahar M, Belaouni M, Ibrahimi A, Eljaoudi R, Aanniz T, Er-Rami M. Prevalence of *Blastocystis sp.* in Morocco: Comparative assessment of three diagnostic methods and characterization of parasite forms in Jones' culture medium. Parasite. 2023;30:64. https:// doi.org/10.1051/parasite/2023065

18. Rauff-Adedotun AA, Nuur Syafyqah S, Nur Soleha R, Noranis Shahida S, Farah Haziqah MT. Prevalence of *Blastocystis sp.* in freshwater fishes, poultry, and caprine from Penang, Malaysia. Vet Parasitol Reg Stud Reports. 2022;33:100749. https:// doi.org/10.1051/parasite/2023065

19. Gallegos L, González A, López-Urbina T, Gonzales-Gustavson E, Gómez-Puerta L, Arroyo G. Comparación de la eficacia de tres medios de cultivo in vitro para el desarrollo de *Blastocystis spp.* Rev Inv Vet Perú. 2013;24(4):480–8.

20. Clark CG, Stensvold CR. *Blastocystis*: Isolation, Xenic Cultivation, UNIT 20A.1 and Cryopreservation. Curr Protoc Microbiol. 2016;43(1). https:// doi.org/10.1002/cpmc.18

21. Tian CL, Wan XL, Liu DY, He DX. A preliminary study on preservation methods of *Blastocystis hominis*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 2007;25(1):57–60.

22. PAHO. Medios auxiliares para el diagnóstico de las parasitosis intestinales. Organización Panamericana de la Salud; 2020.

23. World Health Organization. Basic laboratory methods in medical parasitology. Geneva; 1991.

24. World Health Organization. Manual of basic techniques for a health laboratory. 2nd ed. Geneva; 2003.

25. Ash LR, Orihel TC. Atlas de prasitología Humana. 5th edition. American Society for Clinical Pathology Press, editor. Chicago; 2007.

26. Zhang M, Gu L, Zheng P, Chen Z, Dou X, Qin Q, et al. Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. J Clin Lab Anal. 2020;34(1). https:// doi.org/10.1002/jcla.23024

27. Department of Health & Family Welfare. Standard operating Procedures (Sops). New Delhi; 2016.

28. Pawelec-Pęciak O, Łanocha-Arendarczyk N, Grzeszczak K, Kosik-Bogacka D. The Role of *Blastocystis spp.* in the Etiology of Gastrointestinal and Autoimmune Diseases. Pathogens. 2025;14(4):313. https:// doi.org/10.3390/pathogens14040313

29. Badparva E, Kheirandish F. Blastocystis hominis: A Pathogenic Parasite. Arch Clin Infect Dis. 2020 Nov 16;15(4). https:// doi.org/10.5812/archcid.97388

30. Cazorla-Perfetti D. ¿*Blastocystis sp*. o *B. hominis*? ¿Protozoario o chromista ? Saber [Internet]. 2014 [cited 2026 Jan 9];26(3):343–6. Available from: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-01622014000300015&lng=es&nrm=iso&tlng=es

31. Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, Tanowitz HB. *Blastocystis*: to treat or not to treat. Clin Infect Dis [Internet]. 2012 [cited 2026 Jan 9];54(1):105–10. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22075794/

32. Salinas JL, Vildozola Gonzales H. Infección por Blastocystis. Revista de Gastroenterología del Perú [Internet]. 2007 [cited 2026 Jan 9];27(3):264–74. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292007000300007&lng=es&nrm=iso&tlng=es

33. Sánchez-Vega JT, Morales-Galicia AE, Tapia-Castor AC, Sánchez-Aguilar DI, Navez-Valle A, Coquis-Téllez B, et al. Análisis retrospectivo de un protozoo emergente en México: *Blastocystis spp.* Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud [Internet]. 2022 Aug 15 [cited 2026 Jan 9];20(2):101–10. Available from: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282022000200101&lng=es&nrm=iso&tlng=es

34. Jeremiah S, Parija S. *Blastocystis*: Taxonomy, biology and virulence. Trop Parasitol. 2013;3(1):17. https:// doi.org/10.4103/2229-5070.113894

35. Karamati SA, Mirjalali H, Niyyati M, Rezaei Riabi T, Yadegar A, Asadzadeh Aghdaei H, et al. Comprehensive Study of Phenotypic and Growth Rate Features of Blastocystis Subtypes 1-3 and 6 in Symptomatic and Asymptomatic Subjects. Iran J Parasitol. 2019;14(2):204–13.

VIII. ANEXOS

Anexo 1

Ficha de Recolección de Datos

Investigador responsable: _____

Fecha de recolección: ____/_____/_____

Código de muestra:

Datos generales de la muestra

Código de la muestra	_____
Fecha de recolección fecal	_____/_____/_____
Método de confirmación inicial	☐ Examen directo ☐ Sedimentación ☐ PCR

Condición de conservación de la alícuota

Tipo de conservación	☐ Refrigeración (4 °C) ☐ Congelación (-20 °C)
Tiempo de almacenamiento	☐ 24h ☐ 72h ☐ 7 días ☐ 15 días ☐ 1 mes
Temperatura exacta registrada	_____ ____°C

Datos del cultivo

Fecha de siembra	_____/_____/_____
Fecha de evaluación	_____/_____/_____
Microscopía	☐ Estándar
Resultado del cultivo	☐ Positivo ☐ Negativo
Recuento (células/mL) (Neubauer)	_____
Observaciones adicionales	_____

Uso final de la muestra

Conservación posterior	☐ Descarte ☐ Conservación (-20 °C)
Destino	☐ Archivo ☐ PCR ☐ Otro: _____

Anexo 1.

Constancia de cumplimiento ético para investigación.

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN

CEI-UNICA-N016/09-2025

CERTIFICADO

EL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA", CERTIFÍCA:

Que, el proyecto de investigación titulado:

Evaluación de la viabilidad del cultivo in vitro de *Blastocystis spp.* a partir de muestras fecales

Del autor:

Bach. Centeno Ponciano Camila

Cuyos asesores son:

Mag. Mendoza Yáñez, Cesar Augusto

Mag. Márquez Guzmán, Davis Jesús

Revisado por:

Comité de Ética para la Investigación

Cumple con los lineamientos éticos y procedimientos establecidos en el Reglamento del Comité de Ética para la investigación con seres humanos, animales y plantas de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga", aprobado mediante Resolución Rectoral N°1305-R-UNICA-2020 y con la normativa nacional vigente en materia de ética de la investigación.

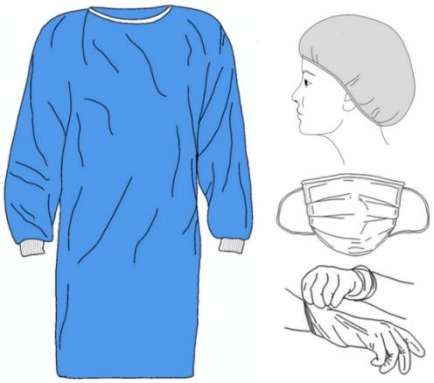
Asimismo, el proyecto se ajusta a los principios éticos internacionales contenidos en la Declaración de Helsinki y las Pautas CIOMS/OMS, garantizando el respeto a la dignidad humana, la obtención del consentimiento informado, la protección de los participantes y, en caso de uso de animales, el cumplimiento de las disposiciones sobre bienestar y cuidado.

En fe de lo cual, y para los fines que correspondan, se expide el presente certificado a los 09 días del mes de septiembre de 2025.

Dra. Norma Pastor Ramírez
Presidente
Comité de Ética para la Investigación
Universidad Nacional "San Luis Gonzaga"

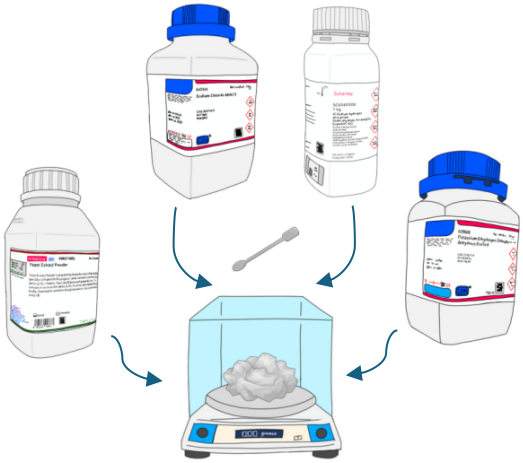
Anexo 2.

Esquematización preparación del medio de Cultivo de Jones.



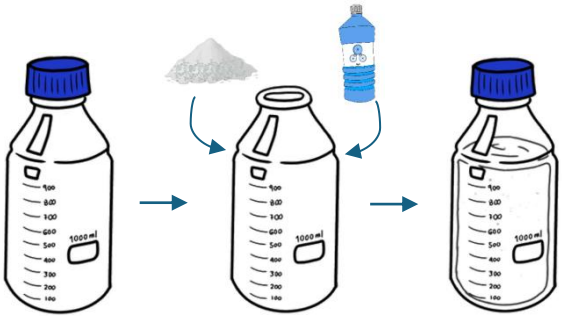
1

Colocar Equipo de Protección Personal.



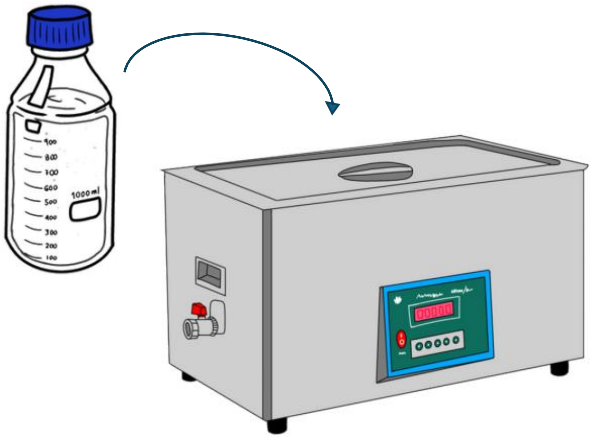
2

Pesaje de componentes: $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, KH_2PO_4, NaCl y extracto de levadura.



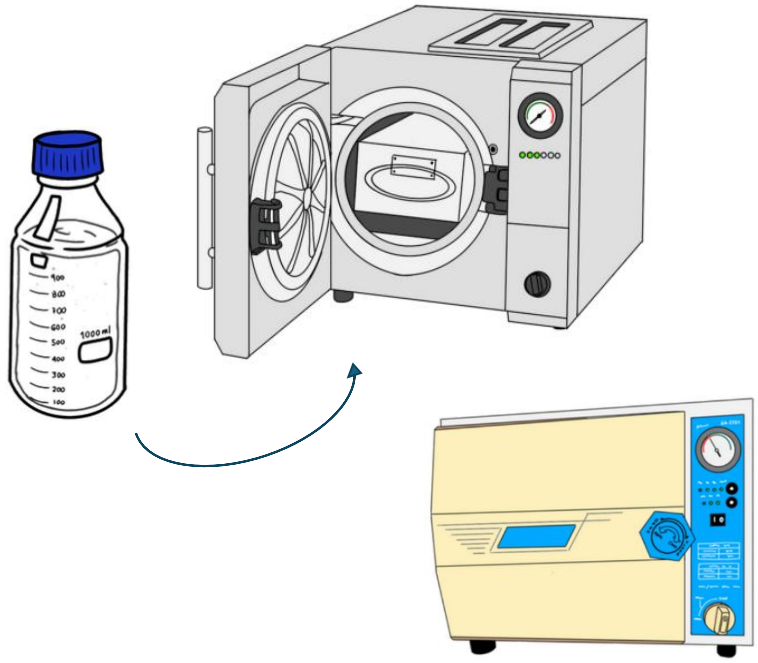
3

Preparación de solución base en frasco de 1000mL componentes pesados con 950mL de agua



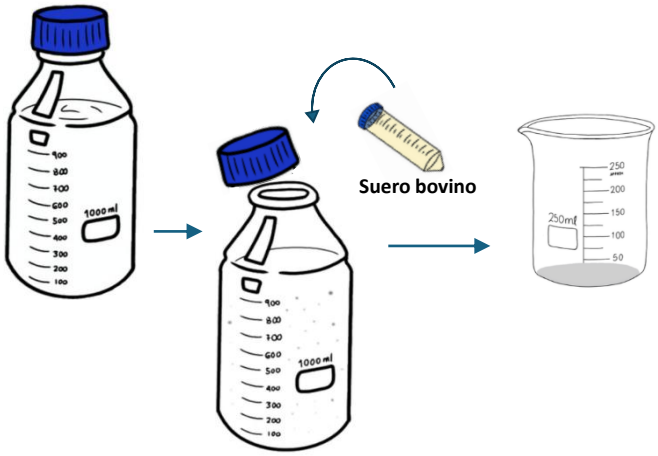
4

Sonicación de la mezcla para asegurar la homogeneidad (5min).



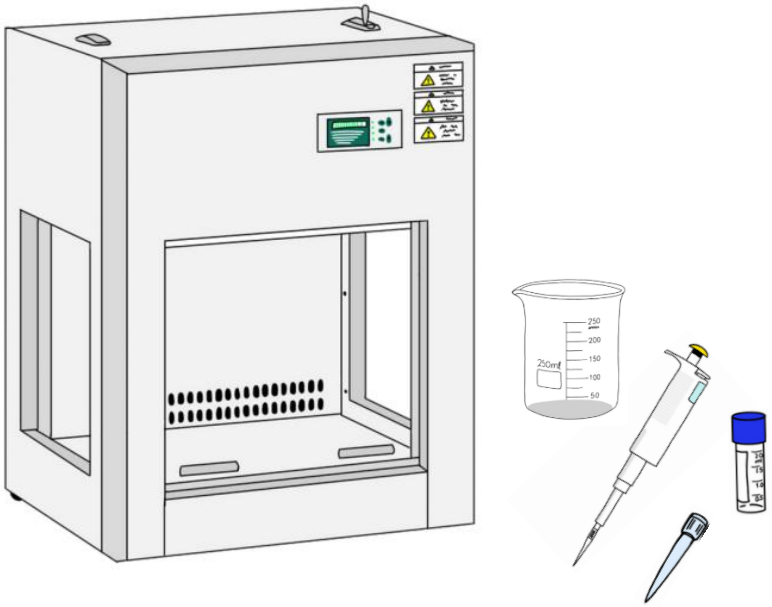
5

Esterilización en autoclave.



6

Post esterilización, adición de suero bovino y distribución para alícuotas.

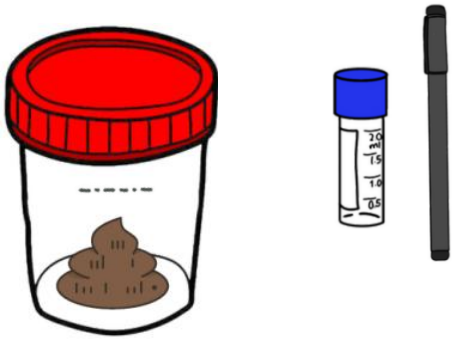


7

Fraccionamiento en alícuotas de 1800µL del medio en microviales y refrigeración a 4°C.

Anexo 3.

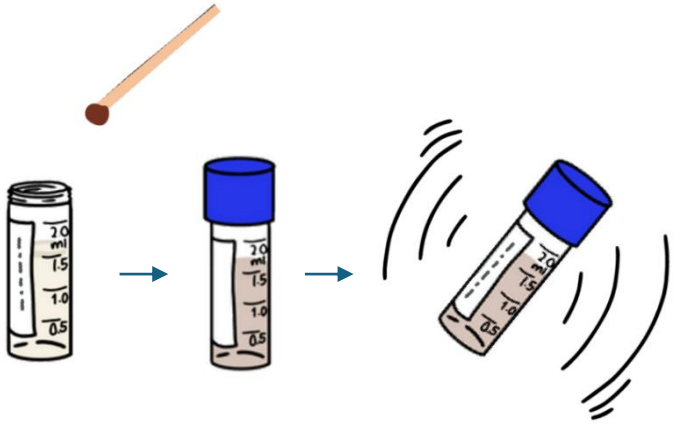
Esquematización de inoculación de las muestras fecales en el medio de cultivo.



Muestra de heces

1

Rotulación de microviales.



2

Inoculación de muestra en medio, homogenización mediante agitación.

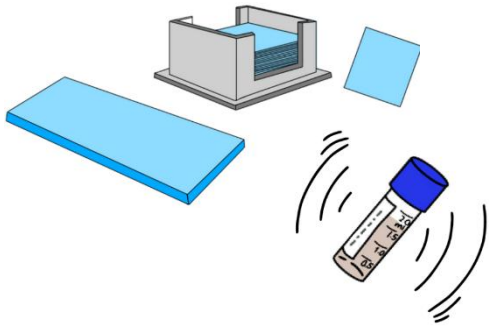


3

Incubación a 37°C durante 48h.

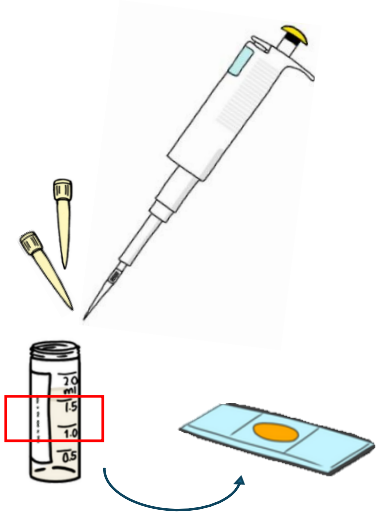
Anexo 4.

Esquematización de evaluación del crecimiento in vitro de *Blastocystis spp*. en cultivo



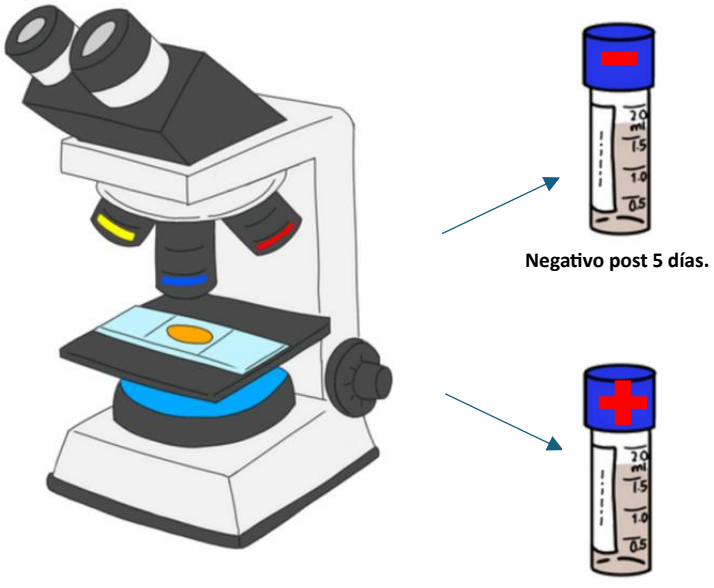
1

Homogenización post 48h de incubación.



2

Colocar 40µL de la parte media del cultivo en portaobjeto.

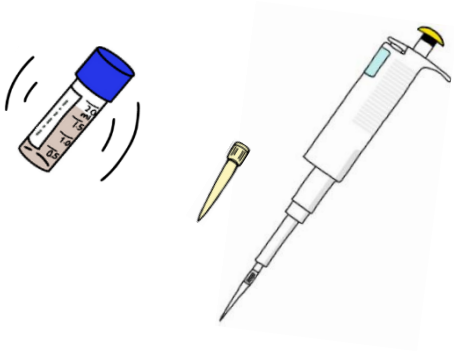


3

Observar al microscopio con objetivo de 40X y reportar.

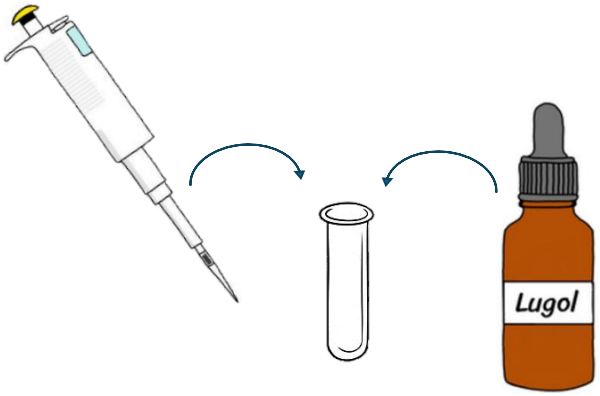
Anexo 5.

Esquematización de cuantificación celular mediante cámara de Neubauer.



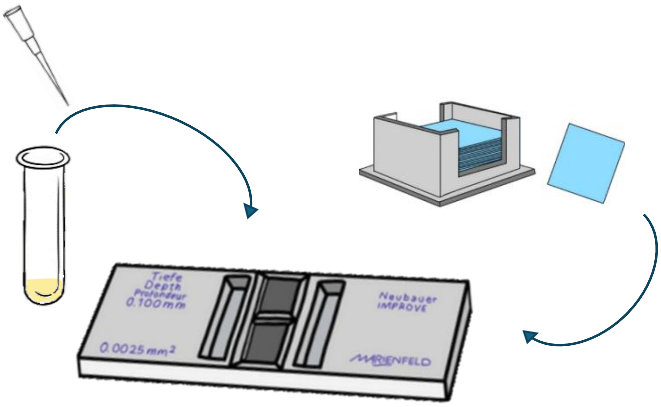
1

Homogenizar suavemente el microvial, tomar 100µL del medio.



2

En un tubo se adicionó y homogenizó 100µL de del medio y 100µl de Lugol.



3

Colocación de cubreobjetos en cámara de Neubauer y 10µL de la mezcla en un compartimiento lateral. Reposa 2min.

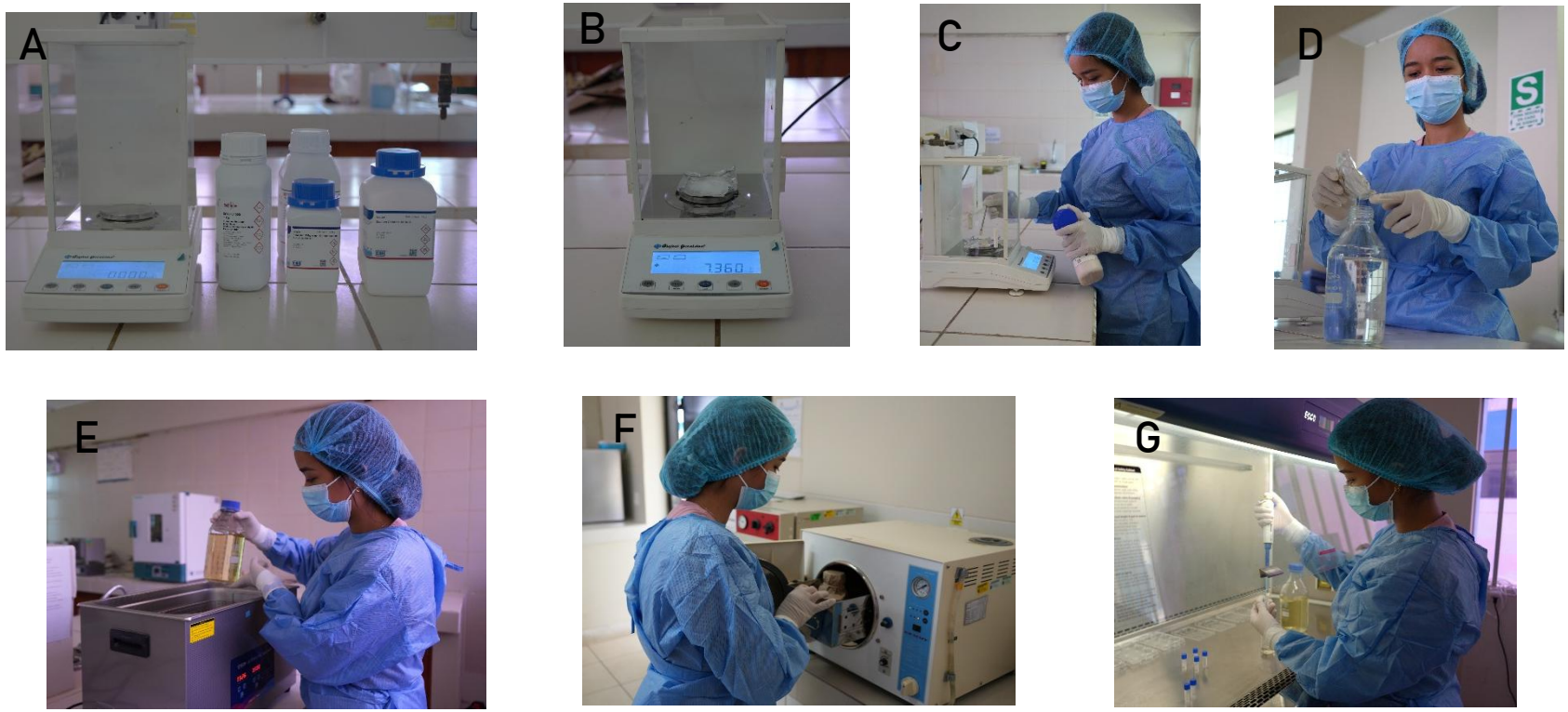


4

Llevar a observación microscópica para recuento celular y reportar.

Anexo 6.

Preparación del medio de Cultivo de Jones

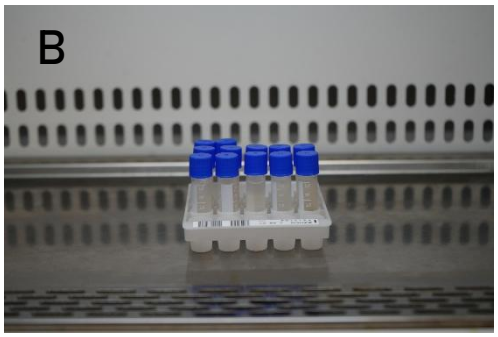


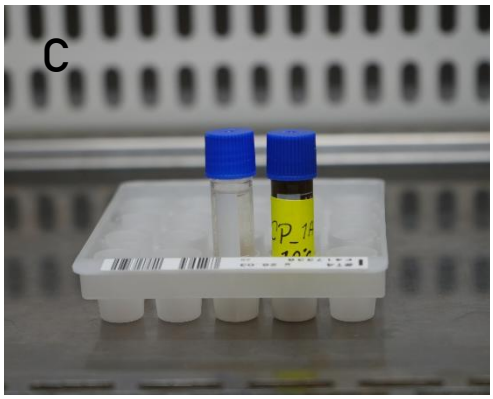
Pasos para preparación de medio de Cultivo de Jones: A) Componentes para medio fosfato disódico dodecahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), fosfato monopotásico (KH_2PO_4), Cloruro de sodio (NaCl) y extracto de levadura; B) Pesaje de Cloruro de Sodio (7,36g); C) Pesaje de componentes; D) Dilución de componentes en 950mL de Agua Desionizada; E) Sonificación de mezcla; F) Esterilización en autoclave; G) Alicuotas de 1800µL a microviales estériles.

Anexo 7.

Inoculación de las muestras fecales en el medio de cultivo.









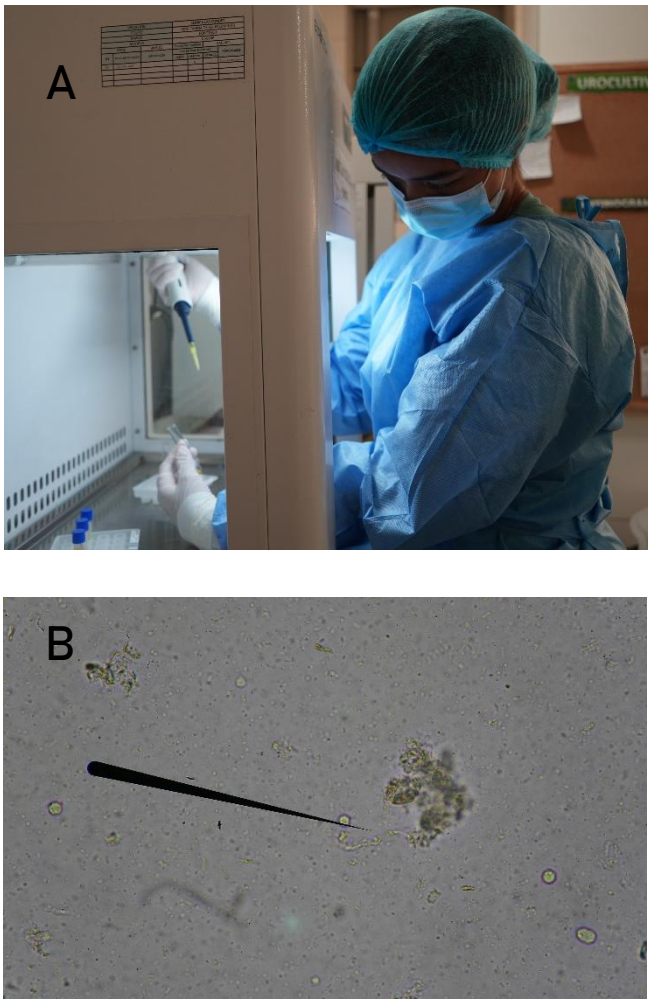




Pasos para inoculación de muestras: A) Muestras de heces proporcionadas; B) Medios de cultivos de Jones para rotulación; C) Muestra de heces almacenada previo a inoculación; D) Inoculación de muestra en medio; E) Homogenización por agitación; F) Incubación de medios inoculados a 37°C durante 48h.

Anexo 8.

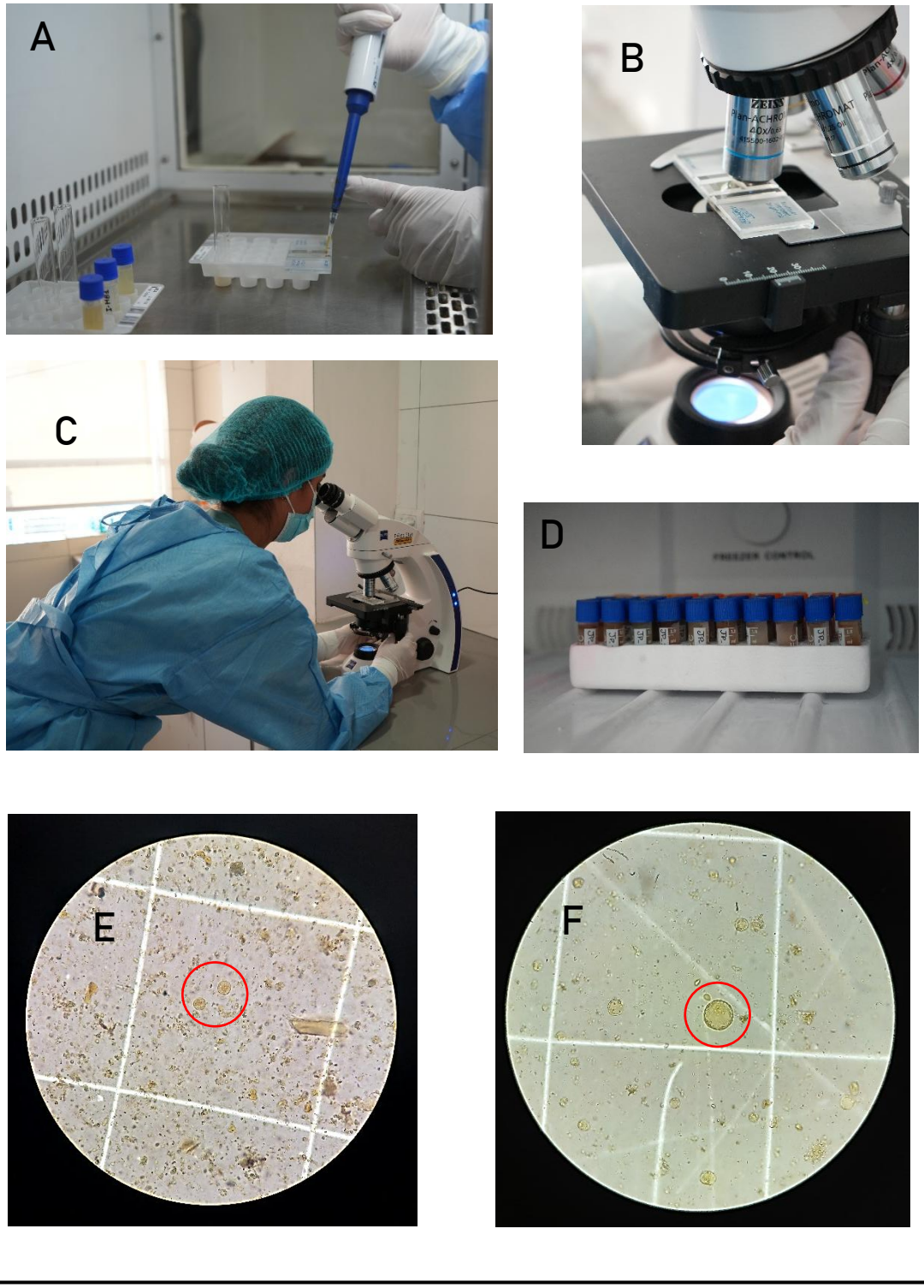
Evaluación del crecimiento in vitro de *Blastocystis spp*. en cultivo



Seguimiento de crecimiento in vitro: A) Extracción de 40µL de parte media de cultivo para observación microscópica; B) Formas morfológicas de *Blastocystis spp*. en medio de Jones (40x).

Anexo 9.

Cuantificación celular mediante cámara de Neubauer



Cuantificación celular: A) Carga 10µL de la mezcla en cámara de Neubauer; B) Cámara de Neubauer en reposo para realizar conteo; C) Proceso de conteo celular; D) Conservación de muestras en congelación para preservación; E) Formas granular de *Blastocystis spp.* en Cámara de Neubauer (40x); F) Forma vacuolar de *Blastocystis spp* en Cámara de Neubauer (40x).