

Artículo original

Importancia del método de preservación merthiolate-iodo-formaldehído para la detección de parásitos intestinales en muestras de heces seriadas

Zulay Ramírez, Anaibeth Nessi*, María Vethencourt, Carmen Guzmán, Mónica Galindo, Carolina Wagner, María Pérez de Galindo

Laboratorio de Amibiasis, Cátedra de Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Recibido 6 de febrero de 2020; aceptado 7 de agosto de 2020

Resumen: Las parasitosis intestinales constituyen un problema de salud pública, siendo los niños menores de 5 años más susceptibles. Su diagnóstico eficaz, requiere del análisis seriado de heces, siendo este difícil de cumplir. Existen sustancias, que permiten preservar la morfología de los microorganismos, recolectando varias muestras en un solo vial y facilitando su análisis en una sola oportunidad. Se planteó determinar la prevalencia de protozoarios, cromistas y helmintos intestinales, en muestras de heces preservadas en solución de merthiolate-iodo-formaldehído (MIF), comparar los resultados entre una muestra única (MIF-1) y un seriado con tres muestras (MIF-3), y su utilidad en el examen seriado. A 19 niños entre 3 y 5 años de edad, de un preescolar, se realizó examen directo con lugol, Quensel, Ziehl-Neelsen modificado y hematoxilina férrica, encontrándose que estaban parasitados 84,2% (16/19) de los evaluados en MIF-1 y el 89,5% (17/19) de los evaluados en MIF-3. El parásito predominante fue *Blastocystis* spp. y el protozoo patógeno más frecuente fue *Giardia duodenalis*. Hubo diferencia significativa entre la frecuencia de protozoarios patógenos detectados en MIF-3 respecto a MIF-1. El método de preservación MIF, puede sustituir al examen seriado de muestras frescas sin menoscabar la calidad del diagnóstico parasitológico.

Palabras clave: métodos de preservación de heces; diagnóstico parasitológico; MIF; examen seriado de heces.

Value of merthiolate-iodine-formaldehyde preservation method for the detection of intestinal parasites in serial stool samples

Abstract: Intestinal parasites are a public health problem, being children under 5 years of age the most susceptible. Its effective diagnosis requires serial analysis of stool specimen, which is difficult to comply with. There are media that preserve the morphology of microorganisms therefore collecting several samples in a single vial will enable their analysis in a single opportunity. It was proposed to determine the prevalence of protozoa, chromists and intestinal helminths in stool samples preserved in merthiolate-iodine-formaldehyde solution (MIF), to compare the results between a single sample (MIF-1) and a series with three samples (MIF-3) to find the value of the serial examination in a unique specimen. Stool specimens from 19 children between 3 and 5 years old from a preschool, underwent direct examination with lugol, Quensel, modified Ziehl-Neelsen and iron hematoxylin. Findings were as follows: 84.2% (16/19) of those from the MIF-1 group were parasitized and 89.5% (17/19) of those included in MIF-3. The predominant parasite was *Blastocystis* spp. and the most frequent pathogenic protozoan was *Giardia duodenalis*. There was a significant difference between the frequency of pathogenic protozoa detected in MIF-3 compared to MIF-1. The MIF preservation method can replace the serial examination of fresh samples without impairing the quality of the parasitological diagnosis.

Keywords: stool preservation methods; parasitological diagnosis; MIF; serial stool examination.

* Correspondencia:
E-mail: anaibethnessi@gmail.com

Introducción

La detección de parásitos intestinales en el área asistencial, se realiza generalmente mediante el examen coproparasitológico de una muestra única y sin la aplicación de métodos de concentración, que permitan aumentar la

probabilidad de hallazgo de las diferentes formas evolutivas de los parásitos, a menos que sea solicitado por el médico tratante, por lo tanto, la sensibilidad del diagnóstico es muy baja, especialmente en pacientes con baja carga parasitaria. Es el caso de la giardiasis, enfermedad parasitaria de distribución geográfica cosmopolita causada por *Giardia*

duodenalis, frecuente en los niños, caracterizada por cuadros entéricos agudos y crónicos graves de intensidad variable, puede ocasionar el síndrome de malabsorción con consecuencias en su estado nutricional [1]. Es considerado un protozooario de difícil diagnóstico y tratamiento ineficaz, debido entre otras cosas a lo inespecífico de los síntomas, lo cual ocasiona que haya poca sospecha del mismo como agente causal, por lo cual se realizan otras pruebas al paciente que no permiten evidenciar al protozooario, y por otra parte, cuándo se indican las pruebas apropiadas, se encuentran algunas dificultades para realizar el diagnóstico, debido a la intermitencia en la eliminación de las formas quísticas, recomendándose para ello métodos de concentración. No obstante, el problema aún no ha sido resuelto en forma satisfactoria y algunos autores sugieren que en los casos en donde se sospeche la presencia de eliminación baja o mixta de quistes, se examinen un promedio de cinco muestras o se estudien dos o tres muestras por semana durante un mes, lo cual resulta impráctico e incómodo para el enfermo [1]. Esta situación es similar para otros protozoarios, debido a factores que incluyen variaciones, tanto en la cantidad de las formas de resistencia eliminadas, como en la dificultad de identificación de las formas trofozoíticas, por el deterioro sufrido cuando las muestras no son preservadas y llegan al laboratorio en condiciones inadecuadas para su análisis [2].

Por otra parte, existen circunstancias que limitan el cumplimiento por parte del paciente (de llevar las tres muestras requeridas), entre ellas, las dificultades de coincidencia entre la emisión de la muestra y los horarios de los laboratorios, especialmente en niños, quienes pueden tener hábitos de defecación irregular, así como, la limitación del cumplimiento del horario laboral o escolar y el aumento del costo del examen por el traslado al laboratorio en tres oportunidades distintas.

Con el objeto de solventar estas dificultades y garantizar la realización de un adecuado análisis de la materia fecal, nos propusimos evaluar el análisis de muestras mediante el uso del método de preservación mertiolate-iodo-formaldehído (MIF), el cual permite conservar la muestra de heces para su posterior observación, preservando la morfología de las formas evolutivas de los parásitos y puede ser utilizado como método de concentración [3]. Además, se compararon los resultados obtenidos entre el análisis de una muestra única (MIF-1) y una muestra seriada (MIF-3), a fin de determinar la contribución de esta metodología en el mejoramiento de la detección de parásitos intestinales en niños de edad preescolar.

Materiales y métodos

Población y muestra: El estudio se realizó en niños del colegio Centro de Educación Inicial “Felipa Toro”, ubicado en Cúa, estado Miranda durante los meses de noviembre de 2014 a abril de 2015. De los 140 niños matriculados en la institución, se seleccionó una muestra de 48 niños con edades entre 3 y 5 años, teniendo como criterios de inclusión: ser estudiante del plantel, edad de acuerdo al

grupo etario seleccionado y tener el consentimiento de sus padres, de forma verbal y por escrito, para participar de forma voluntaria en el estudio.

Sensibilización de la comunidad: Previo al estudio se realizó una charla con la finalidad de sensibilizar a los miembros de la comunidad educativa (representantes y maestros), sobre la importancia del tema. Se les suministró el material para la toma de la muestra seriada, la planilla del consentimiento informado y la planilla de recolección de datos. Se les explicaron los riesgos y beneficios de la participación y se enseñó al padre, madre o representante sobre el procedimiento de recolección de la muestra. A cada niño se le tomó una muestra fresca y una muestra seriada denominadas MIF-1 y MIF-3 respectivamente

Procedimiento de recolección de la muestra fresca (MIF-1): A los padres o representantes se les suministró el recolector de heces, en el cual debía colocar la muestra fresca e identificarla adecuadamente.

Procedimiento de recolección de la muestra seriada preservada en MIF-3: Se les entregó a los padres o representantes un tubo que contenía la solución para el método de MIF y se les explicó el procedimiento de preservación de la muestra, consistiendo el mismo en colocar una porción de las heces (el equivalente a un 1 gramo) en el tubo con preservante durante tres días diferentes, identificándolo adecuadamente.

Recepción de la muestra: Se realizó en dos oportunidades, con una semana de diferencia entre ellas. En la primera ocasión se recibió la muestra fresca y en la segunda se recolectaron las muestras seriadas conservadas en los tubos con solución MIF.

Procesamiento de la muestra fresca (MIF-1): Una vez recibidas las muestras frescas se evaluaron sus características fisicoquímicas, se colocaron en la solución MIF y después fueron procesadas. Posteriormente se observaron 6 preparaciones del sedimento entre lámina y laminilla, coloreadas con lugol y Quensel, se les realizó frotis en lámina para la coloración con Zielh-Neelsen modificado [4,5] y sólo las muestras que requerían la realización de la coloración de hematoxilina férrica para la identificación de trofozoitos ameboides, fueron fijadas en líquido de Schaudinn modificado, a partir del sedimento del MIF [6,7].

Procesamiento de la muestra preservada (MIF-3): Tres muestras seriadas fueron preservadas por los representantes en un tubo con solución de MIF. Posteriormente fueron procesadas mediante la observación microscópica de 12 preparaciones (esto para aumentar la probabilidad de hallazgos, ya que esta muestra contiene una mayor cantidad de heces que el MIF-1) coloreadas con lugol, Quensel, y Zielh-Neelsen modificado. A partir del sedimento del

MIF (se fijó con el líquido de Schaudinn modificado) sólo a las muestras que requerían realizar la coloración de hematoxilina férrica para la identificación de trofozoítos ameboides [4-7].

Análisis estadístico: Los datos fueron expresados en valores absolutos y porcentajes. Para la comparación de los datos se aplicó la prueba exacta de Fischer. El análisis de los mismos se realizó con el programa estadístico SPSS 19. Todo valor de p menor de 0,05 fue considerado como significativo.

Componente bioético: Proyecto aprobado por el Comité de Bioética de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela. La recolección de la muestra de heces fresca o preservada y la recolección de los datos clínicos epidemiológicos se realizó después de la recepción del consentimiento informado. Los participantes recibieron de manera escrita los resultados del análisis parasitológico.

Resultados

De los 48 kits entregados a los representantes de los niños sólo 19 (39,6%) cumplieron con el protocolo de entregar las dos muestras (MIF-1 y MIF-3). De las 19 muestras analizadas 9 (47,4%) pertenecían al género femenino y 10 (52,6%) al masculino (Tabla 1). El grupo etario estuvo comprendido entre 3 y 5 años, siendo el de 5 años (63,2%) el más frecuente seguido por el de 4 años (31,6%) y el de tres años (5,2%), (Tabla 2).

Tabla 1. Grupos de estudio por género y significancia estadística, según la presencia de parásitos o comensales.

Grupos de estudio		Género		Total
		Femenino n (%)	Masculino n (%)	
Parasitados MIF-1	Sí	8 (50%)	8 (50%)	16 (84%)
	No	1 (33,3%)	2 (66,7%)	3 (16%)
Parasitados MIF-3	Sí	9 (52,9%)	8 (47,1%)	17 (89,5%)
	No	0 (0%)	2 (52,9%)	2 (10,5%)
p		0,5	0,418	0,330

Leyenda: n= número, %: porcentaje, p : significancia estadística, MIF-1: una muestra de heces, MIF-3: tres muestras de heces.

Del estudio parasitológico se obtuvo un 84% (16/19) de niños parasitados para MIF-1 y 89,5% (17/19) para MIF-3, sin diferencia estadísticamente significativa al compararlos entre sí ($p=0,330$) (Tabla 1 y 2). Tampoco hubo diferencia significativa al comparar el género y la edad (Tabla 1 y 2).

El parásito más frecuente fue *Blastocystis* spp. tanto en el grupo MIF-1 (68,4%; 13/19) como el MIF-3 (63,2%; 12/19) con $p=0,252$, con porcentajes similares (Tabla 3).

Entre los hallazgos de protozoarios comensales en el grupo MIF-1 (52,5%; 10/19) y el MIF-3 (78,9%; 15/19) aun cuando la proporción en MIF-3 fue mayor, no se encontró diferencia significativa ($p=0,091$). Se observó

Tabla 2. Grupos de estudio por edad y significancia estadística, según la presencia de parásitos o comensales.

Grupos de Estudio		Edad (años)			Total
		3 n (%)	4 n (%)	5 n (%)	
Parasitados MIF-1	Sí	0 (0%)	5 (31,3%)	11 (68,7%)	16 (84%)
	No	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	3 (16%)
Parasitados MIF-3	Sí	1 (5,9%)	5 (29,4%)	11 (64,7%)	17 (89,5%)
	No	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	2 (10,5%)
p		0,5	0,286	0,256	0,330

Leyenda: n= número, %: porcentaje, p : significancia estadística. MIF-1: una muestra de heces, MIF-3: tres muestras de heces.

Tabla 3. Frecuencia de *Blastocystis* spp. protozoarios (comensales o parásitos), y helmintos en 19 muestras con MIF-1 y MIF-3.

	MIF-1		MIF-3		p
	n	%	n	%	
<i>Blastocystis</i> spp.	13	68,4	12	63,2	0,252
Protozoarios comensales					
<i>Entamoeba coli</i>	1	5,3	0	0	0,500
<i>Endolimax nana</i>	4	21	5	26,3	0,276
<i>Entamoeba hartmanni</i>	5	26,3	10	52,6	0,069
Total	10	52,6	15	78,9	0,091
Protozoarios patógenos					
<i>Entamoeba histolytica</i> / <i>E. dispar</i>	1	5,3	2	10,6	0,385
<i>Dientamoeba fragilis</i>	3	15,8	5	26,3	0,230
<i>Giardia duodenalis</i>	4	21	8	42,1	0,108
Total	8	42,1	15	79	0,018
Helmintos					
<i>Hymenolepis nana</i>	1	5,3	0	0	0,500
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	5,3	1	5,3	0,513
<i>Trichuris trichiura</i>	0	0	1	5,3	0,500
Total	2	10,6	3	15,9	0,331

Leyenda: n: número, %: porcentaje. MIF-1: una muestra de heces, MIF-3: tres muestras de heces, p : significancia estadística.

similitud entre la proporción de *Entamoeba coli* en MIF-1 (5,3%; 1/19) en comparación a MIF-3 (0,0% 0/19), con $p=0,500$. De igual forma, la frecuencia de *Endolimax nana* en MIF-1 (21,0%; 4/19) fue semejante a la encontrada en MIF-3 (26,3%; 5/19) con $p=0,276$ (Tabla 3). En el caso de *Entamoeba hartmanni* se observó mayor frecuencia de este microorganismo en MIF-3 (52,6%; 10/19) que en MIF-1 (26,3%; 5/19) sin embargo, no fue estadísticamente

significativo ($p=0,069$) (Tabla 3).

En relación con la detección de protozoarios patógenos se observó mayor frecuencia de los mismos en el grupo MIF-3 (79%; 15/19) en comparación con el grupo MIF-1 (42,1%; 8/19), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,018$) (Tabla 3). Esto representa una diferencia de detección de protozoarios patógenos de un 36,8% en el grupo MIF-3 con respecto al grupo MIF-1. La frecuencia de *Entamoeba histolytica/E. dispar* y *Dientamoeba fragilis* en el grupo MIF-1, fueron semejantes a la hallada en el grupo MIF-3 con $p=0,385$ y $p=0,230$, respectivamente (Tabla 3). En cambio, para *Giardia duodenalis* se observó mayor proporción de éste en el grupo MIF-3 (42,1%; 8/19) en comparación con el grupo MIF-1 (21,0%; 4/19) pero no fue estadísticamente significativo ($p=0,108$) (Tabla 3).

Con respecto a los helmintos, no se encontró significancia estadística ($p=0,330$) al comparar el grupo MIF-1 (10,5%; 2/19) con el MIF-3 (15,8%; 3/19), siendo la frecuencia de *Hymenolepis nana* en el grupo MIF-1 (5,3%; 1/19) similar a la del grupo MIF-3 (0,0%; 0/19) con $p=0,500$. En el caso de *Ascaris lumbricoides* la proporción del mismo en el grupo MIF-1 (5,3%; 1/19) y en el MIF-3 (5,3%; 1/19) fue muy parecido con $p=0,513$. De igual modo *Trichuris trichiura*, frecuencia en MIF-1 (0,0%; 0/19) fue similar a la de MIF-3 (5,3%; 1/19) con $p=0,500$ (Tabla 3).

Discusión

Para realizar el diagnóstico parasitológico el CDC [8] (Centers for Disease Control and Prevention) recomienda la evaluación de tres muestras, recogidas en días alternos, para así aumentar la probabilidad de encontrar algún microorganismo causante del cuadro clínico. Con respecto a este tema Hiatt *et al.* [2], corroboraron que la sensibilidad para detectar parásitos disminuye cuando se examina una sola muestra en vez de tres, debido a que se estaría perdiendo del 11 al 31% de los agentes patógenos que pudiesen estar, aunque dicho porcentaje varía según el microorganismo. El mismo comportamiento para protozoarios patógenos se evidenció en nuestro estudio, cuando se realizó la comparación entre el grupo MIF-1 y el MIF-3, con una diferencia del 36,8% estadísticamente significativa, de los agentes patógenos que se dejarían de detectar con solo una evaluación.

Ahora bien, al comparar la presencia de *Entamoeba histolytica/E. dispar*, *Giardia duodenalis* y *Entamoeba hartmanni* entre los grupos MIF-1 y MIF-3 (aun cuando la diferencia no fue estadísticamente significativa), se apreció un aumento sustancial del microorganismo empleando una muestra seriada, ocurriendo de forma semejante en *Entamoeba hartmanni* y *Giardia duodenalis*, concordando con Hiatt *et al.* [2], lo que indica la eficacia del método para detectar microorganismos patógenos de difícil diagnóstico, como es el caso de *Giardia duodenalis*.

En el caso del cromista, *Blastocystis* spp., se observa poca variabilidad entre las frecuencias halladas en los grupos MIF-1 y MIF-3. Fue detectado con mayor frecuencia siendo

superior a otras cifras publicadas en Venezuela y el mundo [5-12]. Pero mostrando coincidencia en el hecho de ser el microorganismo con mayor frecuencia en los infantes de edad preescolar [13].

Como segundo agente patógeno más frecuente en el estudio se ubicó *Giardia duodenalis*. Este hecho es similar a lo descrito por Devera *et al.* [14], no obstante es mayor a lo registrado por Izzeddin e Hincapié [12] y Devera *et al.* [15], lo cual puede ser debido a diferencias metodológicas. Pero tal vez lo más relevante, sea el hecho de que resultó ser el protozoario patógeno más frecuente en nuestro estudio y coincide con lo reportado a nivel mundial en este grupo etario [1]; por otra parte, coincide con lo planteado por otros autores quienes demuestran que el estudio de tres muestras seriadas proporciona un aumento considerable de las posibilidades de detección del protozoario [1,2].

Entre los protozoarios patógenos poco frecuentes se encontró *Dientamoeba fragilis* siendo su prevalencia mayor a lo reportado por Calchi *et al.* [11], Izzeddin e Hincapié [12] y menor a lo reportado por Osman *et al.* [16]. Es importante resaltar que para la detección de dicho microorganismo es necesario realizar técnicas específicas como cultivo y coloraciones permanentes [7,17] las cuales no se llevan a cabo de manera rutinaria en los laboratorios, por lo que se subestima la presencia del protozoario en la población. En este trabajo, los sedimentos donde se observaron estructuras ameboides sospechosas de ser *D. fragilis*, se fijaron posteriormente con líquido de Schaudinn modificado y fueron coloreados con hematoxilina férrica, lográndose identificar este parásito en la coloración. Esto constituye un aporte interesante en este trabajo, debido a la innovación de fijar el sedimento a partir del MIF en el líquido de Schaudinn modificado y obteniendo resultados satisfactorios con la coloración de hematoxilina férrica.

La frecuencia de *Entamoeba histolytica/E. dispar* fue alta en comparación con los resultados arrojados por Calchi *et al.* [11] y según los datos del anuario de morbilidad del Ministerio del Poder Popular para la Salud [18] en 2016, reportada como tercera causa de morbilidad según síndrome gastrointestinal.

En lo que se refiere a los protozoarios comensales, se halló mayor proporción de éstos en el grupo MIF-3 que en el MIF-1 sin ser significativo, quizás esto se deba al tamaño de la muestra con la que se llevó a cabo la investigación; sin embargo, este resultado tiene gran significado epidemiológico debido a que es indicativo de contaminación fecal en aguas o alimentos, ya que estos protozoarios se adquieren por fecalismo [10-12]. Entre estos destaca la alta prevalencia de *Entamoeba hartmanni*, seguido por *Endolimax nana* y *Entamoeba coli*, lo cual difiere con otros estudios donde la frecuencia fue mayor para *E. coli* y *Endolimax nana* [13].

Es importante señalar que la semejanza morfológica entre *Entamoeba hartmanni* y *Entamoeba histolytica*, puede ser una causa de error al momento de realizar el examen directo, provocando sobreestimación de los casos de amibiasis, además de hacer un diagnóstico errado, puesto que tienen

diferentes significados clínicos, siendo *E. hartmanni* un protozooario comensal y su presencia indica fecalismo; en cambio, *E. histolytica* por ser un protozooario patógeno genera graves consecuencias en la salud del individuo que la padece. Por lo antes indicado, es de vital significancia el empleo de la micrometría para el diagnóstico de parásitos intestinales, ya que el tamaño de las formas parasitarias es la característica fundamental que los diferencia.

Cabe señalar que en la presente investigación no se detectó *Cryptosporidium* spp. ni *Cyclospora cayetanensis*, hecho que difiere de lo encontrado por Devera *et al.* [15] en niños menores de 5 años (8 casos de criptosporidiosis y 4 de ciclosporiosis.), Tedesco *et al.* [9] (19 casos), Nastasi [19] (14 casos) y Lucero-Garzón *et al.* [20] (14 casos con *Cryptosporidium* spp.; 16 con *Cystoisospora belli* (*Isospora belli*) y 8 con *Cyclospora cayetanensis*). No obstante, coincide con las bajas prevalencias reportadas a escala mundial por otros autores [21].

Con respecto a los helmintos, se obtuvo baja frecuencia, en comparación con el estudio realizado por Hagel *et al.* [22] donde se reportó una mayor incidencia de *A. lumbricoides* y *T. trichiura* en las áreas rurales, además encontraron que la carga parasitaria de *A. lumbricoides* fue significativamente mayor en los niños con deficiencias antropométricas. Por otro lado, hay autores que explican la baja incidencia de helmintos por las campañas masivas con antiparasitarios, así como, el uso indiscriminado de los mismos [19-23]. Este aspecto no fue tomado en cuenta para la investigación.

En conclusión, los niños del Centro de Educación Inicial “Felipa Toro” presentan una alta prevalencia de parasitosis intestinales, con predominio de *Blastocystis* spp., seguido de *Giardia duodenalis*, *Dientamoeba fragilis* y *Entamoeba histolytica/E. dispar*. Además, se demostró que el empleo de 3 muestras seriadas conservadas en MIF aumenta la probabilidad de hallazgo de protozoarios patógenos en un 36,8%, en comparación con una muestra única y por otro lado es posible emplear una muestra preservada en MIF para realizar luego métodos de coloración confirmatorios como hematoxilina férrica y Ziehl-Neelsen modificado. Con estos resultados se recomienda llevar a cabo campañas informativas sobre las parasitosis intestinales y la forma de prevenir su adquisición, así como realizar estudios microbiológicos al agua de consumo humano para de esta manera, determinar la calidad de la misma. También es indispensable impulsar estudios de prevalencia de las parasitosis en las comunidades para conocer el estado de salud de la población y en el futuro construir mapas epidemiológicos. Por último, se exhorta a utilizar el método de MIF para la realización del examen seriado, preservando tres muestras de heces de días distintos en un mismo vial, con la finalidad de aumentar la sensibilidad del diagnóstico coproparasitológico, especialmente en pacientes con bajas cargas parasitarias, lo cual tiene beneficios prácticos adicionales para el paciente, ya que permite la recolección de la muestra a cualquier hora del día y disminuye los costos del traslado al laboratorio.

Agradecimientos

A la Dirección, comunidad educativa y al comité de salud y alimentación del preescolar “Felipa Toro”, ubicado en Cúa, estado Bolivariano de Miranda, así como a los miembros del Consejo Comunal “Salamanca somos todos”. Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Amibiasis, Cátedra de Parasitología de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela con los recursos institucionales y financiamiento propio.

Referencias

- Vázquez O, Campos T. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. Revista del Centro de Inv. 2009; 8:75-90. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.lasalle.mx/index.php/recein/article/view/183>. Acceso 10 de febrero 2020.
- Hiatt R, Markell E, NGE. How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa? Am J Trop Med Hyg. 1995; 53:36-9. Doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1995.53.36>
- Aldeen WE, Whisenant J, Hale D, Matsen J, Carroll K. Comparison of pooled formalin-preserved fecal specimens with three individual samples for detection of intestinal parasites. J Clin Microbiol. 1993; 31:144-5. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/31/1/144.long>. Acceso 12 de febrero 2020.
- Melvin D, Brooke M. Métodos de Laboratorio para el diagnóstico de parásitos intestinales. México: Editorial Interamericana; 1971.
- Henriksen SA, Pohlenz JFL. Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. Acta Vet Scand. 1981; 22:594-6.
- Horen WP. Modification of Shaudinn fixative. J Clin Microbiol. 1981; 13:204-5. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/jcm/13/1/204.full.pdf>. Acceso 10 de febrero 2020.
- Pérez E, Pérez M, Guzmán C, Galindo M, Wagner C, Dorta A, Nessi A, *et al.* Guía de trabajos de laboratorio asignatura parasitología I Caracas: Ediciones de la Cátedra de Parasitología, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Escuela de Bioanálisis; 2008.
- Center for Disease Control and Prevention. CDC. Diagnosis of Parasitic Diseases, 2014. Disponible en: https://www.cdc.gov/parasites/references_resources/diagnosis.html. Acceso 15 de febrero 2020.
- Tedesco R, Camacaro Y, Morales G, Amaya I, Blanco Y, Devera R. Parásitos intestinales en niños de hogares de cuidado diario comunitarios de Ciudad Bolívar, estado Bolívar, Venezuela. Saber. 2012; 24: 142-50. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4277/427739448004.pdf>. Acceso 15 de febrero 2020.
- Devera R, Cermeño J, Blanco Y, Bello M, Guerra X, De Sousa M, *et al.* Prevalencia de *Blastocystis* y otras parasitosis intestinales en una comunidad

- rural del Estado Anzoátegui, Venezuela. Parasitol Latinoamerican. 2003; 58:95-100. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122003000300001. Acceso 15 de febrero 2020.
11. Calchi M, Rivero Z, Bracho A, Villalobos R, Acuero E, Maldonado A, et al. Prevalencia de *Blastocystis* sp. y otros protozoarios comensales en individuos de Santo Rosa de Agua, Maracaibo, estado Zulia. Rev Soc Ven Microbiol. 2013; 33: 66-71. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562013000100013. Acceso 17 de febrero de 2020.
 12. Izzeddin N, Hincapié L. Frecuencia de parasitosis intestinal y su relación con las condiciones socio-sanitarias en niños con edades comprendidas entre 1 y 7 años del sector La Pocaterra. Rev Venezol Salud Pública. 2015; 3: 9-14. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6570478>. Acceso 15 de febrero 2020.
 13. Bracho A, Rivero Z, Rios M, Atencio R, Villalobos R, Rodríguez L. Parasitosis intestinales en niños y adolescentes de la etnia Yukpa de Toronto, estado Zulia, Venezuela. Comparaciones de los años 2002 y 2012. Kasmera. 2014; 42: 41-51. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-2222014000100005. Acceso 15 de febrero 2020.
 14. Devera R, Blanco Y, Amaya I, Requena I, Tedesco RM, Alevante C, et al. Prevalencia de *Giardia intestinalis* en habitantes del Barrio La Macarena, Ciudad Bolívar, Venezuela. Gen. 2012; 66:243-9. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-35032012000400006. Acceso 15 de febrero 2020.
 15. Devera R, Ortega N, Marlin S. Parásitos intestinales en la población del Instituto Nacional del Menor, Ciudad Bolívar, Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol. 2007; 27: 38-44. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562007000100008. Acceso 20 de febrero 2020.
 16. Osman M, El Safadi D, Cian A, Benamrouz S, Nourrisson C, Poirier P, et al. Prevalence and risk factors for intestinal protozoan infections with *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* and *Dientamoeba* among schoolchildren in Tripoli, Lebanon. PLoS Negl Trop Dis. 2016; 10:e0004496. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004496>.
 17. Guzmán C, Nessi A, Pérez M, Galindo M, Wagner C, Dorta A, et al. Manifestaciones clínicas y diagnóstico parasitológico de la infección intestinal causada por *Dientamoeba fragilis*. Gen. 2008; 62: 217-22. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-35032008000300013. Acceso 15 de febrero 2020.
 18. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Boletín epidemiológico semana 52. 2016 Disponible en: <https://www.ovsalud.org/descargas/publicaciones/documentos-oficiales/Boletin-Epidemiologico-2016.pdf>. Acceso 15 de febrero 2020.
 19. Nastasi J. Prevalencia de parasitosis intestinales en unidades educativas de Ciudad Bolívar, Venezuela. Rev Cuidarte. 2015; 6:1077-84. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cuid/v6n2/v6n2a08.pdf>. Acceso 12 de febrero 2020.
 20. Lucero T, Álvarez L, Chicue J, López D, Mendoza C. Parasitosis intestinal y factores de riesgo en niños de los asentamientos subnormales, Florencia-Caquetá, Colombia. Rev Facultad Nacional Salud Pública. 2015; 33: 171-180. Doi: <http://dx.doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v33n2a04>
 21. Reh L, Muadica A, Köster P, Balasegaram S, Verlander N, Chércoles E, et al. Substantial prevalence of enteroparasites *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. in asymptomatic school children in Madrid, Spain, November 2017 to June 2018. Euro Surveill. 2019; 24:1900241 Doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.43.1900241>
 22. Hagel I, Salgado A, Rodríguez O, Ortiz D, Hurtado M, Puccio F, et al. Factores que influyen en la prevalencia e intensidad de las parasitosis intestinales en Venezuela. Gaceta Médica Caracas. 2001; 109: 82-90.
 23. Tedesco R, Blanco Y, Devera R. Baja frecuencia de geohelminths en cuatro comunidades rurales del municipio Heres, estado Bolívar, Venezuela. Saber. 2012; 24:151-9. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=427739448005>. Acceso 12 de febrero 2020.