



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
Facultad de Medicina

**TRABAJO ACADÉMICO PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE ESPECIALISTA EN
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA.**

**Prevalencia de *Lophomonas* sp. en pacientes de un
hospital general referencial del Callao, Perú.**

AUTOR:

EFRAIN ENRIQUE HUARAC

LIMA - PERU

2020

ASESORA:

Dra. Maritza M. Calderón Sánchez.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO:

Este trabajo será autofinanciado.

DECLARACIÓN DEL AUTOR:

El presente Proyecto de Investigación es de grado original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el de la presente segunda especialidad.

Tabla de contenido

4	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Generalidades:	1
1.2	Morfología de <i>Lophomonas</i> sp.:	1
1.3	Mecanismo de transmisión:	2
1.4	Patogénesis:.....	3
1.5	Sintomatología asociada:	4
1.6	Diagnóstico:.....	4
1.7	Tratamiento y prevención:	6
1.8	Antecedentes:.....	6
1.9.	Justificación:	9
1.10	Hipótesis:.....	10
2	OBJETIVOS:.....	11
2.1	Objetivo general:	11
2.2	Objetivos específicos:.....	11
3	MATERIAL Y METODOS:.....	12
3.1	Diseño del estudio:	12
3.2	Población:.....	12
3.3	Muestra:	12
3.4	Definición operacional de variables:	15
3.5	Procedimientos y técnicas:	16
3.5.1	Montaje húmedo:.....	16
3.5.2	Coloración Hematoxilina & Eosina:.....	17
3.5.3	Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR):.....	19
3.6	Aspectos éticos del estudio:	21
3.7	Plan de análisis:	22
4	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	23
5	PRESUPUESTO Y CRONOGRAMA:.....	26
5.1	Presupuesto:	26
5.2	Cronograma:	27
6	ANEXOS	

RESUMEN:

Lophomonas sp. es un protozooario endocomensal que presenta estadio de quiste y trofozoíto. Su estadio de quiste en excretas de cucarachas estaría asociado con los reportes de casos en humanos, los cuales se han incrementado desde su primer hallazgo en China en el año 1992. El predominio de casos en inmunosuprimidos sugiere tratarse de una parasitosis accidental oportunista, sin embargo, existen algunos reportes en inmunocompetentes; por ende, no hay estudios concluyentes al respecto. El objetivo del estudio es determinar la prevalencia de *Lophomonas* sp. en pacientes de un hospital general del Callao – Perú; El estudio será de tipo observacional, descriptivo, de corte transversal. Se trabajarán muestras de aspirado bronquial de pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos. A cada muestra se le realizarán exámenes directos en fresco y coloración, los cuales serán confirmados por prueba molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los datos de cada muestra se recopilarán en una ficha de recolección de datos por cada paciente que cumplan los criterios de inclusión y este será la fuente de información para el análisis estadístico.

Palabras claves: *Lophomonas* sp, estado inmunológico, muestra respiratoria, PCR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades:

Lophomonas sp. es un protozooario multiflagelado anaeróbico poco conocido en la clínica humana. Ha sido encontrado (Descrito por primera vez en 1860 por Stein) como endocomensal (simbionte) en el intestino distal de cucarachas y termitas (*Blatta orientalis*, *Blattella germánica* y *Periplaneta americana*), estos pueden actuar como vectores en ambientes donde conviven con humanos. A nivel mundial han estado vinculados a afecciones respiratorias.

Taxonómicamente *Lophomonas spp.* pertenece al reino Protozoa, subreino Eozoa, infrareino Excavata, phylum Metamonada, subphylum Trichozoa, superclase Parabasalia, clase Trichonymphea (antes Trichomonadae) orden Lophomonadida, familia Lophomonadidae, género *Lophomonas* ^[1].

Actualmente se conocen dos especies: *L. blattarum* y *L. striata*. La especie tipo y primera en ser descrita fue *L. blattarum* en 1860 en cucarachas omnívoras comunes (*Blatta orientalis*) y posteriormente *L. striata* fue descrita en 1878 ^[2]. Ambos tienen una alimentación de tipo holozoica, carecen de citostoma y se reproducen asexualmente por fisión binaria o múltiple ^[3].

1.2 Morfología de *Lophomonas sp.*:

Presenta dos estadios:

Trofozoíto, tiene forma ovalada o piriforme cuyo extremo anterior es más redondeado que el posterior (en *L. striata* es más delgado). Presenta flagelos cuyos movimientos

son asincrónicos. El tamaño en *L. striata* es de 30-40 um de largo por 8-15um de ancho [2] y *L. blattarum* está comprendido entre 20-60 um de largo por 12-20 um de ancho [4]. Ultraestructuralmente, se ha observado que en su extremo apical interno presenta un compartimiento llamado Calix, cuya forma parece la de una copa, de cuyo extremo nace un mechón de flagelos, aproximadamente 50; asimismo, dentro de él se encuentra su único núcleo, el cual generalmente permanece en posición centro-apical y no siempre es visible a la microscopía de luz debido a que el citoplasma suele ser muy vacuolado. Internamente presenta un filamento axial que une el cáliz con el extremo terminal posterior y numerosos túbulos perinucleares llamados cuerpos parabasales distribuidos radial y paralelamente rodeando al cáliz a nivel del núcleo (Figura 1) [5]. Adicionalmente, *L. striata* presenta sus características “estrías” en su superficie, inicialmente se pensaba que eran estructuras propias, pero la microscopía electrónica concluyó que se tratan de estructuras externas bacilares compatibles con bacterias, en una asociación simbiótica (Figura 2) [6].

El quiste, es de forma redonda y está cubierta por una membrana homogénea. En *L. striata* el interior del quiste mantiene las estructuras filamentosas tipo agujas (Figura 2) [6,7].

1.3 Mecanismo de transmisión:

En base al hallazgo de estadios de trofozoítos en humanos, el mecanismo de transmisión estaría dado de la siguiente manera: *Lophomonas* sp. simbioses de cucarachas o termitas, son excretadas por el conducto intestinal, éstas al salir a un ambiente adverso se enquistan. Las excretas contaminan superficies y también tienen

la capacidad de contaminar el aire en forma de polvo conteniendo los quistes parásitos y diseminarse por los ambientes. El aire contaminado puede ser inhalado por un hospedero humano pudiendo desarrollar patología respiratoria si el desenquistamiento y posterior proliferación ocurriese ^[4].

1.4 Patogénesis:

Existen dos mecanismos que explicarían el daño tisular del epitelio respiratorio, causado por *Lophomonas* sp. Un mecanismo mecánico por el cual *Lophomonas* sp. dañaría el epitelio mucoso, conllevando a una descamación y denudación epitelial, con lo cual el tejido se expone a mayor daño por la subsecuente reactividad celular y molecular. Otro mecanismo sería el molecular, donde la producción de proteasas por *Lophomonas* sp. activaría los Receptores Activados por Proteasa (PARs: Protease – Activated Receptors) presentes en la superficie del epitelio respiratorio, causando una respuesta inflamatoria mediada por interleucinas ^[8].

Los reportes de Lophomoniasis han estado vinculados a pacientes con otros factores de fondo o subyacentes, en quienes agravó o complicó su estado clínico, tales como: sinusitis ^[9], asma ^[10], Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) ^[11] con hasta 29.4% de casos ^[12] y en coinfecciones con Tuberculosis pulmonar ^[13,14] y Pertusis ^[15]. Así como ocurren con otros protozoarios, un gran grupo de casos de lophomoniasis han sido detectados en pacientes con factores de inmunosupresión ^[16,17,18], tales como: VIH/SIDA ^[17], diabetes mellitus ^[18,19], neoplasias y quimioterapia inmunosupresora ^[19], post trasplantes de órganos ^[20,21,22] con hasta 30.9% ^[12]. No obstante, en los últimos años, algunos casos en pacientes inmunocompetentes han sido reportados en Ecuador,

India y China, sin embargo, en este último se trataba de un adulto mayor de 70 años [23,24,11].

Además de *Lophomonas* sp. y otros agentes que afectan las vías respiratorias bajas, el coronavirus tipo 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS CoV-2), causante de la enfermedad por coronavirus del 2019 (COVID-19), también está asociado con factores de riesgo donde la inmunidad del paciente se encuentra comprometida [25]. No existen reportes que mencionen comorbilidad entre Lophomoniasis y COVID-19, pero tampoco se han hecho estudios al respecto, probablemente por ser un agente infeccioso nuevo en humanos.

1.5 Sintomatología asociada:

Se menciona la fiebre, tos, expectoración purulenta, dificultad respiratoria, acompañado de eosinofilia hemática [4,26] en algunos casos de hasta 57% [24], neumotórax con infiltración no específica en lóbulo inferior de pulmón a los rayos X [18,21,26].

Un aumento muy marcado de eosinófilos y monocitos en la secreción respiratoria ha podido ser evidenciado cuando protozoos flagelados han sido detectados [8,24].

1.6 Diagnóstico:

Para el diagnóstico microbiológico en muestras respiratorias se han usado desde muestras sencillas como esputo, hasta muestras invasivas como lavados y aspirados bronquiales, pudiendo ser hallados en todos los tipos de muestra. Para su identificación se han descrito métodos directos en fresco usando montaje húmedo, el cual lleva la ventaja de evidenciar la movilidad [27]. Asimismo, la coloración por diversas técnicas

(Tricrómica, Hematoxilina&Eosina, etc) de muestras previamente fijadas ^[4]. Con estas técnicas, muchos investigadores mencionan que los trofozoítos en muestras respiratorias podrían ser confundidos con células cilíndricas ciliadas propias del epitelio bronquial ^[28]; sin embargo, existe un conjunto de criterios citomorfológicos, los cuales establecen diferencias citológicas claras en tamaño, forma, citoplasma, núcleo y flagelo/cilio (Tabla 1) ^[29].

La microscopía electrónica de transmisión (MET) solo ha sido aplicada con fines de investigación de la ultra estructura de este protozooario (descritos anteriormente) a partir del contenido digestivo de cucarachas ^[5,6]. Sin embargo, la microscopía electrónica de barrido (MEB) ha sido usada en un estudio humano de lavado bronco alveolar ^[30]. Su alto costo de implementación y proceso, es una gran limitante en la rutina hospitalaria. Existe referencias antiguas de crecimiento en medio de cultivo a partir de muestras de contenido digestivo de cucarachas ^[31], sin embargo, no hay estudios que lo hayan reproducido y que demuestre su eficacia y especificidad, la dificultad de aislamiento sería a la gran diversidad de microorganismos que co-habitan en dicho insecto. Así tampoco hay estudios actuales de cultivo a partir de muestras humanas.

El uso de técnicas moleculares solo había sido usado para establecer la posición filogenética y taxonómica, la cual se mencionó al inicio ^[1,2]; sin embargo, dada las controversias suscitadas por la subjetividad de las técnicas que usan microscopía de luz, los investigadores clínicos recomendaron la necesidad de implementar técnicas moleculares de diagnóstico a partir de muestras humanas. Durante el estudio y confirmación de un caso en Irán, se iniciaron investigaciones para diseñar “Primers”

específicos de género *Lophomonas* sp. a partir de la subunidad menor del ARNr por PCR ^[32].

1.7 Tratamiento y prevención:

Metronidazol y Tinidazol han sido mencionados por los autores de diversas publicaciones como la terapia acertada en infecciones respiratorias, ante la presencia de *Lophomonas* sp. y fracaso a la terapia empírica convencional con antibióticos, por un periodo de 7 días de tratamiento ^[16].

Por otro lado, Ivermectina, conocido antiparasitario antihelminfos, muy usado durante los primeros meses de la epidemia por COVID-19 como tratamiento preventivo y en enfermedad leve, no tiene estudios que demuestren efectividad contra *Lophomonas* sp., sin embargo, hay estudios en modelos animales que reportan efectividad sobre algunos protozoarios como *Giardia* sp. y *Cryptosporidium* sp. ^[33], por lo que debe considerarse cierto potencial.

La prevención de esta parasitosis pasa por conocer el ciclo y vías de infección, por lo cual, controlar las fuentes de infección (cucarachas y/o termitas) es el principal bastión.

1.8 Antecedentes:

El primer reporte de *Lophomonas* sp. en humanos fue hecho en China en 1992, observado a partir de muestras respiratorias. Desde entonces hasta el 2013 el reporte de casos en China ha llegado a 136, cuya distribución por sexo (80 varones, 55 mujeres y 1 de sexo no informado) no tuvo diferencias significativas y cuyas edades fluctuaron entre 9 días hasta 95 años. Los reportes al sur de china (clima cálido y muy húmedo)

representaron el 76.5%, siendo un porcentaje significativo que muestra que hay relación con el clima más cálido y húmedo del sur de china con respecto del norte ^[12].

A nivel mundial, muchos otros países también han sumado casos, publicando sus primeros reportes en humanos: España 2007 ^[8], Turquía 2014 ^[18], Irán 2015^[9], India 2015 ^[14], Egipto ^[29], México 2017^[20], Ecuador 2019 ^[23], Argentina 2012 ^[34], Chile 2014 ^[35] y Perú 2002 ^[27].

Antecedentes de estudios en Perú en muestras humanas, posterior al primer reporte se mencionan a continuación:

El 2010 un estudio realizado en el Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN) recolectó 817 muestras (794 aspirados endotraqueales y 23 lavados bronco alveolares) durante 6 meses y usando el montaje húmedo como metodología, reportó preliminarmente la detección total del 7.3% (6/817), con 0.3% (2/794) de los aspirados endotraqueales y 17.4% (4/23) de los lavados bronquioalveolares ^[36].

Otro estudio, también realizado en el INSN, muestreó por más de un año (enero 2012 a marzo 2013), secreciones de tracto respiratorio para evaluar la presencia de *Lophomonas* sp. en niños con neumonía y niños con diagnóstico clínico de Pertusis. De un total de 558 muestras, 471 fueron aspirado traqueal, 40 de lavado bronqueo alveolar y 47 de aspirados nasofaríngeos. Se tuvo hallazgo positivo en 17/558 (3.04%), de estos 6/17 positivos tuvieron coinfección con Pertusis ^[15].

El 2017 otro estudio similar al del 2010 realizado en el mismo INSN que es un hospital pediátrico que además incluyó al esputo, lavado nasofaríngeo y aspirado bronquial. Se usó además del montaje húmedo, la coloración Giemsa. Este estudio capto un total de 96 muestras, entre ellos 10 adolescentes. Se detectó *Lophomonas* sp. en 12/96 (12.5%)

muestras, 8 en varones y 4 en mujeres, el servicio con mayor detección fue UCI, Infectología y UPO con 4,3 y 2 casos respectivamente. El tipo de muestra donde mayormente hubo detección fue el aspirado traqueal con 8/12 (66.6%), cabe mencionar que no hubo detección en ningún Lavado broncoalveolar 0/12 (0%), lo cual resulta diferente al estudio del 2010 ^[37].

Algunos hallazgos más han sido documentados con fines visuales en el INSN - Lima 2016 ^[38] y en el Hospital Regional de Lambayeque en Chiclayo-Perú 2017 ^[39].

A nivel mundial, los casos han estado basados en examen directo y por coloración. Es recién en 2019 que se encuentra el primer reporte de uso de la herramienta molecular aplicada al diagnóstico, directamente de muestra respiratoria del paciente, donde el hallazgo en fresco de *Lophomonas* sp es corroborado con la aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ^[32]. Para esta técnica se diseñó un par de sondas nucleotídicas o “primers” usando el programa de alineamiento múltiple de secuencias ClustalW y como base de datos al GenBank; estos “primers” permiten la amplificación de un segmento específico, de 214 pares de bases, de la Subunidad Menor del Ácido Ribonucleico Ribosomal (SSU ARNr) de las 2 especies de *Lophomonas* (*L. blattarum* y *L. striata*). Esta técnica permite una detección mucho más objetiva que los métodos dependientes de microscopia de luz. La PCR, es una técnica que muchos investigadores anteriores esperaban que se implementase en la investigación de muestras respiratorias humanas.

1.9 Justificación:

Si bien los reportes de casos documentados en humanos están, casi en su totalidad, vinculados a personas con factores de inmunosupresión, existen algunos casos en inmunocompetentes. No existen, estudios documentados que hayan sido realizados en inmunosuprimidos comparados con pacientes no inmunosuprimidos que asocien, con mayor contundencia, una relación significativa con las patologías respiratorias causadas por *Lophomonas* sp. en pacientes inmunosuprimidos. Esto sumado a la relativa credibilidad debido a la subjetividad de los exámenes directos (montaje húmedo) y de técnicas de coloración, así como los escasos estudios (sobre todo en los países sudamericanos) generan un bajo impacto en los clínicos, manteniendo a esta parasitosis subconsiderada y subvalorada como diagnóstico diferencial en patologías respiratorias por la comunidad médica.

La Lophomoniasis en población vulnerable inmunológica y orgánicamente, hace que los pacientes hospitalizados eleven su riesgo de morbimortalidad respiratoria, empeorando muchas veces su condición y su ya menguada calidad de vida. La valoración y consideración clínica en el diagnóstico diferencial para esta parasitosis con una pronta detección de la misma, ayudará directa y oportunamente en la mejoría de la condición del paciente y/o a disminuir su estancia intrahospitalaria, evitando además el riesgo inherente a dicho ambiente, como las infecciones secundarias intrahospitalarias por agentes multidrogoresistentes.

Es por ello, que, siendo esta parasitosis muy ubicua, dado que su vector (cucaracha) es cosmopolita, y de fácil transmisión (micropartículas aéreas), es importante y necesario estudios consistentes y factibles para la comunidad médica, que impacten en la

verdadera situación nosocomial de este parasito entre pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos. Esto es pieza clave para dilucidar su real dimensión, por ende, su importancia y valoración.

Asimismo, es importante esclarecer objetivamente el escepticismo que, para algunos investigadores, aún impera en los exámenes directos; por lo cual, es necesaria la aplicación de técnicas menos subjetivas, más específicas y más sensibles para su demostración. Esto con el fin de incentivar y promover en el ámbito médico la búsqueda de *Lophomonas* sp. en el diagnóstico diferencial de patologías respiratorias persistentes o con mala evolución, para ser tratadas correcta y oportunamente.

1.10 Hipótesis:

La prevalencia de *Lophomonas* sp. en pacientes inmunosuprimidos es significativamente mayor que en pacientes con estado inmunológico competente.

2 OBJETIVOS:

2.1 Objetivo general:

Determinar la prevalencia de *Lophomonas* sp. en pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos en un hospital general referencial del Callao, de enero 2021 a junio 2021.

2.2 Objetivos específicos:

- Detectar la presencia de *Lophomonas* sp. en diferentes servicios de atención de un hospital general referencial del Callao, de enero 2021 a junio 2021.
- Estandarizar la prueba molecular PCR para la detección de *Lophomonas* sp. en muestras de aspirado bronquial, de un hospital general referencial del Callao, de enero 2021 a junio 2021.
- Comparar los resultados positivos obtenidos por montaje húmedo y/o por coloración con el método molecular, empleados para la detección de *Lophomonas* sp. en aspirado bronquial, de un hospital general referencial del Callao, de enero 2021 a junio 2021.
- Determinar el porcentaje de las comorbilidades presentes en pacientes positivos a *Lophomonas* sp., de un hospital general referencial del Callao, de enero 2021 a junio 2021.

3 MATERIAL Y METODOS:

3.1 Diseño del estudio:

Estudio de tipo observacional, descriptivo de corte transversal.

3.2 Población:

Pacientes de un hospital general referencial del Callao, muestreados de enero 2021 a junio 2021.

3.3 Muestra:

Secreción respiratoria obtenida por aspiración (Aspirado bronquial) de un hospital general referencial del Callao, de enero 2021 a junio 2021.

En el presente estudio se analizarán muestras de secreción respiratoria recibidas en el Laboratorio de Microbiología de un hospital del Callao -Perú, que cuenten con los criterios de inclusión y exclusión; recolectadas durante los meses de enero a junio del 2021.

Serán aplicados los siguientes criterios de inclusión:

- Muestras de aspirado bronquial de pacientes que cursen con un proceso respiratorio de vías inferiores.
- Muestras de pacientes ambulatorios y hospitalizados, obtenidas en el hospital designado al estudio.
- Muestras con menos de 1 hora de haber sido colectadas.

Por otro lado, serán criterios de exclusión los siguientes:

- Muestras de tracto respiratorio que no hayan sido obtenidas por “aspiración bronquial”.
- Muestras de aspirado bronquial obtenidas en otras instituciones de la red (referidos).
- Muestras que no tengan adjunta la solicitud de análisis del servicio de microbiología.
- Muestras que no hayan sido debidamente identificadas.
- Muestras que evidencian deterioro o desecación.
- Muestras de pacientes que están llevando tratamiento con metronidazol o imidazoles.
- Muestras de pacientes que están llevando tratamiento con ivermectina.

Considerando que el número promedio de muestras mensuales que se reciben y que cumplan los criterios sea 20, se estima que se trabajará con un total de 120 muestras.

El tamaño muestral se ha calculado en base a variables de desenlace cualitativa, en una población indefinida y para una prevalencia de 8% de infección por *Lophomonas* sp., esto con un IC95% y una precisión del 95%. Obteniéndose así un tamaño muestral de 114 individuos.

$$n = \left(\frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{E^2} \right) = \frac{(1.96)^2 (0.08)(0.92)}{(0.05)^2} = 114$$

n: Tamaño muestral.

Z = Factor de distribución para un nivel de confianza 95% = 1.96

p = Prevalencia esperada de la población = 0.08

q = 1-p = 0.92

E = Error = 0.05

3.4 Definición operacional de variables:

PREVALENCIA DE <i>Lophomonas</i> spp. EN PACIENTES DE UN HOSPITAL GENERAL REFERENCIAL DEL CALLAO – PERU					
Variable	Definición Operacional	Valores posibles	Criterios de medición	Tipo de variable	Fuente
Presencia de <i>Lophomonas</i> sp	Observación de la presencia de <i>Lophomonas blattarum</i> , mediante <i>microscopía (directo y tinción)</i> y <i>PCR</i> .	Positivo/Negativo.	Catagórica dicotómica nominal	Principal/Deseñace Dependiente	Resultado del examen microbiológico y molecular de las secreciones respiratorias colocado en ficha de datos
Estado inmunológico	Situación fisiológica del sistema de defensa del organismo	Inmunocompetente o inmunosuprimido	Catagórica dicotómica nominal	Independiente	Historia clínica
Servicio de procedencia	Área de prestación de salud diagnóstica y/o recuperativa	Unidad crítica. Hospitalización. Consultorio.	Catagórica, politómica Nominal	Independiente	Historia clínica
Datos demográficos	Información sobre la estructura y/o dinámica de la población.	Grupo étnico. Sexo. Ciudad de residencia.	Catagórica, politómica Nominal	Independiente	Historia clínica
Co-morbilidad	Trastornos o enfermedades adicionales o de fondo.	Diabetes. Infección por HIV. Tuberculosis. Neoplasia. Asma. Pertusis. Sinusitis. COVID-19 Otros (especificar).	Catagórica. Politómica. Nominal.	Independiente	Historia clínica

3.5 Procedimientos y técnicas:

Previo a la obtención de las muestras se presentará una carta a la dirección correspondiente del Hospital para solicitar el permiso del uso de las muestras para el presente proyecto. Asimismo, se adjuntará el protocolo detallado de investigación y la aprobación del comité de ética del proyecto.

Las muestras correctamente identificadas y las fichas de recolección de datos, serán recepcionadas en el área correspondiente del laboratorio e inmediatamente codificadas en el frasco y ficha de recolección de datos. Se juntarán los frascos en refrigeración (T° 2-8 $^{\circ}$ C) y luego de cada 30 minutos se pasarán al área de proceso.

Todos los procedimientos serán realizados con las medidas de bioseguridad correspondientes, usando los equipos de protección personal, cabina de flujo laminar y dentro de un ambiente con presión negativa, para proceder como sigue:

Dentro de una cabina de flujo laminar, con una pipeta pasteur descartable, se cogerá aproximadamente 200 uL de muestra representativa. Sobre 2 láminas portaobjetos se colocará 1 gota de muestra, a cada una (lámina #01 para montaje húmedo y lámina #02 para coloración). Con la misma pipeta se recolectará nuevamente 1ml. de muestra representativa y se llenará en tubos plásticos de capacidad 1.5 ml el cual se rotulará y conservará a -20° C hasta su proceso por técnica de biología molecular. Se descartará la pipeta en solución desinfectante de hipoclorito de sodio.

3.5.1 Montaje húmedo:

Sobre la lámina #01, se agregará una gota de suero fisiológico.

Con ayuda de una pequeña bagueta, se homogenizará la muestra mediante movimientos circulares concéntricos. Se cubrirá el homogenizado con laminilla cubreobjeto y se colocará los montajes húmedos sobre una bandeja de transporte para llevarlo al área de microscopía.

Se colocará el montaje sobre la platina del microscopio.

Se encenderá el microscopio con el condensador abajo y semicerrado para leer a un aumento 100X haciendo un barrido de campos buscando movimiento celular debido a flagelos de movimiento asincrónico, en células piriformes con citoplasma granular y núcleo (no siempre visible en microscopio de luz) de posición centro-apical. Se cambiará de aumento a 400X para ampliar la visualización. El hallazgo de *Lophomonas* sp. serán registrados en la ficha de recolección de datos (Anexo 1).

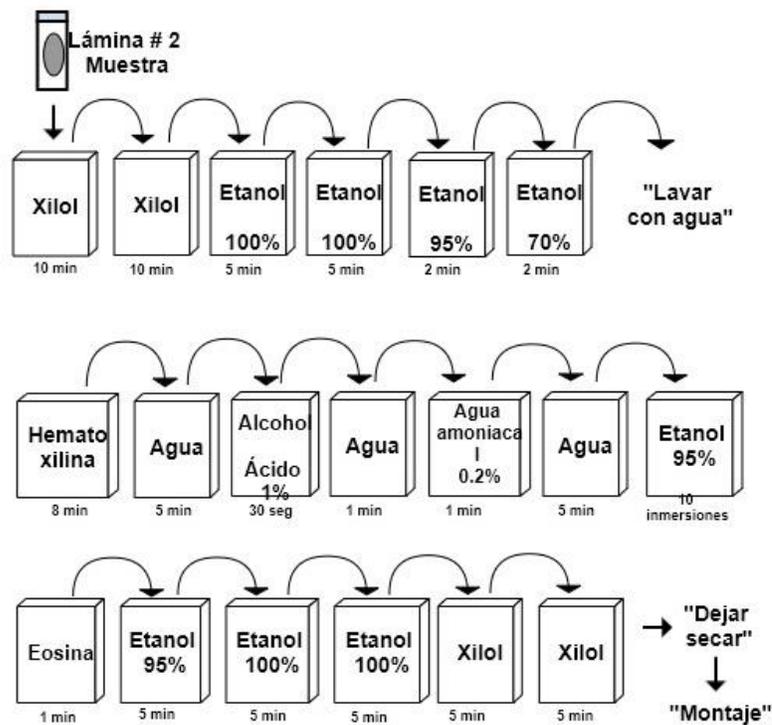
3.5.2 Coloración Hematoxilina & Eosina (HE):

Sobre la lámina #02 y con ayuda de una pequeña bagueta, se extenderá la muestra mediante movimientos circulares concéntricos de adentro hacia afuera, hasta obtener un área no mayor de 2x3 cm, evitando llegar a los extremos de la lámina y procurando un extendido adecuado (ni muy delgado, ni muy grueso). Se dejará secar y se procederá a colorear en la batería de coloración, en el siguiente orden:

Se deshidratará sumergiendo la lámina #2 en dos cambios de xileno por un lapso de 10 minutos cada uno; seguidamente, se realizará dos cambios en etanol absoluto por un lapso de 5 minutos cada uno. Luego, se sumergirá en etanol al 95% por 2 minutos, seguido por inmersión en etanol al 70% por 2 minutos, finalmente se lavará con agua.

A continuación, se sumergirá en solución de hematoxilina por un lapso 8 minutos, quitar el exceso enjuagando en agua durante 5 minutos. Seguidamente, se sumergirá en alcohol ácido al 1% por un lapso de 30 segundos, teniendo cuidado de no exceder el tiempo; inmediatamente, se enjuagará con agua durante 1 minuto. Posteriormente, se sumergirá en agua amoniacal al 0.2% durante 1 minuto, se quitará el excedente enjuagando en agua durante 5 minutos. Continuando la coloración, se realizará 10 inmersiones en etanol al 95 %; seguidamente, se colocará en eosina durante 1 minuto. Prosiguiendo, se sumergirá la lámina en etanol al 95% durante 5 minutos; seguidamente, se realizará dos cambios en etanol absoluto por 5 minutos cada uno; finalmente, se hará dos cambios de xileno durante 5 minutos cada uno.

Se dejará secar y se montará con Bálsamo de Canadá.



La lectura se realizará a 1000X buscando células con forma redondeada o piriforme, presencia de flagelos y ausencia de barra terminal, aplicando los criterios citomorfológicos descritos por Yosra Hussein et. al. (Tabla 1, Anexo 3). El hallazgo de *Lophomonas* sp. serán registrados en la ficha de recolección de datos (Anexo 1).

3.5.3 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR):

Se usarán los “Primers” diseñados por Fakhar y col. que tiene las siguientes secuencias: forward (F) 5'-GAGAAGGCGCCTGAGAGAT-3' y *reverse* (R) 5'-ATGGGAGCAAACCTCGCAGA-3'; que amplifica una secuencia género específica de *Lophomonas* sp., y consta de 214 pares de bases (pb) correspondiente de la subunidad menor de ARN ribosómico (SSU rRNA) (GenBank accesions: JX020505.1 para *L. blattarum* y JN088049.1 para *L. striata*)

Extracción de ADN: Se homogenizará 200 uL de muestra con 200 uL de buffer de digestión (este buffer consta de 50mM Tris-HCl de pH 7.6, 1 mM de EDTA y 1% de Tween 20), a esto se le agregará 20 uL de solución de proteinasa K (20mg de enzima/mL) e incubará a 45 °C durante toda la noche. Al día siguiente se agregará 200 ul de solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitará fuertemente. Seguidamente se centrifugará por 15 minutos a 14000g. Luego, se separará el sobrenadante dentro de un nuevo microtubo. Posteriormente, se añadirá 400uL de etanol absoluto refrigerado y se colocará a -20°C por 2 horas. Luego, para la precipitación se agregará 200 uL de etanol al 70%, se centrifugará; finalmente se resuspenderá el precipitado en 50 uL de “buffer” Tris EDTA 1mM (Buffer TE). La resuspensión se almacenará a 4°C hasta su uso.

Amplificación del SSU rRNA por PCR:

Para este proceso primeramente se estandarizará la técnica para lo cual se probarán diferentes concentraciones de los reactivos como son los “Buffers” del PCR (10mM HCl a pH 8.3, 50 mM KCl), diferentes concentraciones de MgCl₂, de cada desoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP y dUTP), de cada "Primer" y de Taq polimerasa (en unidades por ul.). Se utilizará H₂O de grado molecular libre de ADNasa y RNAasa, El total de volumen de reacción será de 25 ul. Antes de hacer el PCR se cuantificará el ADN previamente extraído de la muestra positiva y se hará un PCR de control interno para verificar que no haya inhibidores para el PCR de *Lophomonas* sp., Los “primers” de control interno serán elegidos de la proteína humana Beta-globina que amplifican 290 pares de bases (pb) lo que nos permitirá tener la certeza que los resultados obtenidos son correctos. Las secuencias son: PC04 5' CAACTTCATCCACGTTCCACC 3' y GH20 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3' [40].

Así mismo se estandarizarán los ciclos de amplificación, considerando un ciclo de denaturación a 94° C, un ciclo de extensión a 72° C y el de hibridación se calculará teniendo en cuenta la cantidad de nucleótidos presente en cada “primer” utilizado para el parásito.

Una vez estandarizado el PCR se procesarán las muestras positivas a los otros exámenes y un 20% del total de negativos, en cada corrida se utilizará ADN control

positivo, ADN control negativo y una muestra de “buffer” que será el control de la reacción.

Para asegurarnos de que las muestras clínicas no presentan inhibidores todas ellas también serán procesadas con los “Primers” de control interno.

Corridas electroforéticas: Se llevarán a cabo en geles de agarosa al 2%. con 85 miliamperios y voltaje constante, por aproximadamente 1 hora. En cada corrida se utilizarán marcadores de peso molecular (ADN Ladder - Gibco BRL). Los geles serán seguidamente coloreados con bromuro de etidio y visualizados con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta. La visualización de una amplificación de 214 pb nos indicará que es positiva a *Lophomonas* sp.

3.6 Aspectos éticos del estudio:

Este proyecto de investigación solicitará ser aprobado por la Dirección Universitaria de investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT), así como del Comité de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Asimismo, una vez aprobado por ambas oficinas, también se solicitará su aprobación al hospital general referencial donde se ejecutará el presente estudio, haciendo de conocimiento a su Comité de Ética en Investigación de lo que trata, los objetivos, los beneficios en el campo clínico; así como la confidencialidad del paciente. Todos los datos y resultados obtenidos se pondrán a disposición del Hospital en caso lo requiera.

Durante el desarrollo del estudio se respetarán los principios éticos delineados en la Declaración de Helsinki, y se seguirán estrictamente las recomendaciones realizadas por el Comité de ética de la UPCH.

3.7 Plan de análisis:

Una vez aprobado el proyecto por el comité de ética se procederá a enrolar las muestras que lleguen al servicio de Laboratorio de Microbiología, previo cumplimiento de los criterios de inclusión. Las fichas de recolección de datos serán llenados, conforme se van enrolando las muestras, como sigue: Los datos demográficos y clínicos serán a partir del formato de solicitud médica (solo aquellos datos que no estén especificados serán a partir de la historia clínica), y la parte del examen de laboratorio serán llenados por el personal a cargo del proceso de las muestras. Una vez completados todos los datos (de las dos partes) de estudio serán vaciados a un cuadro de Excel 2016™ (Base de datos).

Tras haber completado todas las fichas se tendrá una tabla de datos con las variables y resultados obtenidos de los ensayos, esta tabla será revisada minuciosamente para finalmente ser ingresado como base de datos al sistema estadístico STATA para obtener los resultados estadísticos y cuadros finales.

4 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, et al. A Higher Level Classification of All Living Organisms. PLoS ONE. 2015;10(4):1-60.
2. Gile GH, Slamovits CH. Phylogenetic Position of *Lophomonas striata* Bütschli (Parabasalida) from the Hindgut of the Cockroach *Periplaneta Americana*. Protist. 2012;163:274-83
3. Kudo RR. Handbook of Protozoology. Springfield – Illinois (US): Charles C Thomas. 1931. Disponible en: https://ia600904.us.archive.org/20/items/handbookofprotoz00kudo/handbook_ofprotoz00kudo.pdf.
4. Martinez-Giron R, van Woerden HC. *Lophomonas blattarum* and bronchopulmonary disease. Journal of Medical Microbiology. 2013; 62:1641-8.
5. Beams HW, Sekhon SS. Further Studies on the Fine Structure of *Lophomonas blattarum* with Special Reference to the So-called Calix, Axial Filament, and Parabasal Body. J Ultrastructure Research. 1969; 26: 296-315..
6. Beams HW, King RL, Tahmisian TN, Devine R. Electron Microscope Studies on *Lophomonas striata* with Special Reference to the Nature and Position of the Striations. J Protozool. 1960; 7(1):91-101.
7. Kudo RR. On the cytoplasmic fibrils of *Lophomonas striata*. J protozool. 1954;1(1): 80-82.
8. Martinez-Girón R, Ribas A, Astudillo-Gonzales A. Flagellated Protozoa in Cockroaches and Sputum: The Unhygienic Connection? Allergy and asthma Proceedings. 2007;28(5):608-9.
9. Berenji F, Parian M, Fata A, Bakhshae M, Fattahi F. First Case Report of Sinusitis with *Lophomonas blattarum* from Iran. Case reports in Infectious Diseases. Case reports in infectious diseases. 2016;2016: 1-2. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2016/2614187>
10. Mirzazadeh F, Berenji F, Amini M, Salehi M, Shamsiam A, Fata A, Parian M, Nakhaei M and Ghofraniha L. *Lophomonas blattarum* in asmathic patients and control group. Journal of research in medical and dental science. 2017;5(5):1-5.
11. Zeng H, Kong X, Chen X, et al. *Lophomonas blattarum* Infection Presented as Acute Exacerbation of Chronic Obstructive PulmonaryDisease. J Thorac Dis. 2014;6(6):E73-E76.
12. Xue J, Li YL, Yu XM, et al. Bronchopulmonary Infection of *Lophomonas blattarum* A Case and Literature Review. Korean J Parasitol. 2014; 52(5):521-525.
13. Thakur C, Verma S, Negi RS, et al. *Lophomonas blattarum* Co-Infection in a Patient with Multidrug-Resistan Tuberculosis. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2017;21(10):1185-87.

14. Verma S, Verma G, Singh D, et al. Dual Infection with Pulmonary Tuberculosis and *Lophomonas blattarum* in India. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2015;19(3):368-369.
15. Zerpa R, Oré E, Quispe C, et al. *Lophomonas* sp. in Respiratory Tract Secretions in Hospitalized Children with Pneumonia and Bordetella pertussis Co-Infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2013; 89(5.1):419.
16. Martínez-Girón R, Esteban JG, Ribas A, Doganci L. Protozoa in Respiratory Pathology A Review. *Eur Respir J*. 2008; 32(5):1354-70.
17. Ribas A, Martínez-Girón R, Sánchez-Del Río J, González-Alonso D. Protozoal forms in the Sputum of Immunocompromized Patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2005; 37:205-10.
18. Kilimcioglu AA, Havlucu Y, Girginkardesler N, et al. Putative bronchopulmonary flagellated protozoa in immunosupressed patients. *Biomed research international*. 2014; 2014:5pág. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/912346>
19. Vidal C, Barthel E, Rodriguez MA. Infeccion Pulmonar por *Lophomonas* sp. en un Paciente con Leucemia Mieloide Aguda. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2018; 35(3):527-30.
20. Gonzales Saldaña N, Otero Mendoza FJ, Rivas Larrauri Francisco, et al. Bronchopulmonary infection by *Lophomonas blattarum* in a pediatric patient after hematopoietic progenitor cell transplantation first report in Mexico. *J Thorac Dis*. 2017;9(10): E899-E902.
21. He Q, Chen X, Lin B, et al. Late Onset Pulmonary *Lophomonas blattarum* Infection in Renal Transplantation A Report of Two Cases. *The Japanese Society Internal Medicine*. 2011; 50:1039-43.
22. Wang Y, Tang Z, Ji S, et al. pulmonary *Lophomonas blattarum* infection in patients with kidney allograft transplantation. *European society organ transplantation*. 2006; 19:1006-13.
23. Valdiviezo-Allauca NS, Chavez-Berrones MS, Merino-Guerrero CD, Ayala-Baca JB. *Ciencia Digital*. 2019; 3(3.3):309-18. DOI: <https://doi.org/10.33262/cienciadigital.v3i3.3.823>
24. Tyagi R, Anand KB, Teple K, Negi RS. *Lophomonas blattarum* infection in immunocompetent patient. *Lung India*. 2016; 33(6):667-8.
25. Ejaz H, Alsrhani A, Zafar A, et al. COVID-19 and comorbidities: Deleterious impact on infected patients. *J Infect Public Health*. 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.07.014>
26. Rao X, Liao Q, Pan T, Li S, Zhang X, Zhu S, Lin Z, Qiu Y, Liu J. Retrospect and Prospect of *Lophomonas blattarum* Infections and Lophomoniasis Reported in China. *Open Acces Library Journal*. 2014;1(e1121): 1-6.
27. Zerpa R, Huiza A, Espinoza Y, Ore E. Utilidad del montaje húmedo para la detección de *Lophomonas* sp. en secreciones respiratorias. *An Fac Med (Lima)*. 2004;65(supl):24.

28. Martinez-Giron R, Cornelis van Woerden H, Doganci L. *Lophomonas* Misidentification in Bronchoalveolar Lavages. *Internal Medicine*. 2011;50(21):2721-2723.
29. Alam-Eldin YH, Abdulaziz AM. Identification Criteria of the Rare Multi-flagellate *Lophomonas blattarum*: Comparison of Different Staining Techniques. *Parasitol Res*. 2015; 114: 3309-14.
30. Xin-Lin M, Ying S, Shu-Ying Z, et al. A Study on the Differential Diagnosis of Ciliated Epithelial Cells from *Lophomonas blattarum* in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Chin J Tuberc Respir Dis*. 2013; 36(9):646–650.
31. Kirby H. *Materials and Methods in the Study of Protozoa*. California (EEUU): University of California 1950: 24-25.
32. Fakhar M, Nakhaei M, Sharifpour A, et al. First Molecular Diagnosis of Lophomoniasis: the End of a Controversial Story. *Act Parasit*. 2019,64:390-393. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00084-2>
33. Youssef MY, Essa MM, Sadaka HA, Eissa MM, Rizk AM. Effect of ivermectin on combined intestinal protozoal infection (giardiasis and cryptosporidiosis). *J Egypt Soc Parasitol*. 1996;26(3):543-553.
34. Oscherov EB, Gimenez LI, Araujo AV, Arbino MO, Pato AM. Presencia de *Lophomonas blattarum* (Hypermastigida: Lophomonadidae) en Pacientes con Afecciones Respiratorias. *Rev Arg Parasitol* 2012; 1(1): 205.
35. Echeverría MS, Gomez BA, Zuñiga CJ. *Lophomonas blattarum* en Lavado Broncoalveolar de Pacientes con Neumonía Asociado a Absceso Pared Torácica. *Neumol Pediatr* 2014; 9 (3) Supl: S12-S13.
36. Zerpa R, Ore E, Patino L, Espinoza YA. *Lophomonas* sp. in respiratory tract secretions in hospitalized children with severe lung disease. *Rev Peru Med Exp Salud Publ*. 2010;27(4):575–577.
37. Cabanillas Espinoza CE. Frecuencia de *Lophomonas* sp. en muestras de secreciones respiratorias de pacientes del instituto nacional de salud del niño de enero a marzo 2017. Tesis (Lic.). Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, EAP. de Tecnología Médica. 2017. 68 h.
38. Zerpa R, Oré E. Infección del Tracto Respiratorio Humano por *Lophomonas* sp. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2016; 33(4):827-8.
39. Diaz-Cajusol KB, Iglesias-Osores SA, Delgado-Tenorio DC, et al. *Lophomonas* sp. en un Hospital del Norte del Perú. *Rev Exp Med*. 2017;3(3):119-120.
40. Joseph P, Calderon MM, Gilman RH, et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *J Clin Microbiol*. 2002;40(12):4499-4503.

5 PRESUPUESTO Y CRONOGRAMA:

5.1 Presupuesto:

MATERIALES PARA EL PROYECTO	
DE ESCRITORIO	
Plumón permanente (6) lapiceros (6), USB (1) y papel.	50.00
Impresiones y fotocopias	150.00
DE LABORATORIO	
Guantes de latex, descartable (6 cajas).	60.00
Guantes de nitrilo descartable (1 caja).	18.00
Frascos para las muestras (400)	150.00
Láminas Porta (8 cajas) y cubre objetos (6 cajitas)	70.00
Solución salina fisiológica estéril.	4.00
Pipetas Pasteur descartables, graduadas de 1.0 mL (4 paq)	135.00
Micropipetas (4)	360.00
Puntas para Micropipetas de 10uL y 200uL	100.00
REACTIVOS	
Kit para PCR	1200.00
Marcador de Pares de bases	150.00
Kit para extraer ADN de muestras	800.00
Buffer para corridas electroforéticas	1000.00
“Primers” o cebadores	400.00
TOTAL	4647.00

5.2 Cronograma:

Actividad/Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisión de bibliografía	x	x	x	x	x							
Elaboración y Presentación de proyecto de investigación		x	x									
Compra y preparación de materiales.			x	x								
Recolección de muestras y Examen en fresco y coloreado.				x	x	x	x	x	x			
Extracción del ADN y Prueba molecular.							x	x	x			
Análisis de datos.									x	x		
Elaboración y presentación del informe final.										x	x	
Envío a revista científica.												x

ANEXOS:

ANEXO 1: Ficha de recolección de datos:

Fecha de ingreso al estudio: / /

Código de paciente:

Código interno de estudio:

Edad:años Meses

Ciudad de procedencia: Distrito: Provincia:.....

Sexo:

Masculino:

Femenino:

Servicio de procedencia:

Ambulatorio.

Hospitalizado No UCI.

Hospitalizado UCI.

Tipo de secreción respiratoria:

Aspirado bronquial:

Estado inmunológico:

Con inmunosupresión:

Sin inmunosupresión.

Co-Morbilidad / Co-factores:

Asma.

Tuberculosis.

Pertusis (Tos ferina o Coqueluche).

Neoplasia.

Diabetes Mellitus.

Infección por VIH:

Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC):

Trasplante de órgano / fecha:

Terapia inmunosupresora prolongada / tiempo / medicamento:

COVID-19

Otros, especificar:

.....

BUSQUEDA DE <i>Lophomonas</i> spp. - RESULTADOS			
MONTAJE HUMEDO	<input type="radio"/>	POSITIVO	REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)
	<input type="radio"/>	NEGATIVO	
COLORACIÓN H&E	<input type="radio"/>	POSITIVO	<input type="radio"/> POSITIVO
	<input type="radio"/>	NEGATIVO	

ANEXO 2: Formato de solicitud para realizar investigación en hospital.

SOLICITO: Permiso Para Realizar Trabajo De Investigación.

Señores:

Comité de Ética en Investigación Del Hospital Nacional

Yo,, identificado con DNI N°
domiciliado en Ante Uds. respetuosamente me presento y
expongo:

Que habiendo culminado la especialidad en laboratorio de microbiología en la
universidad peruana cayetano Heredia, solicito a Ud. permiso para realizar trabajo de
investigación en la institución que dicho comité resguarda, sobre “Prevalencia de
Lophomonas sp. en Pacientes de un Hospital General Referencial del Callao – Perú”.
Permitiendo el uso de una porción de las muestras respiratorias (aspirados bronquiales)
llegadas al servicio de microbiología y el acceso a información clínica relevante para
los objetivos del estudio. Siendo manejados, respetando las normas éticas para la
investigación.

Por lo expuesto:

Pido a ustedes, acceder a mi solicitud.

Callao, del 2020.

(Nombre y Apellido).

DNI:

ANEXO 3:

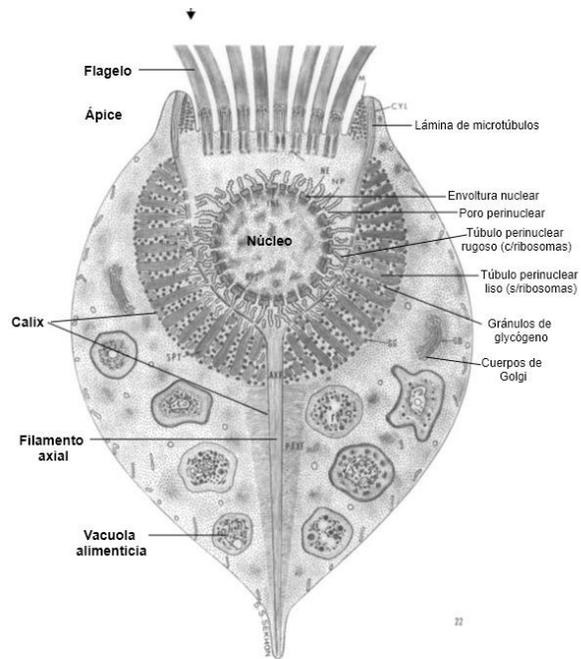


Figura 1. Estructura básica de Lophomonas sp. adaptado de Beams [5].

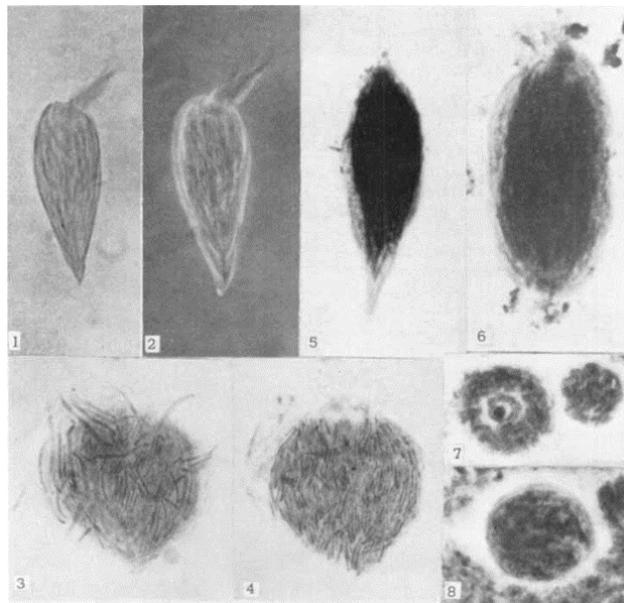


Figura 2. Lophomonas striata, 1-7: trofozoíto y 8: quiste. Tomado de Kudo [7].

Tabla 1: Tomado de “*Criterios morfológicos para la diferenciación entre L. blattarum, células bronquiales, cuerpos de creola y ciliocitoforia*”, Yosra Hussein y Amany Mamdouh 2015.

CARACTERÍSTICAS	<i>Lophomonas blattarum</i>	Células bronquiales	Cuerpo de Creola	Ciliocitoforia
TAMAÑO	20-35 μm	Mayor de 20 μm	Variable	Variable
FORMA	Plasticidad: piriforme, redondeada u ovalada.	Columnar	Grupos o conglomerados redondeados de células bronquiales, las cuales están caracterizadas por la presencia de cilios en todo alrededor de los cuerpos o en la superficie del conglomerado de células desprendidas.	Partes triangulares de células bronquiales manteniendo los cilios, los cuales están en un citoplasma dividido, con núcleo degenerado.
CITOPLASMA	Gránulos citoplasmáticos y vacuolas	Claro	Claro	Claro
NÚCLEO	Vesicular. Usualmente no se observa.	Núcleo localizado en la base y con cromatina granular fina.	Igual que células bronquiales.	Núcleo degenerado en una parte del citoplasma dividido.
FLAGELO / CILIO	Largo. Ondulante. Tamaños variables. Sin barra terminal. En un extremo de la célula. Movimiento ondulante el cual conduce a la natación activa en montaje húmedo.	Corto. Derechos. Tamaño uniforme. Con gruesa barra terminal. Insertados en la barra terminal, en el borde luminal de la célula. Movimiento coordinado y sincronizado el cual no conduce a movimiento activo de la célula en montaje húmedo.	Igual que células bronquiales.	Igual que células bronquiales.

ANEXO 4: Flujograma de trabajo:

