

“Comparación de técnicas de laboratorio para el diagnóstico de *Giardia intestinalis*”

“Comparison of Laboratory Techniques For the Diagnosis of *Giardia Intestinalis*”

Calchi L. C. Marinella^{1*}, Acurero E.¹, Villalobos R.²,
Colina M.³, Di Toro L.³, Villalobos C.³

¹Cátedra de Parasitología

²Cátedra de Medicina Tropical

³Licenciados en Bioanálisis

Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina.

Universidad del Zulia

*marinella.calchi@gmail.com

Resumen

Evaluar la sensibilidad y especificidad de tres técnicas de laboratorio para el diagnóstico de *Giardia intestinalis*. **Materiales y Métodos:** 31 muestras de heces provenientes de niños en edad preescolar, se procesaron a través del examen microscópico con SSF-lugol, método de concentración de Ritchie y método inmunológico “*Giardia*-Strip”. La Técnica de Ritchie fue considerada como “Gold Standard”. **Resultados:** Se identificaron quistes de *Giardia intestinalis* en 6 muestras (19,35%) a través de la técnica de Ritchie. La técnica del examen al fresco identificó en 5 de ellas quistes del protozooario (16,1%), mostrando una sensibilidad de 83% y especificidad del 100%. La técnica *Giardia*-Strip identificó quistes en 4 muestras (12,9%) con sensibilidad de 66,66% y especificidad del 100%. El valor predictivo positivo para el método de “*Giardia*-Strip” fue 14% y valor predictivo negativo de 93%. El examen al fresco mostró valor predictivo positivo del 100% y valor predictivo negativo de 96%. **Conclusiones:** El concentrado de Ritchie y el examen al fresco mostraron mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de *Giardia intestinalis*, cuando las muestras contienen solo quistes. Sin embargo, el método *Giardia*-Strip, demostró mayor rapidez en la obtención de los resultados.

Palabras claves: Giardiasis, Diagnóstico, Directo SSF-Lugol, Ritchie, *Giardia*-Strip.

Recibido: 06-05-14 / Aceptado: 26-05-14

Abstract

Objective: To evaluate the sensitivity and specificity of three laboratory techniques for the diagnosis of *Giardia intestinalis*. **Materials and Methods:** 31 fecal samples from preschoolers were submitted to microscopic examination with SSF-Lugol, the Ritchie concentration method and the “*Giardia*-Strip” immunological method. The Ritchie technique was considered the “gold standard.” **Results:** *G. intestinalis* cysts were identified in 6 samples (19.35%) using the Ritchie technique. The fresh test identified 5 cases of protozoan cysts (16.1%), showing a sensitivity of 83 % and specificity of 100 %. The *Giardia*-Strip identified cysts in 4 samples (12.9%) with 66.66 % sensitivity and 100% specificity. The positive predictive value for the “*Giardia* Strip” method was 14% and the negative predictive value was 93%. The fresh test showed a positive predictive value of 100% and a negative predictive value of 96 %. **Conclusions:** Ritchie concentrate and the fresh test showed higher sensitivity and specificity in the diagnosis of *Giardia intestinalis*, when samples contain only cysts. However, the *Giardia*-Strip method proved faster in obtaining results.

Keywords: Giardiasis, diagnosis, microscopic examination with SSF-Lugol, Ritchie, *Giardia*-Strip.

Introducción

Dentro de la gran variedad de parásitos que afectan a niños, los protozoarios intestinales suelen ser de difícil identificación debido a factores que incluyen desde variaciones en la cantidad eliminada de sus formas de resistencia (quistes), hasta dificultades en la detección de los trofozoitos, debido a que en oportunidades las muestras no llegan a laboratorio en condiciones óptimas para su análisis (1).

Giardia lamblia (*G. duodenalis*; *G. intestinalis*), es un parásito del intestino delgado que afecta principalmente a niños y produce cuadros clínicos de variada intensidad, desde la infección asintomática hasta cuadros graves de diarrea crónica con síndrome de mala absorción (2).

El diagnóstico de la Giardiasis como se le denomina a la infección por este protozoario, se realiza usualmente a través de la identificación de trofozoitos y quistes del protozoario (diagnóstico parasitológico); sin embargo, es importante destacar que dentro de las técnicas de diagnóstico para protozoarios intestinales pueden contemplar métodos inmunológicos, que detectan antígenos del pa-

rásito o anticuerpos generados en el hospedero producto de la infección (1-3).

La infección por *G. intestinalis* se disemina principalmente de persona a persona, pero se ha comprobado que algunos animales como perros, gatos, castores rumiantes, pueden ser el reservorio de *G. intestinalis*; por consiguiente dan origen a infección en humanos, en cuyo caso esta parasitosis se puede considerar como una zoonosis (4).

La Giardiasis se transmite mediante la ingestión de los quistes, por los cuales son infectantes tan pronto salen en la materia fecal. Puede presentarse en forma epidémica por contaminación de acueductos, aun en aquellos con tratamiento de cloración. En general, la prevalencia de *G. intestinalis* es más alta que la de *Entamoeba histolytica* y se considera actualmente que es el parásito intestinal más frecuente en el mundo. En países subdesarrollados la prevalencia en niños es de 20% a 30%. La presencia de *Giardia* en animales salvajes como castores y en domésticos como perros y gatos, hace que la Giardiasis pueda clasificarse como una zoonosis, pues no hay especificidad de huésped y esos animales actúan como reservorios que dan origen a in-

fecciones humanas. Esta parasitosis tiene importancia en homosexuales por la transmisión oro – fecal y por la presencia de VIH. En un estudio en Sao Paulo en pacientes con SIDA, la prevalencia de *G. intestinalis* fue: 26%, más alta que en la población general y mayor que la prevalencia de otros parásitos. Se conoce también que el hipo o agamaglobulinemia son factores que favorecen la infección y la patología por este parásito (4).

En la actualidad se han incrementado los conocimientos en relación a la respuesta inmune frente a la infección por *G. intestinalis* y a la calidad antigénica de este protozoo. Se reconoce que algunas personas se infectaban sin llegar a enfermar, en tanto que otras lo hacían de modo muy severo. Más aun de los pacientes que enfermaban, algunos curaban espontáneamente, en tanto que otros hacían un curso crónico. El hecho de ser una infección sintomática en los niños y poco sintomática en los adultos procedentes del mismo medio contaminado, parecía indicar que existía una experiencia previa en la infancia que protegía a los adultos. Evidencias más concretas aparecieron cuando se describió la giardiasis recidivante en variados síndromes de inmunodeficiencias de tipo humoral; posteriormente, se demostró el rol protector de la IgG, la cual participa en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La lisis de trofozoitos inducida por complemento por la vía clásica, se efectúa en presencia de IgM (5).

Según la OMS, la Giardiasis tiene una distribución global estimada en $2,8 \times 10^8$ casos anuales y *G. intestinalis* es el parásito intestinal con mayor frecuencia detectado en seres humanos. Si bien, en los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la fisiopatología de la infección por *G. intestinalis*, hasta el momento, los factores que determinan la variabilidad de las manifestaciones

clínicas de Giardiasis no están completamente esclarecidos (2).

Giardia intestinalis es un protozoo presente en nuestro país, con frecuencia prevalente en la población infantil, diversas investigaciones identifican al protozoo en grupos escolares (6,7). En el estado Zulia se ha detectado en grupos escolares (8), infantes de hogares de cuidado diario (9), niños desnutridos (10) y comunidades indígenas (11).

En la actualidad se ha orientado la realización de pruebas inmunológicas en el laboratorio, para el diagnóstico de diversas enfermedades; entre ellas las infecciones parasitarias (12).

Existen pruebas que han ganado la aceptación para el diagnóstico de la Giardiasis, pruebas inmunológicas como el Inmunoensayo enzimático (EIA) y la Inmuno cromatografía que hacen evidente la respuesta humoral del hospedero ante antígenos parasitarios, y que proveen sensibilidad y especificidad que sobrepasa el 90%. Aunque estos métodos prometen ser más sensibles y específicos que las coloraciones de rutina y el examen al fresco, pueden dejar escapar otros patógenos que se encuentren presentes en la muestra fecal. Por lo general, las pruebas inmunológicas son mayormente útiles en los laboratorios que manejan un gran volumen de muestras (12).

Un estudio que utilizó dos métodos de sedimentación: Ritchie (R) y Carles Barthelémy (CB); así como uno de flotación: Willis (W), con el fin de optimizar el diagnóstico de los parásitos intestinales y determinar la eficacia de las técnicas; mostró que a partir de los resultados obtenidos, el método de Ritchie resultó ser más eficaz en la recuperación tanto de protozoos como de helmintos. La emergencia de altas prevalencias parasitarias, hace imprescindible una selección me-

todológica diagnóstica sensible que reduzca el porcentaje de errores en la identificación de protozoos y helmintos, especialmente de aquellas formas que concentran la mayor cantidad de fallas diagnósticas. Esta situación permite recomendar la realización de al menos una técnica de sedimentación (R) y una de flotación y se destaca que a medida que se perfeccionen las técnicas diagnósticas, la frecuencia de hallazgos de parásitos aumentará, especialmente para aquellos protozoos y helmintos cuyo rol como patógenos resulta emergente de la situación sociocultural de los países en vías de desarrollo (13).

El método ELISA, utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales, es recomendable para el diagnóstico, cuando se dispone del estuche comercial, como la prueba rápida para *Giardia* ProsSpect Giardia Rapid Assay (Alexon Inc, Mountain View, California) el cual tiene un costo elevado, lo que debe tenerse en cuenta en pacientes de bajo recursos. Este método tiene una sensibilidad de más de 90% y especificidad de 100%. La eficacia es superior a un examen coprológico y es comparable a la obtenida en dos exámenes en días diferentes, usando métodos de concentración y observación microscópica prolongada. En Colombia el Instituto Nacional de Salud ha desarrollado un estuche comercial con el nombre de dot-elisa-Giardia-INS, que es rápido, económico y fácil de realizar, aun en zona rural. Existe también un método fluorescente; Merifluor Assay (Meridian Diagnostics, Cincinnati, Ohio, USA) y un procedimiento por el método de cromatografía, que es rápido y con buena sensibilidad y especificidad (color Pac *Giardia/Cryptosporidium* de Becton Dickinson) (4).

Por tanto, surge la inquietud de realizar un trabajo de investigación para dar a conocer la capacidad diagnóstica de diferentes méto-

dos a través de la comparación de pruebas coproparasitológicas e inmunológicas utilizadas diariamente en la mayoría de los laboratorios clínicos e instituciones de salud pública para la identificación del protozoo *Giardia intestinalis*, ya que es uno de los principales agentes causales de diarreas en la población, especialmente en niños de edad escolar.

Materiales y métodos

La población estudiada estuvo conformada por 31 niños en edad preescolar del Centro de Educación Inicial Negra Matea, ubicado en la población de Santa Rosa de Agua de la Ciudad de Maracaibo, Edo. Zulia. La comunidad de este sector mantiene un saneamiento ambiental deficiente y presenta limitaciones en la disponibilidad del agua potable.

La muestra biológica utilizada fue la muestra fecal, la cual se obtuvo previa charla dirigida a los padres y representantes de los niños, con la finalidad de informar sobre el estudio, solicitar colaboración y el permiso requeridos; así como impartir las instrucciones para la correcta recolección de la misma.

El análisis fue realizado en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Escuela Bioanálisis de la Universidad del Zulia, donde se procesaron a través del examen microscópico de las heces con solución salina fisiológica al 0,85% para la búsqueda de trofozoitos y coloración de lugol para la identificación de quistes de *Giardia intestinalis*: Se utilizó la técnica de Ritchie como método de concentración solo para recuperar quistes del protozoario (14).

Una parte de la muestra fue utilizada para la realización del método inmunológico de diagnóstico *Giardia*- Strip Coris BioConcept (Método Antigénico rápido por Inmuno-cromatografía).

Procesamiento de la técnica *Giardia*-Strip

Se añade 15 gotas de la solución del tampón de dilución en un tubo, se sumerge un asa que contenga la muestra de heces en el tubo, se agita el preparado para homogeneizarlo, se introduce la tira en la dirección indicada por la flecha roja, esperar reacción por 15min; el resultado positivo se observa con la coloración de la línea control y la línea de la prueba, mientras que el negativo con la coloración de la línea control.

Análisis de datos

Los resultados obtenidos se ilustran en tablas utilizando números y porcentajes. Para los cálculos de sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo de *Giardia*-Strip y del examen directo con solución salina se elaboraron tablas 2x2 utilizando la técnica de Ritchie como prueba de referencia (Gold Standard).

Resultados

Para evaluar el método de *Giardia*-Strip se tomó como referencia o "Gold Standard" a la técnica de concentración de Ritchie. Se determinó entonces Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo y Valor Predictivo negativo.

Un total de 31 muestras provenientes de niños en edades comprendidas entre 4 a 6

años fueron procesadas a través de las técnicas del examen al fresco, concentrado de Ritchie y método de *Giardia*-Strip. El 45,2% de las muestras obtenidas correspondieron al sexo masculino y el 54,8% al sexo femenino. El promedio de la edad fue la Mediana la cual fue de 4 años.

La Tabla 1 muestra el comportamiento del método antigénico rápido por Inmuno-cromatografía *Giardia*-Strip aplicado en 31 muestras y comparado con el método de Ritchie, se observa que *Giardia*-Strip posee un nivel de sensibilidad de 66,66% y una especificidad de 100%, el valor predictivo positivo de 14%, valor predictivo negativo de 93%.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos al comparar la técnica del examen directo con solución salina con la técnica de Ritchie. El examen directo y coloración de lugol, mostró un nivel de sensibilidad de 83% y un 100% de especificidad en comparación con la técnica de Ritchie. Valor predictivo positivo 100%, Valor predictivo negativo 96%.

Discusión

La mayoría de los laboratorios clínicos emplean las técnicas parasitológicas el examen directo, y tinción temporal de lugol, para el diagnóstico de parásitos entéricos (helminthos y protozoarios). Investigaciones en el área implementan además algún método de concentración (6-11).

Tabla 1. Comparación método *Giardia* strip versus técnica de ritchie.

		Ritchie		Total
		Positivo	negativo	
Giardia - strip	Positivo	4	0	4
	Negativo	2	25	27
Total		6	25	31

Sensibilidad: 66,66%. Especificidad: 100%. Valor Predictivo positivo: 14%. Valor Predictivo negativo: 93%.

Tabla 2. Comparación técnica del examen directo versus técnica de Ritchie

		Ritchie		Total
		Positivo	negativo	
Examen al Fresco	Positivo	5	0	5
	Negativo	1	25	26
Total		6	25	31

Sensibilidad: 83%. Especificidad: 100%. Valor Predictivo positivo: 100%. Valor Predictivo negativo: 96%.

El presente estudio emplearon 3 técnicas: examen directo con solución salina fisiológica y lugol, técnica de Ritchie y el método inmunológico *Giardia*-Strip. Estos métodos se eligieron pues consideramos que no necesitaban la utilización de equipos sofisticados y demandan bajos presupuestos; de manera tal que pueden ser empleados en instituciones de salud en donde los recursos económicos son limitados.

El estudio comparativo entre las tres técnicas (examen directo, Ritchie y *Giardia*-strip) aplicado a las 31 muestra fecales, identificó al protozooario *G. intetinalis* en 6 de las muestras a través de técnica de Ritchie, con la técnica *Giardia*-Strip se diagnosticaron 4 muestras, mientras que con el examen directo 5 muestras mostraron la presencia de quistes de *G. intestinalis*; quedó demostrado que el método de Ritchie y el examen al fresco son pruebas mas reproducibles.

La prueba antigénica permitió detectar quistes de *Giardia intestinalis* con una baja sensibilidad, lo que indicó que se requiere una alta carga parasitaria para poder arrojar resultados positivos, y una alta especificidad debido a que determinó la negatividad cuando un individuo no presenta quistes del protozooario, ya que solo es específico para esta forma evolutiva del parásito.

El valor predictivo positivo es bajo con un 14% lo cual indica una baja probabilidad de que este resultado refiera una Giardiasis en el paciente cuando realmente posee dicha enfer-

medad y el valor predictivo negativo relativamente alto de 93% lo que indica una alta probabilidad de que este resultado indique la exclusión de enfermedad en el paciente cuando realmente no posee dicha enfermedad.

Al comparar nuestros resultados con los obtenidos en un estudio realizado en muestras provenientes de niños de un hogar de cuidado diario a través de una técnica de Inmunoensayo Enzimático (EIA), se observó diferencias con la técnica de *Giardia* Strip utilizada en el presente estudio, en cuanto a la sensibilidad. El método de EIA resulto ser más sensible (100%) que en el nuestro (66%); en cuanto a la especificidad la técnica EIA mostró resultados un poco más bajos (96,9%) con respecto a nuestro estudio (100%). Cuando comparamos el valor predictivo positivo los resultados fueron más bajos para *Giardia* Strip (14%) que para el EIA (84,6%); el valor predictivo negativo para el método EIA (100%) resultó acercarse a la prueba de *Giardia*-Strip (93%) (15).

En ese sentido otro estudio realizado en Cuba y publicado en 1997 en el que se normalizó un sandwich ELISA para la detección de antígenos de *Giardia* en heces, evidenció que la técnica tuvo una sensibilidad elevada de 94,8% comparada con la nuestra (66%), en cuanto a la especificidad resulto estar muy cercana a la nuestra con un 98,3% (16).

Al aplicar la técnica del examen directo se observó que este posee una alta sensibilidad (83%), lo cual indica que no requiere de

altas cargas parasitarias para poder detectar a este protozoo, siendo a su vez 100% específico, observando así que el examen directo a pesar de ser una prueba sencilla detecta mayor cantidad de elementos parasitarios que la técnica antigénica *Giardia*-Strip. El examen directo posee un valor predictivo positivo de un 100% lo cual indica que una giardiasis siempre puede diagnosticarse a través de la técnica del examen al fresco, y se observa también que posee un elevado valor predictivo negativo, lo que indica que en un 96% cuando no se identifican quistes de *G. intestinalis*, está ausente la infección por este protozoo.

Debido a la poca literatura que pudimos encontrar sobre la sensibilidad y especificidad de las técnicas utilizadas en el diagnóstico de parásitos entéricos, consideraremos los resultados que muestran otros estudios comparativos.

Devera y cols. (17), utilizaron parámetros de comparación Sensibilidad, Especificidad, Eficacia, Valores Predictivos Positivo y Negativo y Coeficiente Kappa de concordancia, aplicados a diferentes formas evolutivas de enteroparásitos, donde se observó que la técnica que ofreció mayor prevalencia de parasitosis intestinal fue la Sedimentación Espontánea con 44,9% (234/521). De acuerdo al tipo de parásito, la SE (Sedimentación Espontánea) fue la mejor, tanto para protozoarios como para helmintos, aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa comparado con las otras técnicas. Esta técnica puede ser usada en la rutina diagnóstica del Laboratorio del Departamento de Parasitología y Microbiología de la Escuela de Ciencias de la Salud, debido a que presentó resultados similares al Examen Directo y a otros métodos de concentración para el diagnóstico de parásitos intestinales

Jiménez y cols. (18), evaluaron la técnica de Ritchie para el diagnóstico de protozoos,

donde se sustituyó el éter por la nafta, se estudiaron muestras de heces y se compararon los resultados obtenidos por el examen directo, estos resultados mostraron la utilidad de la técnica de Ritchie con nafta en el diagnóstico de protozoos; fundamentalmente *Giardia lamblia* con un 18,0% de pacientes diagnosticados positivos con un 11,5% a través del examen directo. A pesar de que la técnica de Ritchie presenta una sustitución en uno de sus componentes, este permite de igual manera evidenciar la recuperación de diferentes elementos parasitarios de forma sensible y específica al ser comparado con otras técnicas

De forma contraria, investigaciones realizadas por Pajuelo y cols. (19), muestran que la técnica de sedimentación espontánea obtuvo mayor rendimiento en el diagnóstico de parásitos intestinales en comparación al examen directo y la técnica de flotación con sulfato de zinc, estos hallazgos confirman la eficiencia del procedimiento de sedimentación sobre esta.

Por todo lo antes expuesto en estudios relacionados con la comparación de técnicas examen directo, se pudo demostrar que la técnica del examen directo es de gran utilidad para la identificación de quistes de *G. intestinalis* ya que es simple, rápida, es conocida por los analistas y requiere de pocos recursos; pero está limitada por la experiencia que pueda tener el observador, lo que resulta una desventaja para este método.

El examen directo presentó una menor sensibilidad en el diagnóstico de *G. intestinalis* comparada con la técnica de concentración de Ritchie; resultado lógico si se tiene en cuenta que este último método difásico está basado en el proceso de sedimentación por centrifugación, concentrando a través de este principio, mayor cantidad de elementos parasitarios en las heces, lo que facilita una mayor recuperación de quistes y como conse-

cuencia optimiza el diagnóstico. Mientras que la prueba rápida de *Giardia*-Strip se basa en una tecnología con oro coloidal, donde se sensibiliza una membrana de nitrocelulosa con anticuerpos específicos frente a los antígenos de membrana del quiste de *Giardia intestinalis*, y es por este principio de la técnica que resulta una limitante para el diagnóstico del parásito ya que solo determina los antígenos de los quistes mientras que los trofozoitos no son detectados; pudiendo arrojar falsos negativos y quedando así demostrado que no es una técnica altamente sensible; mientras que la técnica de Ritchie posee una mayor sensibilidad y especificidad con respecto al examen al Fresco y *Giardia*-Strip.

Conclusion

A través de los resultados obtenidos se puede concluir que la técnica *Giardia*-Strip mostró menor sensibilidad que el examen de heces directo y la técnica de concentración de Ritchie, debido a su baja capacidad de diagnosticar un mayor número de muestras, determinando así que las técnicas de Ritchie y fresco son más sensibles. Cabe pero cabe destacar que la técnica de *Giardia*-Strip también muestra una gran ventaja al ser rápida y específica para quistes de *G. intestinalis*, permitiendo así alternar el diagnóstico de esta parasitosis con el del microscópico que todavía es el método de elección para diagnosticar una Giardiasis. En la actualidad los métodos inmunológicos como la técnica de ELISA, descrita en el presente estudio se utilizan con frecuencia debido a que son rápidos y de lectura fácil, comparados con la microscopía que consume mayor tiempo y necesita gran habilidad del analista.

Agradecimiento:

El presente estudio se realizó gracias a la colaboración que brindaron los docentes, representantes y niños del Centro de Educación Inicial Negra Matea ubicado en la población de Santa Rosa de Agua de la Ciudad de Maracaibo, quienes en todo momento están dispuestos a colaborar con los estudios sobre parasitosis que realiza el personal docente de la Universidad del Zulia.

Referencias bibliográficas

- (1) Chávez, E. Diagnóstico de protozoarios intestinales frecuentes en niños. Rev. Soc. Bol. Ped. 2008; 47:169- 77.
- (2) Molina, N. Epidemiología Molecular *Giardia lamblia* en comunidades urbanas y rurales de Buenos Aires y Mendoza, Argentina. 2009. Disponible en <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2613>. Consultado el 16 de marzo 2013.
- (3) Hómez J., Soto R., Tarazón de Soto S., Méndez, H. y Mármol, P. Parasitología. 11ª Edición. Editorial Universidad del Zulia (EDILUZ). Maracaibo- Venezuela. 2007: 180-181.
- (4) Botero D., Restrepo M. Parasitosis Humanas. 5ª Ed. Medellín, Colombia: Ediciones Corporación para las investigaciones Biológicas. 2005. p. 63- 69.
- (5) Noemi, I. y Atias A. Giardiasis en: Atias, A. y Neghme, A. Parasitología Clínica. 3ª Edición. Santiago- Chile: Publicaciones Técnicas Mediterráneo. 1991: 145-151.
- (6) Stranieri M., Silva I., Molina Y., Monges D., Montenegro L., Morales M., et al. Parasitosis intestinales en alumnos de la Unidad Educativa Carabobo. Belén,

- Municipio Carlos Arvelo. Estado Carabobo. Venezuela. Comunidad y salud 2009; 7:23-28.
- (7) Devera R., Blanco Y., Requena I., Figueras L., y Fuenmayor A. Prevalencia de Coccidios intestinales en niños preescolares de San Félix, Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol. 2010; 30:65-71
- (8) Acurero E., Ávila A., Rangel L., Calchi M., Grimaldos R. y Cotiz M. Protozoarios intestinales en escolares adscritos a instituciones públicas y privadas del municipio Maracaibo-estado Zulia. Ksmera 2013; 4:50-58.
- (9) Cheng, R.; Castellano J. y Villalobos R. Prevalencia de Giardiasis en hogares de cuidado diario en el municipio San Francisco Estado Zulia, Venezuela. Invest. Clín. 2002; 43: 231.
- (10) Maldonado A., Bracho A., Rivero-Rodríguez Z., Atencio T., De Molano N., Acurero E., et al. Enteroparasitosis en niños desnutridos graves de un hospital de la Ciudad de Maracaibo, Venezuela. Ksmera. 2012; 40: 134-145.
- (11) Maldonado A., Rivero-Rodríguez Z., Chourio -Lozano G., Diaz A., Calchi La Corte M., Acurero E., et al. Prevalencia de enteroparásitos y factores ambientales asociados en dos comunidades indígenas del estado Zulia. Ksmera. 2008; 36: 53-66
- (12) Murray P., Baron E., Jorgensen J., Tenover F., Tenover F. Manual Of Microbiology. 8° edición. Vol. 2. Washington, DC: ASM Press; 2003. P. 1998-2000
- (13) Graciela N., Gamboa M, Kozubsky L. Costa, M., Cardozo M. Sisluskas M. et al. Estudio Comparativo de recuperación de formas parasitarias por tres diferentes métodos de enriquecimiento coproparasitológicas. Parasitol Latinoam. 2005; 60: 178-181.
- (14) Melvin D., Brooke M. Métodos de Laboratorio para el diagnóstico de parásitos intestinales. 1ª ed. México. Editorial Interamericana; 1971. p. 198 - 200
- (15) Martín A. M., Rodríguez J., Canut A. y Dovigo C. A. Evaluación de una técnica Inmunoenzimática para la detección en heces de un antígeno de *Giardia intestinalis*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 1999; 10: 39-42.
- (16) Torres D., Fernández M. Brito T., Finlay C. Ensayo Inmunoenzimático en Fase sólida para la detección de antígenos de *Giardia lamblia*. Rev Cubana Med. Trop. 1997; 49: 52-58.
- (17) Devera R., Aponte M., Belandria M., Blanco, Y. y Requena, I. Uso de Métodos de Sedimentación Espontanea en el Diagnóstico de Parásitos Intestinales. 2008. Disponible en: <http://ojs.udo.edu.ve/index.php/saber/article/view/7>. Consultado el 20 de enero 2014.
- (18) Jiménez Padrón M., Hernández Valdés Y. López González M. Wong Jiménez A., Santesteban A., Gispert Muñoz F. Utilización de Técnicas de Ritchie modificada en el diagnóstico de Protozoos. Disponible en <http://ojs.udo.edu.ve/index.php/saber/article/view/7>. Consultado el 25 de enero 2014.
- (19) Pajuelo G., Lujan Roca D., Paredes Pérez B., Tello Casanova, R. Aplicación de la Técnica de Sedimentación Espontanea en tubo para el Diagnóstico de Parásitos Intestinales. Rev. Mex. Patol. Clin. 2006; 53: 114-118.