



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

SUBTIPOS GENÉTICOS DE  
*Blastocystis sp.* Y EL SÍNDROME DE  
INTESTINO IRRITABLE. ESTUDIO DE  
CASOS Y CONTROLES.

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. DIEGO EMILIANO JIMÉNEZ GONZÁLEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ PABLO MARAVILLA  
CAMPILLO.

COMITÉ TUTOR: DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH  
DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA  
LEOPOLDINA DE MARÍA GUADALUPE SOUZA  
SALDIVAR

México, D.F.

Enero, 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 31 de octubre de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **JIMÉNEZ GONZÁLEZ DIEGO EMILIANO** con número de cuenta **98205673**, con la tesis titulada **"SUBTIPOS GENÉTICOS DE *BLASTOCYSTIS SP.* Y EL SÍNDROME DE INTESTINO IRRITABLE. ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES"**, realizada bajo la dirección del: DR. JOSÉ PABLO MARAVILLA CAMPILLO

Presidente: DR. MAX JULIO SCHMULSON WASSERMAN  
Vocal: DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH  
Secretario: DRA. LUISA ISaura FALCÓN ALVAREZ  
Suplente: DRA. CECILIA T. XIMENEZ GARCÍA  
Suplente: DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA DE MARÍA  
GUADALUPE SOUZA SALDIVAR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de enero de 2012

*M. del Coro Arizandi*  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA**

## **Agradecimientos:**

- Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por esta oportunidad de superarme.
  
- Agradezco al proyecto CONACYT 69589  
Por la compra de reactivos, insumos y viáticos para el desarrollo del presente trabajo.
  
- Agradezco a la Beca CONCYT 226880  
Por la manutención de mis estudios.
  
- Agradezco a mi comité tutor por su paciencia, recomendaciones y asistencia durante este tiempo.

Dr. José Pablo Maravilla Campillo.  
Dra. Ana Flisser Steinbruch.  
Dra. Valeria Souza Saldivar.

## **Agradecimientos:**

- Al Dr. Pablo por su amistad, su paciencia, sus consejos, su guía y siempre darme ánimos a seguir, además de su apoyo personal y por las oportunidades que me ha brindado.
- Al Dr. Max por sus observaciones y ayuda con el último empujón.
- A Mirza por jalarme las orejas, sus consejos y supervisión.
- A Arony por los consejos, ayuda y apoyo en todo momento así como por su amistad
- A Cecilia por su relax, su ayuda, su amistad y su forma de ver la vida.
- A la Dra. Ana Flisser por iniciarme en el camino de la investigación, su paciencia, sus críticas siempre constructivas, sus enseñanzas y por las oportunidades que me ha brindado.
- A la Dra. Valeria Souza, por su paciencia, su tiempo, sus consejos, así como el invitarme a estudiar genética de poblaciones, que en verdad es la materia que más me ha gustado y que más trabajo me ha costado.
- A Jaime Gasca por introducirme en la genética de poblaciones y por su forma de ser, quien aunque tal vez no se acuerde de mi, marco mi vida junto con el Dr. Luis Eguiarte, a quien también expreso mi agradecimiento por sus enseñanzas.
- A la Dra. Angélica Olivo, por todo el apoyo que me dio en el laboratorio, así como las porras que me hecho para seguir adelante.
- A la Dra. Guillermina Ávila por todas las facilidades que me dio durante la licenciatura y la maestría, sus consejos y su amistad.
- A Joel por su buen humor, su saber escuchar y sus criticas, además de su ayuda en el laboratorio.
- A Fernando por sus enseñanzas, su paciencia, sus críticas, sus sugerencias y sobre todo por su amistad.
- A Lucia por sus consejos, por darme ánimos y su amistad.
- A mi tío Ale por su apoyo incondicional y todas las cosas que me ha enseñado.
- A Ana el amor de mi vida (y con eso lo digo todo)
- A mis padres por estar siempre conmigo, por ser mis primeros ejemplos en la vida.
- A mis hermanos Abel y Metzi.
- A mis Hijas. Sol que me ilumina en los malos momentos y Hanna que me pone pilas para seguir.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>ANTECEDENTES</b>	3
Biología de <i>Blastocystis hominis</i>	
Taxonomía	3
Morfología	6
Ciclo de vida	8
Epidemiología	10
Patología	13
Tratamiento	16
El Síndrome de Intestino Irritable	16
<b>OBJETIVOS</b>	19
<b>HIPOTESIS</b>	19
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	19
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	20
Diseño experimental	20
Pacientes	20
Criterios de selección	21
Criterios de Inclusión	21
Criterios de exclusión	21
Criterios de eliminación	21
Tamaño de la muestra	21
Consideraciones éticas	22
Estudios de colonoscopia	23
Estudios de laboratorio	23
Extracción de DNA fecal total	23
Diagnóstico de <i>Blastocystis sp.</i>	24
Identificación de los subtipos de <i>Blastocystis sp.</i>	25
Análisis de la SSUrDNA de <i>Blastocystis sp.</i>	26
Análisis de secuencias.	28
Análisis estadístico	28
<b>RESULTADOS</b>	29
Descripción de las poblaciones en estudio	29
Hallazgos colonoscópicos	30
Diagnóstico de <i>Blastocystis sp.</i>	31
Subtipos de <i>Blastocystis sp.</i>	32

Microorganismos identificados	37
<b>DISCUSIÓN</b>	40
<b>CONCLUSIONES</b>	51
<b>ANEXOS</b>	52
Carta de consentimiento informado	52
Secuencias de un fragmento de 560 pb de la SSUrDNA de <i>Blastocystis</i>	53
Secuencias de 310 pb de la SSUrDNA de <i>Blastocystis</i>	54
Secuencias usadas en la reconstrucción filogenética	56
Haplotipos encontrados en la SSUrDNA de <i>Blastocystis sp.</i>	59
Artículos científicos.	60
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	74

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

	<b>Página.</b>
1. Reconstrucción filogenética de <i>Blastocystis hominis</i> (Silberman <i>et al.</i> , 1996).	4
2. Morfología característica de <i>Blastocystis sp.</i> (Tan 2004).	7
3. Ciclo de Vida de <i>Blastocystis sp.</i> (Rangel 2010).	9
4. Subtipos de <i>Blastocystis sp.</i> (Yoshikawa <i>et al.</i> , 2007).	12
5. Diseño experimental.	20
6. Oligonucleótidos usados para la identificación de los subtipos de <i>Blastocystis sp.</i>	26
7. Oligonucleótidos para la confirmación de los subtipos de <i>Blastocystis sp.</i>	27
8. Distribución de frecuencias por edad y sexo en el grupo de casos.	29
9. Distribución de frecuencias por edad y sexo en el grupo control.	30
10. Hallazgos colonoscópicos y alteraciones observadas en el grupo control.	31
11. Integridad de las extracciones de DNA total de origen fecal.	31
12. Amplicón diagnóstico de <i>Blastocystis sp.</i>	32
13. Estandarización de la PCR para los subtipos de <i>Blastocystis sp.</i>	33
14. Amplicón de la SSUrDNA de <i>Blastocystis sp.</i>	34
15. Reconstrucción filogenética de las secuencias mexicanas de <i>Blastocystis sp.</i>	36
16 Frecuencia de microorganismos identificados en pacientes con SII y en los pacientes del grupo control.	38
17. Representación de estructuras poblacionales.	48
<b>Cuadro 1.</b> Subtipos de <i>Blastocystis</i> identificados por PCR.	34
<b>Cuadro 2.</b> Relación de los subtipos de <i>Blastocystis</i> con el SII.	34
<b>Cuadro 3.</b> Búsqueda de relaciones significativas entre algunas variables estudiadas y la presencia de <i>Blastocystis sp.</i>	38
<b>Cuadro 4.</b> Frecuencia de distintos subtipos genéticos de <i>Blastocystis sp.</i> en el mundo.	44

## Subtipos genéticos de *Blastocystis* sp. y el síndrome de intestino irritable. Estudio de casos y controles

### Resumen

*Blastocystis hominis* ha sido definido como comensal ó parasito, sin embargo esto ha estado en discusión los últimos 30 años, ya que se tienen reportes de personas portadoras de este microorganismo con cuadros diarreicos, urticaria, sangre en heces y alteraciones en la frecuencia y forma de sus deposiciones, mientras que en otros *B. hominis* es un hallazgo en estudios coproparasitoscópicos. Asimismo en este tiempo han sido poco claras las especies propuestas del genero *Blastocystis*. En 2007, con la caracterización de los subtipos del género *Blastocystis*, se sugirió referirse a estos organismos como *Blastocystis* sp., y al conocer el subtipo, fue posible clasificarlos, lo que abrió la posibilidad de la existencia de subtipos comensales y subtipos patógenos, los cuales pueden ayudar a resolver el dilema de encontrar en algunas personas a *Blastocystis* sp., como comensal y en otras encontrarlo como parasito. En la última década por estudios de América del norte, Europa y Asia, surgió la posibilidad de que *Blastocystis* sp. sea uno de los agentes causantes del síndrome de intestino irritable (SII). En la presente tesis se analizó el posible papel de *Blastocystis* sp. en el SII, para lo cual se establecieron los siguientes objetivos particulares; 1) Establecer la prevalencia de *Blastocystis* sp. pacientes con SII vs. controles. 2) Identificar los subtipos genéticos de *Blastocystis* sp. presentes en la población mexicana. 3) Identificar otros posibles agentes etiológicos infecciosos del SII en nuestra población.

Inicialmente se contó con la participación de 62 pacientes en el grupo de casos, de los cuales 50 cumplieron con los criterios de inclusión. En el grupo de controles se reclutaron 95 participantes, de los cuales 65 tuvieron todos los criterios de inclusión. La edad promedio de los individuos de ambos grupos (n=115) fue de (media±DE) 49±15.6 años. En el grupo de casos se incluyeron pacientes diagnosticados con SII con los criterios de ROMA III y en quienes se descartó alguna otra patología mediante colonoscopia. El grupo control estuvo conformado por pacientes que presentaron alguna alteración en el tubo digestivo bajo, diferente al SII. Por estudios coproparasitoscópicos se encontró una prevalencia global de *Blastocystis* sp. del 23.5%, 16/50 (32%) de los pacientes con SII y 11/65 (16.9%) de los controles fueron portadores, sin embargo este microorganismo solo mostró una tendencia de asociación con este trastorno ( $p=0.0581$ , OR=2.31, IC=0.956-5.567).

Los estudios moleculares mostraron que los subtipos más comunes de *Blastocystis* sp. fueron el ST1 y ST3, en la mayoría de los casos en co-infección. También se encontró el ST2, que presentó una identidad del 90% con el género *Blastocystis*, las demás secuencias presentaron una identidad superior al 97% con respecto a secuencias encontradas en otros países como Japón, Dinamarca y Estados Unidos. *Blastocystis* fue el parásito más frecuente en el grupo de los casos, mientras que en el grupo control lo fue *Dientamoeba fragilis* seguido de *Blastocystis* sp. Por parte de las bacterias, para ambos grupos fue *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Solo en un paciente del grupo control se identificó un caso de rotavirus y en un paciente con SII se identificó *Salmonella paratyphi* A.

Debido a que el *Blastocystis* sp. solo mostró una tendencia de asociación con el parásito SII, es recomendable ampliar el tamaño de muestra para aclarar ó desechar esta asociación. Debido a que actualmente se desconoce cómo es la estructura genética poblacional de *Blastocystis* sp., considerando los datos obtenidos en la presente tesis y de las secuencias del GenBank, podemos suponer que este parásito puede presentar una estructura clonal con cierto grado de recombinación entre variantes genotípicas cercanas que puedan encontrarse en el ambiente o co-infectando a un mismo individuo.

## Genetic subtypes of *Blastocystis* sp. and irritable bowel syndrome, a case-control study

### Abstract

For the last 30 years ago, the pathogenic character of *Blastocystis hominis* is controversial, because it is found as a parasite in individuals with enteric and cutaneous symptoms but also as commensal organism in healthy and asymptomatic subjects. Besides, its taxonomic status is still under study with scarce unclear species. In 2007, it was proposed to use the *Blastocystis* sp terminology to improve the scientific communication, about this microorganism followed by the genetic subtype; thus, some subtypes were refereed as commensals and others as pathogens. Some studies in North America, Europe and Asia showed to Blastocystis as probable etiologic agent for to develop irritable bowel syndrome (IBS).

The purpose of the present study is to analyze the role of *Blastocystis* in the etiology of irritable bowel syndrome (IBS), following specific aims: 1) to know the prevalence of Blastocystis sp in IBS and controls groups; 2) to identify the genetic subtypes of this microorganism in a Mexican population and 3) to recognize other possible etiological infectious agents in IBS in our population.

Initially we had the participation of 62 patients in the group of cases, of which 50 met the inclusion criteria. In the control group were recruited 95 participants, of whom 65 had all the inclusion criteria. The average age of individuals in both groups (n = 115) was (mean±DE) 49±15.6 years. In the case group included patients diagnosed with IBS with Rome III criteria and excluded other disorders detected by colonoscopy. The control group consisted of patients who had some alteration in the gastrointestinal tract, other than the IBS.

Stool investigations for parasites found an overall prevalence of *Blastocystis* sp. 23.5%, 16/50 (32%) in patients with IBS and 11/65 (16.9%) in controls. Although *Blastocystis* was the most common parasite found in IBS patients, this microorganism only showed a trend of association with these patients (p=0.0581, OR=2.31, IC=0.956-5.567). Molecular studies showed that the main subtypes found were ST1 and ST3 with a high co-infection of these subtypes within participants, while ST2 was found in some patients. All ST showed a high identity regarding to *Blastocystis* Genus (ST2=90%, ST1 and ST3 >97%), similar to other sequences of parasites from Japan, Denmark and United State. *Blastocystis* was more common in the IBS group, while *Dientamoeba fragilis* and after *Blastocystis* were more frequently in the control group. Regarding bacteria found, *Escherichia coli* was identified in >86% of participants; followed in frequency by *Klebsiella* and *Pseudomonas*. Rotavirus was only found in one control and *Salmonella paratyphi A* was identified in one IBS patient.

Because *Blastocystis* sp. only showed a trend of association with the parasite IBS, we recommended to perform studies with a high sample size to confirm or discharge this tendency. The genetic structure in *Blastocystis* sp. is unknown; thus, our clinical and molecular data and sequences reported in the GenBank, let us to hypothesize that this parasite exhibit a clonal structure with scarce genetic recombination within variants or subtypes closer that could be founded in the environment or with co-infection in a same carrier.

## INTRODUCCIÓN

*Blastocystis hominis* es un microorganismo de distribución mundial que afecta a los seres humanos así como a mamíferos, aves, anfibios y marsupiales (Boreham y Stenzel 1993; Stenzel *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1997; Moe *et al.*, 1997; Duda *et al.*, 1998; Yoshikawa *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 2003a; Abe *et al.*, 2003b; Tan 2004; Abe 2004; Noël *et al.*, 2005; Parkar *et al.*, 2007; Parkar *et al.*, 2010). Ha sido difícil clasificar a este microorganismo ya que presenta un gran polimorfismo (su tamaño oscila entre 4 y 200 micras y tiene diferentes formas), además se presenta en una gran variedad de hospederos (Zierdt 1991; Zaman *et al.*, 1997; Tan 2004; Tan y Suresh 2006a; Tan y Suresh 2006b.). Recientemente, con la información sobre la secuencia completa del gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSUrDNA) de *B. hominis*, se ha colocado dentro del reino *Chromista* (Cavalier-Smith., 1998) lo que convierte a *B. hominis* en el único *Chromista* (conocido hasta ahora) que afecta a seres humanos (Windsor *et al.*, 2007).

A pesar de que *B. hominis* fue descrito a principios del siglo XX, sólo se había estudiado extensamente su morfología (Zierdt, 1991) y hasta la última década se han obtenido avances significativos en el conocimiento de su biología (Tan 2008); sin embargo, aún no se ha aclarado su virulencia y su ciclo de vida (Tan 2008), aunque los datos epidemiológicos actuales, así como estudios *in vitro* e *in vivo*, indican que en el género *Blastocystis* hay representantes con potencial patógeno (Garavelli *et al.*, 1991; Carbajal *et al.*, 1997a; Lanuza *et al.*, 1999; Giacometti *et al.*, 1999; Pasqui *et al.*, 2004; Puthia *et al.*, 2005; Puthia *et al.*, 2006; Boorom 2008; Dominguez-Marquez *et al.*, 2009; Yakoob *et al.*, 2010).

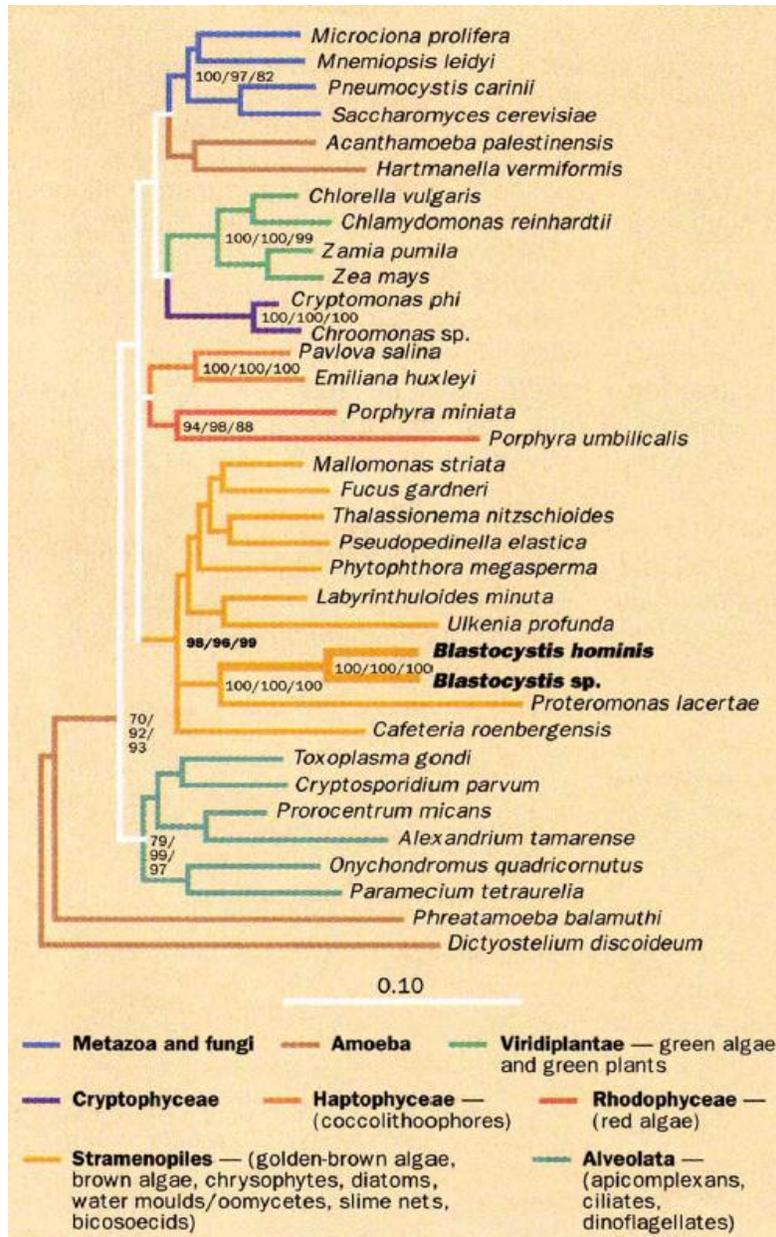
## ANTECEDENTES

### Biología de *Blastocystis hominis*

#### Taxonomía

Durante casi un siglo la clasificación taxonómica de *B. hominis* estuvo en debate, siendo colocado dentro del reino de los hongos y posteriormente clasificado como un protozooario (Silberman *et al.*, 1996). Por otra parte, dentro del Género *Blastocystis*, existe la discusión sobre la diferenciación de especies y el cómo mencionar a sus integrantes, siendo la recomendación más reciente referirse a estos microorganismos como *Blastocystis sp.* (Stensvold *et al.*, 2007a). Al analizar la secuencia del gen de la SSUrDNA de 2 aislados de *Blastocystis* recuperados de muestras humanas, se encontró que este organismo se ubicaba dentro del grupo de los estramenófilos, grupo muy complejo y diverso que se

encuentra representado por organismos unicelulares y pluricelulares, así como organismos fotosintéticos y heterótrofos como se muestra en la Figura 1 (Silberman *et al.*, 1996).



**Figura 1.** Reconstrucción filogenética de *Blastocystis hominis*, en relación a otros eucariontes, con base en el análisis de las secuencias de la SSUrDNA utilizando los métodos de Máxima parsimonia, Neighbour-joining y Máxima verosimilitud, mediante 100 repeticiones. Las cepas de referencia usadas de *Blastocystis* y sus códigos de acceso del GenBank fueron: ATCC 50177 (U51151) y ATCC 50578 (U51152). *B. hominis* se encuentra cercano al estramenófilo heterótrofo, *Proteromonas lacertae* (tomado de Silberman *et al.*, 1996).

Después de analizar la complejidad de los estramenófilos y al realizarse una re-evaluación de la clasificación taxonómica de los 5 reinos, se sugirió la creación de un sistema de clasificación de 6 reinos (Cavalier-Smith 1998; Cavalier Smith 2004), quedando los organismos estramenófilos dentro de un nuevo reino, el *Chromista*, en el que ahora se ubica el grupo de organismos *Heterokonta*, en el que se incluyen organismos unicelulares y pluricelulares, así como heterótrofos y autótrofos.

La ubicación filogenética de *B. hominis* es cercana al flagelado *Proteromonas lacertae*, sin embargo debido a que los estramenófilos se caracterizan por poseer flagelos y *Blastocystis sp.* carece de ellos y es inmóvil, se les ha ubicado en la nueva Clase *Blastocystea*, generándose un orden y una familia para el género *Blastocystis* (Cavalier-Smith 1998; Tan 2004). Quedando la Clasificación taxonómica de *B. hominis* de la siguiente manera:

Reino: Chromista

Subreino: *Chromobiota*

Infrareino: *Heterokonta*

Subphylum: *Opalinata*

Clase: Blastocystea

Orden: Blastocystida

Familia: Blastocystidae

Genero: *Blastocystis*

Especies propuestas: *B. hominis*.

*B. geocheloni*

*B. cycluri*

*B. pythoni*

*B. lapemi*

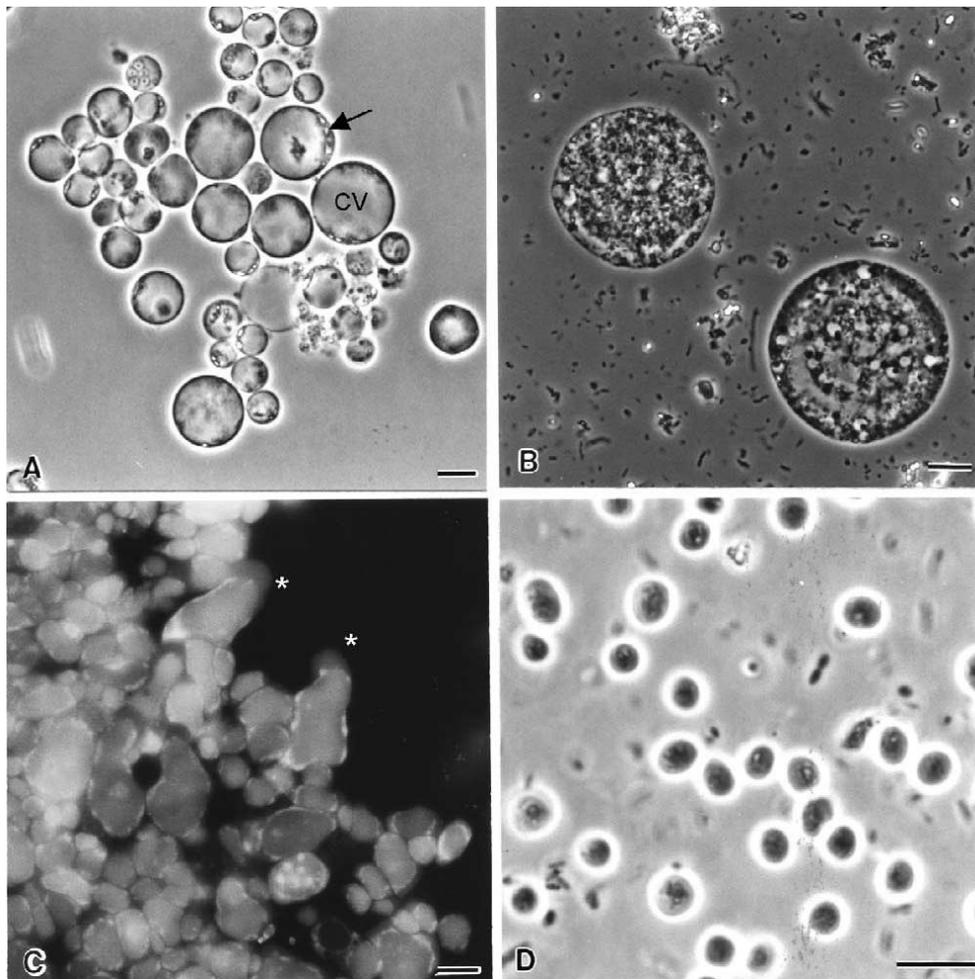
(Cavalier-Smith, 1998; Yoshikawa *et al.*, 2004a)

Se han propuesto más especies dentro del género *Blastocystis* y el nombre de algunas especies se definió respecto al hospedero donde fueron encontradas, sin embargo se ha observado que existen aislados que son capaces de infectar a más de un hospedero, tales son los casos de *B. hominis* y *B. ratti*.

## Morfología

*Blastocystis* sp. presenta grandes polimorfismos; tiene 4 formas principales (Figura 2): la vacuolar (2a), la granular (2b), la ameboidea (2c) y la forma quística (2d). La forma vacuolar, también referida como la forma de cuerpo central ó vacuola central, varía enormemente en su tamaño que va de 2 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro (Leelayoova *et al.*, 2002; Tan, 2008), su característica distintiva es una gran vacuola que ocupa hasta el 90% del volumen celular, que tiene aparentemente una función de almacén, mientras que en el citoplasma periférico se encuentran el núcleo, organelos tipo mitocondrias (con crestas tubulares), aparato de Golgi y retículo endoplásmico (Stenzel y Boreham, 1996; Tan, 2004); la forma vacuolar es la que se observa prácticamente en todos los exámenes coproparasitoscópicos y medios de cultivo (Duda *et al.*, 1998; Leelayoova *et al.*, 2002; Stensvold *et al.*, 2007b; Souppart *et al.*, 2009; Rene *et al.*, 2009). La forma granular presenta un tamaño que va de los 2 a 40  $\mu\text{m}$  y presenta numerosos gránulos en el citoplasma periférico e inclusive dentro de la vacuola central (Tan, 2004). La forma ameboidea se observa solo ocasionalmente en muestras fecales, pero se encuentra comúnmente en cultivos *in vitro*, siendo su descripción morfológica motivo de conflicto y confusión en los reportes (Tan *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Tan y Suresh, 2006a; Tan, 2008); se ha sugerido que es una forma intermediaria entre la forma vacuolar y la quística, y que tiene la capacidad de ingerir bacterias para obtener los requerimientos suficientes para su enquistamiento (Singh *et al.*, 1995; Suresh *et al.*, 2009). Se ha propuesto que la forma ameboidea tiene un papel importante en la patogenia de *Blastocystis*, ya que se encuentra en muestras fecales de portadores con diarrea (Carbajal *et al.*, 1997a; Tan y Suresh, 2006a; Tan y Suresh 2006b; Tan, 2008). La forma quística fue descrita y confirmada entre 1988 y 1999; los quistes son esféricos u ovals y están protegidos por múltiples capas, contienen de 1 a 4 núcleos, así como vacuolas y depósitos de lípidos y glucógeno (Mehlhorn, 1988; Zaman *et al.*, 1997; Moe *et al.*, 1996; Moe *et al.*, 1999). Los quistes miden de 3  $\mu\text{m}$  a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro cuando su hospedero es el ser humano (Tan 2004; Suresh *et al.*, 2005; Tan 2008). Se ha observado que pueden sobrevivir en agua durante 19 días a temperatura ambiente, pero son lábiles al calor y al frío extremo (Moe, *et al.*, 1996). Las formas vacuolar y granular son sensibles a los cambios de temperatura y exposición al aire, por lo que es probable que el estado quístico sea la forma de transmisión de este organismo (Zierdt, 1991; Suresh *et al.*, 2005; Leelayoova *et al.*, 2004; Tan, 2008; Rangel, 2010). Se ha observado que entre el 21% y el 29% de los individuos infectados con *Blastocystis*, excretan quistes, pero no se conoce la distribución de quistes

en heces ni su frecuencia de liberación (Suresh y Smith, 2004; Rene *et al.*, 2009). Menos del 30% de los individuos infectados liberan quistes, lo que puede deberse a que pasan desapercibidos por su tamaño tan pequeño, a que podrían ser expulsados en la materia fecal de manera intermitente, a que los distintos subtipos (ST) de *Blastocystis* podrían tener distintas tasas de producción de quistes, o a la existencia de diferentes grados de resistencia de los quistes de los diferentes subtipos. Todo esto puede influir en la eficiencia del diagnóstico (Stensvold *et al.*, 2007b).



**Figura 2.** Morfología característica de *Blastocystis* sp. (imagen tomada de Tan, 2004). A) La forma de cuerpo central con su característica vacuola que ocupa más del 90% del citoplasma celular, la flecha señala el borde de la vacuola y los núcleos. B) El estadio granular refringe bajo la luz del microscopio óptico. C) La forma ameboidea tiene pseudópodos. D) La forma más pequeña de *Blastocystis* es la quística, probable responsable de su transmisión. La línea de referencia mide 10µm.

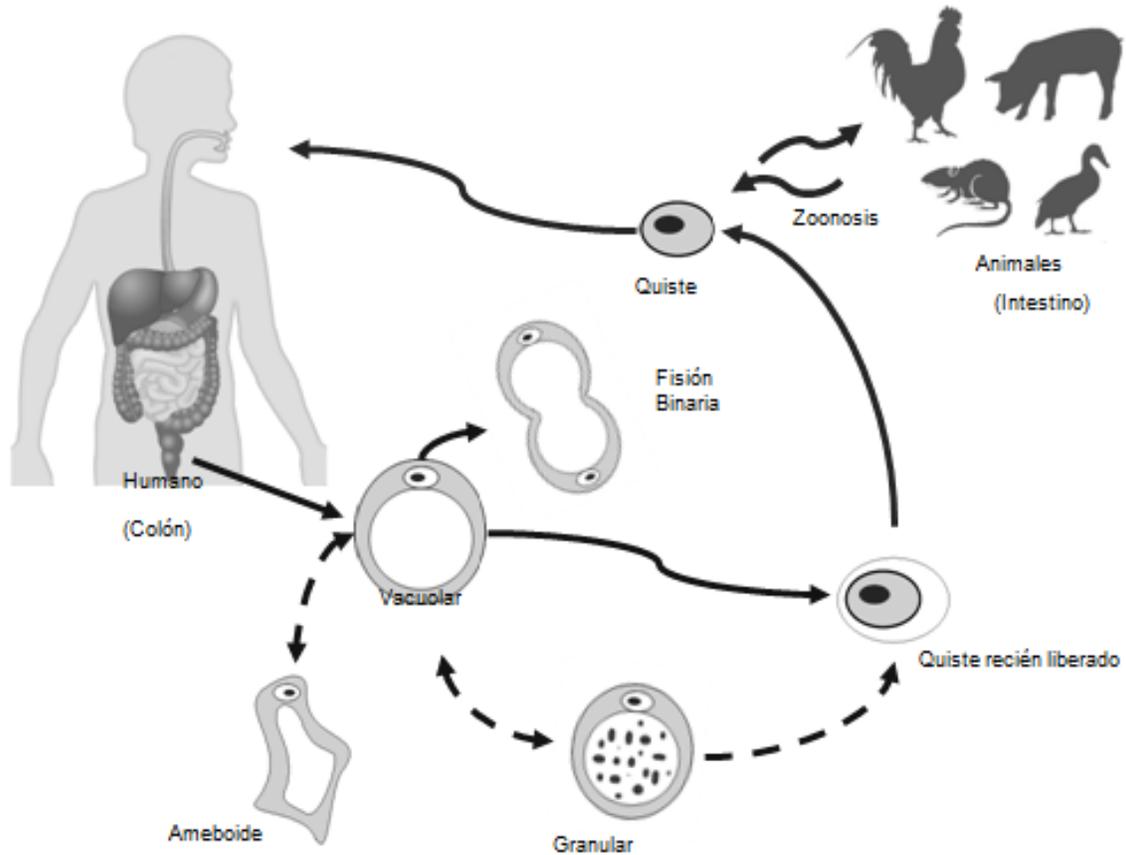
## Ciclo de vida

Se han propuesto diversos ciclos de vida de *Blastocystis* basados en los estadios conocidos en su momento, siendo ampliamente discutidos los temas referentes a su morfología, la secuencia de un estadio a otro y su forma de reproducción. Hace apenas 20 años se describió la forma quística, lo que ha permitido comenzar a dilucidar su ciclo de vida. Tan en el 2008 propone un ciclo de vida en el que considera que existen varios reservorios de *Blastocystis sp.* entre poblaciones de animales y que los humanos son hospederos potenciales de distintos subtipos zoonóticos, esto con base en la evidencia de 9 subtipos genéticos, de los cuales 7 se han encontrado en humanos, además de ser reportados en aves, roedores, cerdos y primates no humanos.

El ciclo de vida de *Blastocystis* se ilustra en la Figura 3: el quiste penetra al tracto digestivo por vía oral-fecal, por el consumo de alimentos ó agua contaminada (Yoshikawa *et al.*, 2004a; Leelayoova *et al.*, 2004; Suresh *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Leelayoova *et al.*, 2008; ), el parásito se desenquista por el contacto con los ácidos gástricos y enzimas intestinales, dando lugar a la forma vacuolar en menos de 24 horas (Moe *et al.*, 1997; Moe *et al.*, 1999; Leelayoova *et al.*, 2004). La forma vacuolar, que es la principal forma diagnóstica y la más relevante en la transición de los diferentes estadios, incrementa su tamaño de 2 a 10 veces (en relación al tamaño del quiste) dependiendo del subtipo y del hospedero, este estadio puede alcanzar un tamaño de 200  $\mu\text{m}$  (Tan, 2008). De la forma vacuolar se deriva la forma granular, sin embargo no se conocen las condiciones que favorecen este cambio, también se ha observado que de la forma granular se puede desarrollar la forma vacuolar. *In vitro* la forma vacuolar es un estado de transición para la forma ameboidea y esta puede desarrollarse hasta la forma quística (Moe *et al.*, 1997). En cuanto a la reproducción, se ha observado que la forma vacuolar se divide por fisión binaria y que del resultado de esta reproducción asexual se generan nuevas formas vacuolares ó formas que derivan en los pre-quistes, que están cubiertos por una espesa capa fibrilar, formando así los quistes que finalmente se depositan y expulsan en las heces (Zaman *et al.*, 1997; Tan 2008).

Se considera que los factores ambientales adversos son los que favorecen el desarrollo de los quistes, ya que estos se pueden formar a partir de las formas vacuolares, granulares o ameboideas (Tan 2008). Se ha observado menor concentración de quistes en muestras frescas que en muestras almacenadas, lo que sugiere que estados de estrés desencadenan su formación, sin embargo la viabilidad de los quistes disminuye después de dos días, aunque se encuentran quistes viables de *Blastocystis* hasta después de 19

días de ser expuestos al medio ambiente, si están en un medio acuoso (Moe *et al.*, 1996). Los quistes viables en agua ó alimentos pueden infectar a un nuevo hospedero y comenzar de nuevo el ciclo (Suresh. *et al.*, 1994; Zaman *et al.*, 1997; Moe *et al.*, 1997; Yoshikawa *et al.*, 2004a; Leelayoova *et al.*, 2008; Tan, 2008).



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Blastocystis sp.* (cortesía de la Biol. Cecilia Rangel, Departamento de ecología de agentes patógenos del Hospital general Dr. Manuel Gea González.). Después de la ingesta del quiste, se forma el estadio vacuolar en el tracto digestivo del hospedero el cual se reproduce por fisión binaria y se presentan transiciones con las formas granular y ameboide (como la transición de una forma a otra no está bien comprendida, se representa con líneas punteadas). El enquistamiento ocurre al final del tracto intestinal, los cuales se liberan en las heces al medio ambiente, los quistes recién liberados presentan una capa fibrilar que gradualmente se pierde. Por el ciclo de vida de *Blastocystis* es posible concluir que se trata de una zoonosis, ya que se han encontrado quistes de *B. hominis* en roedores, animales domésticos y de granja.

## **Epidemiología.**

A escala mundial se ha llegado a considerar que *Blastocystis* es el eucarionte intestinal más común (Thathaisong *et al.*, 2003; Boorom 2007; Windsor 2007), presentando una mayor prevalencia en países en vías de desarrollo y zonas tropicales pobres, en donde se ha documentado una frecuencia de hasta el 60% en Indonesia (Pegelow *et al.*, 1997), mientras que en países desarrollados como E.U., se ha encontrado un comportamiento estacional y una prevalencia del 10% (Amin, 2006).

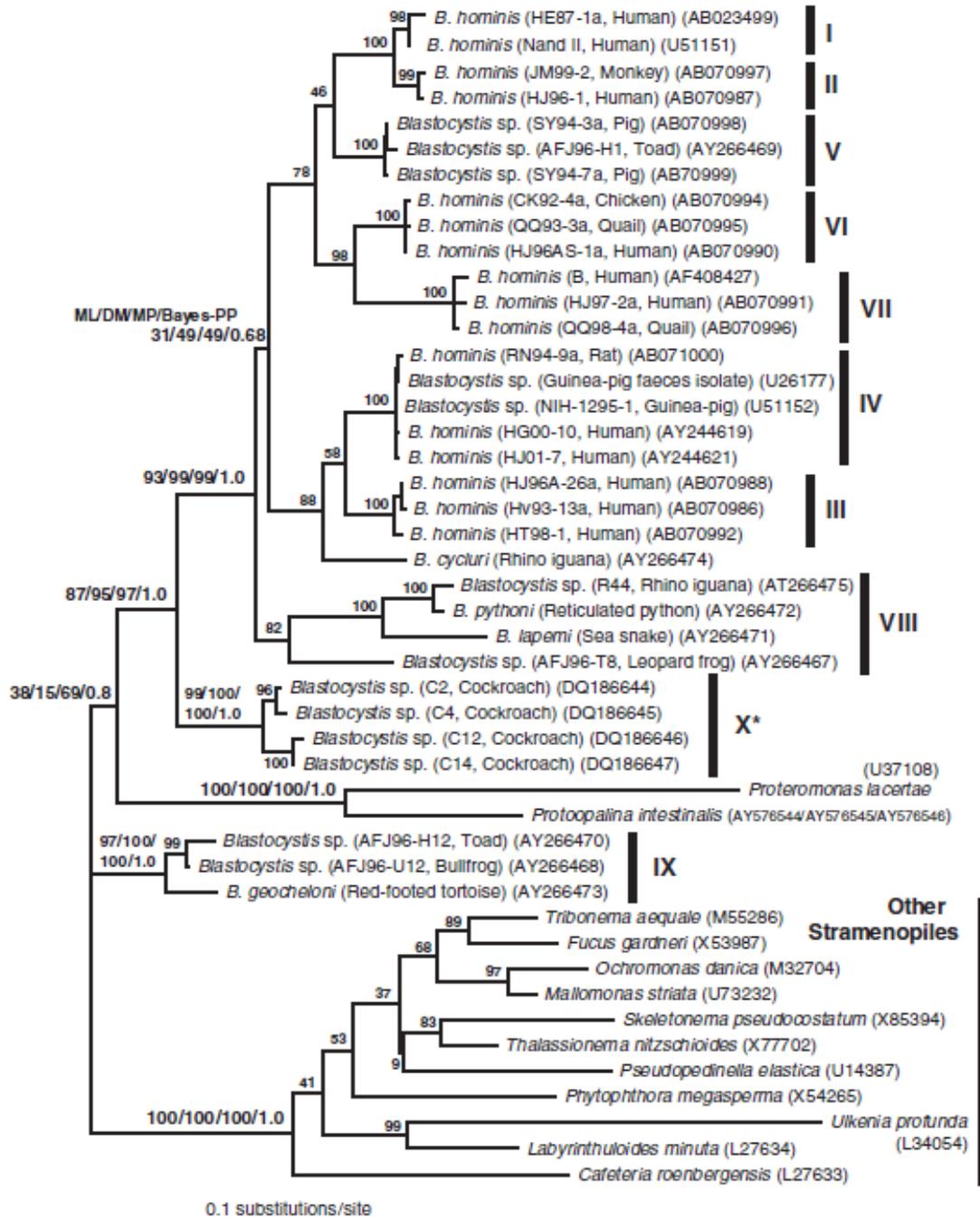
En México, la información que se tiene sobre *Blastocystis sp.* es limitada en los aspectos clínicos, epidemiológicos e inexistentes en cuanto a la identificación de sus subtipos genéticos, por lo que se desconoce su comportamiento y distribución en las distintas regiones de nuestro país, no obstante se ha incrementado el número de personas que son diagnosticadas como portadores de este microorganismo. Estudios coprológicos realizados en México en niños residentes de zonas urbanas mostraron una prevalencia del 3% al 7% (Diaz *et al.*, 2003), mientras que en comerciantes de alimentos de mercados establecidos en la delegación de Xochimilco, (zona conurbada del Distrito Federal), se encontró una prevalencia del 42% (Cruz-Licea 2003). En el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, por examen coproparasitoscópico, *Blastocystis sp.* presentó durante el 2008 una prevalencia del 14% (comunicación personal con la QC. Sara Arroyo, responsable del laboratorio clínico).

Desde los años 90's se observó que *Blastocystis sp.* era un organismo que se presentaba con una alta frecuencia y en un amplio intervalo de hospederos, describiéndose en primates, ungulados, gatos, perros, cerdos, roedores, pájaros, aves de corral, reptiles, anfibios e incluso insectos como la cucaracha (Teow *et al.*, 1992; Stenzel *et al.*, 1994; Yoshikawa *et al.*, 1996; Duda *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999, Abe *et al.*, 2003a; Abe *et al.*, 2003b; Thathaisong *et al.*, 2003; Yoshikawa *et al.*, 2004b; Yoshikawa *et al.*, 2007), además del hombre (Boreham y Stenzel, 1993). En los últimos años diversos trabajos ponen de manifiesto la existencia de variaciones entre aislados compartidos entre el humano y otros hospederos animales. La descripción de diferentes perfiles proteicos, cariotipos, zimodemos y secuencias, constituyen pruebas de la posible existencia de poblaciones morfológicamente idénticas con una amplia heterogeneidad genética (Tan 2008).

Yoshikawa *et al.* (1996), mediante el uso de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) señalaron la posibilidad de que esta parasitosis fuera una zoonosis, al demostrar la existencia de variaciones entre aislados de *Blastocystis* procedentes de diferentes

hospederos de un mismo o de diferente género y la semejanza entre los aislados de aves y humanos. Thathaisong *et al.*, (2003) observaron la existencia de variantes genéticas idénticas en humanos como en animales de granja (cerdos y caballos). La transmisión interhumana se fortaleció en un estudio realizado por Yoshikawa *et al.* (2000) en el que se compararon los genomas de aislados procedentes de dos centros de salud y observaron que el intercambio entre humanos venía acompañado de un intercambio de variantes genéticas, por lo que consideraron la infección por *B. hominis* como una antroponosis. Clark en 1997 analizó la secuencia de la SSUrDNA de 30 aislados de *Blastocystis* seleccionados aleatoriamente usando el análisis por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) con 11 enzimas de restricción tras la amplificación por PCR (Polimerase Chain Reaction). El dendograma obtenido mostró la existencia de siete ribodemos repartidos en dos líneas principales, entre las que la divergencia era del 7%. Arisue *et al.* (2003), compararon las secuencias de la SSUrDNA de aislados de *Blastocystis* de origen humano y animal, destacando que gracias al análisis de la secuencia del DNA, se obtuvo una clara divergencia entre los aislados, aunque algunos aislados eran compartidos entre humanos y animales.

Stensvold *et al.*, (2007a) realizaron un consenso para la terminología de las diferentes variantes de *B. hominis*. Debido a que diferentes aislados de distintos hospederos eran semejantes, notando la existencia de una correspondencia entre los múltiples grupos, ribodemos, subtipos y clados propuestos para las variantes encontradas en los diferentes estudios que se hicieron con la SSUrDNA (Noel *et al.*, 2005, Yoshikawa *et al.*, 2000, Arisue *et al.*, 2003, Yoshikawa *et al.*, 2003, Abe *et al.*, 2003). Así se estableció la existencia de 9 subtipos mundiales, siendo que cada subtipo ha sido reportado por lo menos dos veces en estudios diferentes (Figura 4), aunque cabe mencionar la existencia de subtipos autóctonos, que solo han sido descritos de manera aislada, como los encontrados en China por Li *et al.*, 2007 y el subtipo 10 (también nombrado con el número romano X), que fue encontrado en cucarachas (Yoshikawa *et al.*, 2007) en un estudio posterior a la terminología planteada por Stensvold y colaboradores en 2007. A partir de este consenso se recomendó referirse a los diferentes aislados encontrados en humanos, aves, mamíferos y reptiles como *Blastocystis sp.* y si se conoce el subtipo, debe ser mencionado, ya que por el momento solo se cuentan con datos genéticos de la SSUrDNA de distintos aislados, quedando aún por definir de manera clara la nomenclatura de este género.



**Figura 4.** Subtipos de *Blastocystis sp.* (Imagen tomada de Yoshikawa *et al.*, 2007). Se incluyen secuencias de *B. hominis*, *B. pythoni*, *B. lapemi*, *B. cycluri*, *B. geocheloni* y de aislados de *Blastocystis* de distintos hospederos (humano, simio, gallina, cerdo, iguana, pitón, serpiente marina, rata, tortuga y rana). El marcador usado es un fragmento de la SSUrDNA. Se usó como grupo externo a *Proteromonas lacertae*, además de otros estramenófilos. Para la reconstrucción filogenética se usó Máxima verosimilitud, Máxima parsimonia, un análisis de Probabilidad posterior y un análisis Bayesiano. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap*.

Si los aislados obtenidos en diferentes especies fueran especies distintas, no serían *B. hominis*, sin embargo los aislados de diferentes hospederos (considerados anteriormente como especies) se encuentran representados dentro de los nueve clados (agrupaciones) del género *Blastocystis*, por lo que se considera ya no referirse a especies dentro de este género, si no a *Blastocystis sp.* Actualmente se ha comenzado a esclarecer la abundancia y distribución de los distintos subtipos en el mundo, lo cual ayudará a esclarecer la existencia de posibles variantes patógenas. En Asia y Europa los subtipos más frecuentes son el ST1 y ST3 (Yoshikawa *et al.*, 2004b; Stensvold *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2008, Leelayoova *et al.*, 2008; Souppart *et al.*, 2009). Sin embargo en España, Dominguez-Marquez *et al.* (2009) observaron el ST 4 con una frecuencia del 94%, siendo que esta variante además de humanos solo se ha observado en roedores, por lo que se le ha propuesto como una especie diferente: *Blastocystis ratti* (Chen *et al.*, 1997).

Aún falta por analizar la genética poblacional, la afinidad por un hospedero, tipo de reproducción (asexual y/o sexual), la existencia de alguna afección particular en los humanos y la filogenia de este organismo con base en otros marcadores moleculares, para considerar si la distancia genética es suficiente y constante entre los distintos marcadores genéticos para considerar a las variantes existentes como especies distintas ó solo variantes de una misma especie.

## **Patología**

La participación de *Blastocystis sp.* como patógeno para el ser humano se encuentra en debate, existen artículos que lo refieren como un parásito que genera daño y otros que lo refieren como comensal, esto se debe a que se han documentado tanto casos de portadores asintomáticos, como de enfermos sintomáticos, en algunos de los cuales al erradicar a este organismo se elimina el malestar (Doyle *et al.*, 1990; Zierdt *et al.*, 1991; Stenzel y Boreham 1996; Carbajal *et al.*, 1997a; Giacometti *et al.*, 1999; Yakoob *et al.*, 2004; Pasqui *et al.*, 2004; Valsecchi *et al.*, 2004; Rossignol *et al.*, 2005; Boorum 2007; Kaya *et al.*, 2007; Katsarou-katsari *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2008; Dominguez-Marquez *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009). Llama la atención que a pesar del conocimiento de este microorganismo desde principios del siglo XX, es tan solo después de la década de los 80's que se empezaron a identificar personas que presentaron diversos malestares y, que al eliminar a *Blastocystis*, en muchas ocasiones se mitigan (Boorum, 2007). Es importante

aclarar que debido al papel tan controversial de este microorganismo y a la amplia variedad de manifestaciones clínicas a las que se le ha asociado, se ha sugerido la existencia de variantes comensales, de las que recientemente han surgido variantes patógenas, las cuales se enfrentan a hospederos que presentan cierto grado de inmunidad, por tener contacto previo con las formas comensales (Yoshikawa *et al.*, 2003; Arisue *et al.*, 2003; Boorom 2007).

En la última década se ha acumulado evidencia epidemiológica y de estudios *in vivo* e *in vitro* que sugieren el potencial patógeno de este parásito (Tan, 2008). Entre las características clínicas no específicas que se le han relacionado a *Blastocystis sp.* se encuentran: náusea, anorexia, dolor y distensión abdominal, flatulencia y diarrea crónica ó aguda, cambio en la frecuencia de las deposiciones, siendo el dolor abdominal y la diarrea los padecimientos más frecuentes, aunque en muchos casos estos síntomas eventualmente se auto-limitan (Tan, 2004). También se le han atribuido a este microorganismo síntomas alérgicos y cutáneos (Giacometti *et al.*, 2003; Valsecchi *et al.*, 2004; Katsarou-Katsari *et al.*, 2008). Un estudio reciente reveló que la presencia de urticaria aguda se asoció con la forma ameboides del ST3 de *Blastocystis* (Katsarou-Katsari *et al.*, 2008). Otro estudio realizado en 388 pacientes italianos con trastornos abdominales, mostró que 81 de ellos presentaron Síndrome de Colon Irritable, nombre con el que anteriormente se designaba al Síndrome de Intestino Irritable (SII) y de estos, 38 presentaron *Blastocystis* en sus heces (Giacometti *et al.*, 1999). Asimismo, un estudio comparativo entre 95 pacientes paquistaníes con SII, acordes a los criterios de Roma II y 55 testigos (pacientes con episodios recientes de diarrea, pérdida de apetito, fiebre y malestar abdominal), mostró que el 32% de los casos fueron positivos para *Blastocystis sp.*, mientras que solo el 7% de los testigos fueron positivos para este parásito (Yakoob *et al.*, 2004).

Por otra parte, un estudio de casos y controles enfocado a estudiar la asociación entre hallazgos endoscópicos (mediante endoscopia gastrointestinal superior y sigmoidoscopia) y características clínicas de adultos saludables portadores y no portadores de *Blastocystis sp.* en Taiwán, no mostró una asociación estadística entre los hallazgos patológicos durante el análisis endoscópico y la presencia del microorganismo (Chen *et al.*, 2003).

Recientemente se propusieron algunos determinantes y mecanismos relativos a la patogenicidad de *Blastocystis* (Stensvold *et al.*, 2009). Los determinantes de patogenicidad son: 1) Abundancia de parásitos: la presencia de 5 microorganismos por campo observados a 40X ó 100X se ha asociado a la presentación aguda de síntomas

gastrointestinales (Kain *et al.*, 1987; Tan, 2008). 2) Estado inmune de los individuos parasitados; los individuos inmunocomprometidos muestran manifestaciones clínicas más severas (Cirioni *et al.*, 1999; Stensvold *et al.*, 2009). 3) Variantes genéticas del parásito: la literatura indica que los subtipos más frecuentes en pacientes sintomáticos son los ST1 y ST3 (Yan *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2009), mientras que el ST2 fue el más frecuente en individuos asintomáticos (Dogruman-AI, *et al.*, 2008). 4) Intervención del tratamiento: varios estudios han mostrado una reducción de los síntomas ante el tratamiento antiparasitario en portadores de *Blastocystis sp.* (Tan, 2008). Por otra parte, los mecanismos de patogenicidad propuestos para *Blastocystis* son: 1) Inducción de reacciones alérgicas: se ha propuesto que las reacciones alérgicas cutáneas podrían ser causadas por ciertos antígenos del parásito capaces de promover interleucina (IL) 3, IL-4, IL-5 o IL-13 e inducir la liberación de IgE como una respuesta tipo Th2 (Garavelli *et al.*, 1991; Tan, 2008). 2) Degradación de IgA secretoria por acción de proteasas: aunque el papel de la IgA en la defensa del hospedero frente a la infección por *Blastocystis sp.* es desconocida, se ha documentado la degradación de estas inmunoglobulinas secretoras en sobrenadantes y extractos crudos de *B. ratti* (*Blastocystis sp.* ST4) por medio de proteasas de cisteína, las cuales se han localizado en la vacuola central de aislados zoonóticos (Puthia *et al.*, 2005). 3) Cambios en la permeabilidad epitelial por la inducción de apoptosis en las células intestinales del hospedero, ruptura y alteración de la función de la barrera epitelial: se observó que durante el cultivo de líneas celulares epiteliales IEC-6 con *Blastocystis sp.* se indujo apoptosis de manera independiente al contacto con las células, así como la presentación de re-arreglos en la distribución de F-actina, disminución de la resistencia transepitelial e incremento en la permeabilidad epitelial (Puthia *et al.*, 2006). 4) Modulación de la respuesta inmune e inducción de citocinas de células epiteliales colónicas: también se ha demostrado *in vitro* que *Blastocystis* induce la producción de la interleucina proinflamatoria IL-8 después de 24 horas de co-cultivo con la línea celular de intestino HT-29, por medio de la activación del factor nuclear  $\kappa$ B, mientras que a tiempos cortos (menores de 6 horas), no se encontró ningún incremento de esta interleucina, por lo que se ha especulado que el microorganismo podría influir en la modulación de la respuesta inmune (Puthia *et al.*, 2008).

Por lo anterior, se ha propuesto que debido a que *Blastocystis sp.* no es un organismo invasivo, los productos secretados por el parásito (como las proteasas de cisteína) podrían iniciar el proceso inflamatorio por la activación de receptores en la superficie celular, así como ejercer una serie de daños en las células del hospedero, resultando en

efectos citopáticos, ruptura y alteración de la barrera epitelial enterocítica y en la producción de citocinas proinflamatorias (Tan *et al.*, 2008).

## **Tratamiento**

Recientemente, Tan (2008) concluyó que es equivocada la necesidad de dar tratamiento antiparasitario a todos los portadores de *Blastocystis sp.* debido a lo controversial que resulta la patogenia de este microorganismo y a la aparente naturaleza auto-limitante de los síntomas que provoca este parásito. Existe un consenso sobre *Blastocystis sp.* como causa de enfermedad cuando se confirma la ausencia de cualquier otro patógeno conocido (viral, bacteriano, fúngico ó parasitario) y aparece en número elevado en las heces (>5 formas en un campo de 40x) situación, ante la cual se recomienda tratamiento Zierdt (1991) y Carbajal *et al.*, (1997).

El metronidazol ha sido el fármaco más frecuentemente empleado, con dosis de 250 a 750 mg, tres veces al día, durante 10 días (Moghaddam *et al.*, 2005, Nigro *et al.*, 2003). También se ha documentado el empleo de trimetropin-sulfametoxazol con un esquema de 320 mg de trimetropin y 1,600 mg de sulfametoxazol dos veces al día, durante 7 días (Ok *et al.*, 1999). Asimismo, se ha empleado la Nitazoxanida, 500 mg dos veces al día, durante 3 días (Rossignol *et al.*, 2005). Otros tratamientos empleados han sido la paromomicina (25 mg/kg de peso, tres veces al día durante 10 días) y con la combinación paromomicina (1000 mg dos veces al día durante 10 días) y metronidazol (750 mg tres veces al día durante 10 días) (Pasqui *et al.*, 2004; Valsecchi *et al.*, 2004).

## **EL SÍNDROME DE INTESTINO IRRITABLE**

Un síndrome es un grupo de síntomas y signos, que concurren en tiempo y forma, y con variadas causas ó etiologías. El SII es un trastorno funcional gastrointestinal que se caracteriza clínicamente por la asociación de dolor o molestia abdominal y alteraciones en el hábito de defecación (diarrea, estreñimiento o mixto) (Camilleri *et al.*, 2002; Longstreth *et al.*, 2006), que detrimentan en gran medida la calidad de vida de las personas que padecen SII (Longstreth *et al.*, 2006). El SII se presenta entre el 10 y el 20% de los adultos y adolescentes de todo el mundo (Longstreth *et al.*, 2006), la mayoría de los estudios demuestran una mayor prevalencia en el género femenino que en el masculino independiente de los criterios diagnóstico utilizados (Camilleri *et al.*, 2002).

Es habitual que los pacientes con SII refieran síntomas propios de otros trastornos funcionales, tanto digestivos como extra digestivos. De hecho, aproximadamente la mitad de los casos de SII sufren dispepsia funcional (trastorno funcional del estómago y del duodeno) concomitante (Balboa *et al.*, 2006), y es frecuente la asociación con fibromialgia (trastornos musculoesqueléticos, que se caracterizan por una fatiga extrema y percepción del dolor persistente), síndrome de fatiga crónica (enfermedad neurológica que se caracteriza por causar una debilidad severa, fiebre, sueño no reparador, intolerancia a la luz, al sonido y a los cambios de temperatura, dolor muscular y en las articulaciones, sensibilidades químicas múltiples, sensibilidad electromagnética y a otros factores ambientales, sensación de estado gripal permanente), cistitis intersticial (enfermedad crónica que afecta la vejiga, caracterizada por la necesidad urgente de orinar) y cefalea tensional (dolor de cabeza en la parte superior de la cabeza) (Aaron y Buchwald 2001).

Para la identificación del SII se han llegado a consensos entre expertos mundiales en Gastroenterología para establecer criterios diagnósticos entre los que destacan los criterios de Manning, Roma I, Roma II y los más recientes criterios de Roma III.

En los criterios de Roma III, se estableció que las personas con SII presentan dolor o molestia abdominal recurrente al menos 3 días al mes en los últimos 3 meses asociado a dos o más de los siguientes síntomas:

- i) Alivio con la defecación.
- ii) Cambio en la frecuencia de las deposiciones.
- iii) Cambio en la consistencia de las deposiciones.

Adicionalmente los síntomas deben haber comenzado un mínimo de 6 meses antes del diagnóstico (Longstreth *et al.*, 2006).

Los trastornos funcionales digestivos se agrupan de acuerdo con el órgano blanco comprometido y el SII se engloba dentro de los trastornos funcionales del intestino. Su etiología es multifactorial y se han postulado alteraciones de la motilidad, de la sensibilidad visceral, además de ser desencadenado por el estrés, intolerancia a algún alimento (ó alimentos) y alteraciones en el sistema nervioso como estrés psicológico (Camilleri *et al.*, 2002).

Entre las teorías sobre cómo se podría producir un cambio en la sensibilidad visceral en los pacientes con SII se ha propuesto una posible alteración en los receptores nociceptivos (los cuales deben de ser capaces de detectar diferentes tipos de estímulos nocivos; físicos, químicos y térmicos) de la mucosa intestinal debida a la inflamación de la

pared intestinal (Bercik *et al.*, 2005), es decir una alteración en la percepción del dolor (siendo subjetiva su interpretación como malestar). Se ha observado también un aumento de los linfocitos intraepiteliales y de los mastocitos en el intestino de los pacientes con SII (Mearin *et al.*, 2007; Camilleri *et al.*, 2002); la microinflamación podría ser el origen de una hipersensibilidad de las terminales nerviosas de la pared intestinal contribuyendo a inducir y/o perpetuar los síntomas (Adam *et al.*, 2006), percibidos como un malestar repetido y prolongado.

El SII ocasiona de 2.4 a 3.5 millones de visitas al médico en los Estados Unidos, siendo el diagnóstico más común a finales del siglo pasado de la consulta gastroenterológica de ese país, (con una frecuencia del 28%, Fullerton, 1998). En cuanto a los costos económicos directos e indirectos del SII en los 8 países más industrializados del mundo se ha calculado que era de \$ 41,000'000,000 de dólares, hace aproximadamente 10 años (Camilleri *et al.*, 2002; Fullerton, 1998).

En nuestro país se ha estimado que el 16% de los sujetos en población abierta y hasta el 35% en voluntarios, padecen SII según los criterios de Roma II (Schmulson *et al.*, 2006), el último estudio realizado con estos criterios en la población mexicana indica que el SII representa el 16% de los trastornos gastrointestinales funcionales, con un intervalo de confianza del 12.9%-19.5% (López-Colombo *et al.*, 2012).

Aunque la fisiopatología del SII permanece incierta, algunas publicaciones describen que la gastroenteritis infecciosa es un factor determinante para desarrollar esta enfermedad (Gwee *et al.*, 1999) y se ha asociado la presencia de algunos agentes infecciosos a este síndrome tales como: *Campylobacter*, *Salmonella*, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Blastocystis hominis* y *Trichinella* (Gómez-Escudero *et al.*, 2003; Stark *et al.*, 2007; Yakoob *et al.*, 2010). También se ha observado que la gastroenteritis bacteriana, puede resultar en el SII, llamado SII Post-infeccioso (SII PI), ya que las secuelas de estas infecciones pueden prolongarse por varios meses, posiblemente alterando el sistema inmune y el sistema nervioso entérico, los cuales juegan un papel muy importante en el desarrollo del SII PI (Neal *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004).

También es importante resaltar el papel de los polimorfismos en los promotores de las citocinas proinflamatorias, ya que se encontraron algunos en polimorfismos genéticos de las interleucinas IL-4, IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$  asociados al desarrollo de SII en pacientes irlandeses e iraníes (Van der Veek *et al.*, 2005; Barkhordari *et al.*, 2010a, 2010b).

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar la participación del genero *Blastocystis* en el Síndrome de Intestino Irritable, por medio de un estudio de casos y controles.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Establecer la prevalencia de *Blastocystis* en pacientes con SII y controles negativos a los criterios de SII, mediante el uso de una técnica molecular de diagnóstico.
- 2) Identificar los subtipos genéticos de *Blastocystis* presentes en pacientes con SII y controles negativos a los criterios de SII, así como su posible asociación con algún trastorno gastrointestinal.
- 3) Estudiar a otros posibles agentes infecciosos etiológicos del SII, previa confirmación del diagnóstico mediante estudios de colonoscopia, exámenes coproparasitológicos, coprocultivo y búsqueda de rotavirus-adenovirus.

## **HIPÓTESIS**

Si en los pacientes con SII se encuentra una frecuencia particularmente incrementada de *Blastocystis sp.*, ó la de alguno de sus subtipos en comparación con el grupo control, entonces es posible que la presencia de este parásito sea un factor de riesgo para desarrollar SII.

## **JUSTIFICACIÓN**

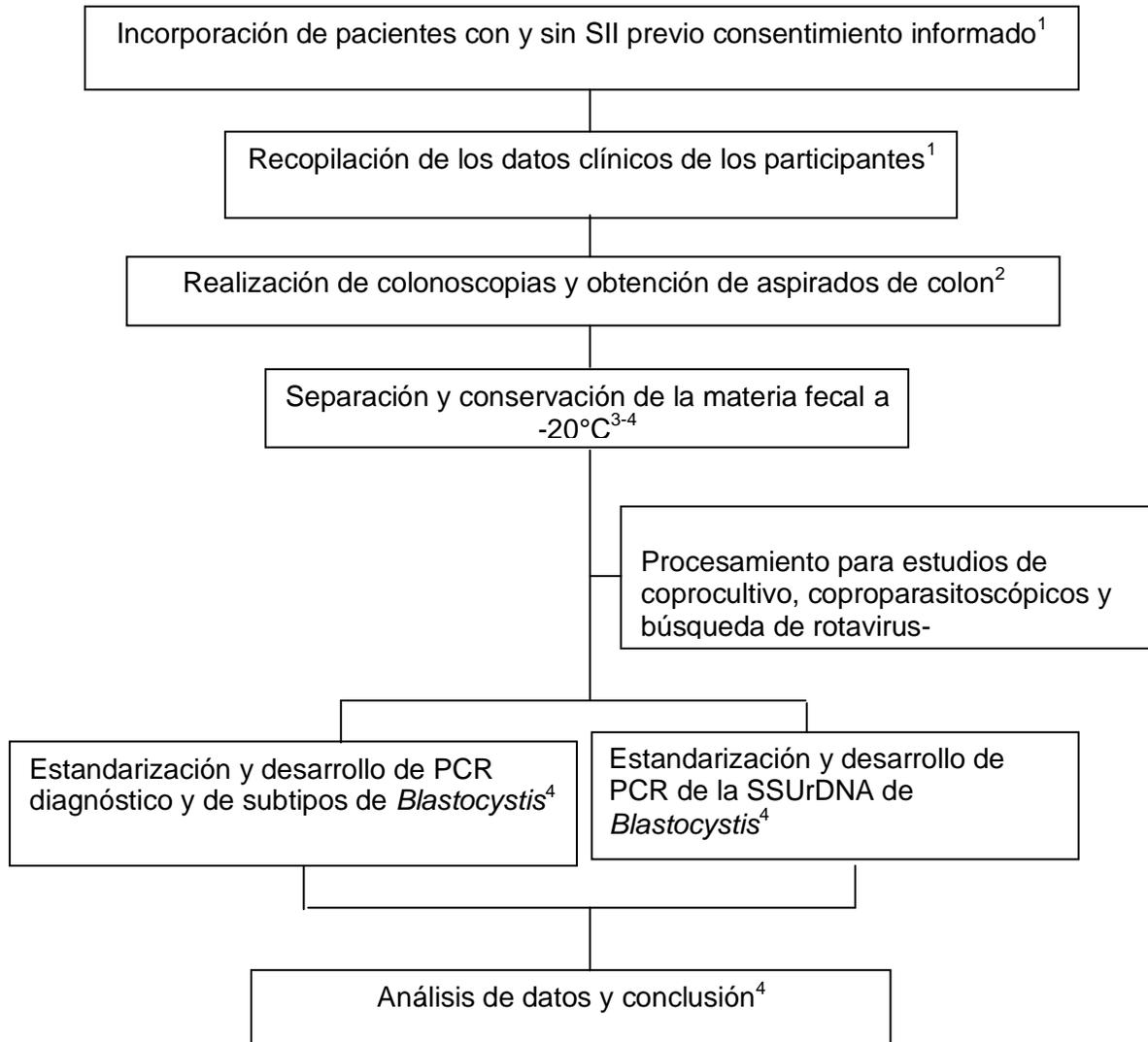
Hasta la fecha no es claro el papel patógeno de *Blastocystis* ni se ha encontrado una asociación determinante entre los síntomas clínicos de los portadores sintomáticos de este microorganismo, por lo que al concluir el presente estudio, se aclararán aspectos básicos sobre su prevalencia y comportamiento patogénico, particularmente en pacientes con SII.

Por otra parte, la identificación de otros posibles patógenos como agentes etiológicos del SII, permitirá reforzar o redirigir el planteamiento de intervenciones terapéuticas encaminadas a la eliminación de los microorganismos responsables y coadyuvar al control del SII en la población mexicana.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Diseño experimental

Estudio de casos y controles, pareado, abierto, observacional y prospectivo, cuyos procesos se esquematizan en la Figura 5.



**Figura 5.** Diagrama de flujo en el que se muestran los principales procesos del desarrollo experimental. <sup>1</sup>En el servicio de Gastroenterología de la Consulta Externa. <sup>2</sup>En el Servicio de Endoscopia. <sup>3</sup>En el Laboratorio Clínico <sup>4</sup>en la Subdirección de Investigación. Todos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

### Pacientes

De febrero de 2008 a enero de 2010, se invitó a pacientes con SII y con otras alteraciones del tubo digestivo, a participar en el presente estudio, bajo los siguientes criterios.

### **Criterios de selección**

Hombres y mujeres de más de 18 años, cuyo hogar de residencia por más de 1 año fuera el Distrito Federal. Para conformar el grupo de casos, se consideró a aquellos pacientes que clínicamente presentaron SII bajo los principios de Roma III, los cuales establecen la presencia de malestar ó dolor abdominal al menos 3 días por mes, en los últimos 3 meses con 2 de las siguientes características: i) alivio con la defecación, ii) cambio en la frecuencia de las deposiciones, iii) cambio en la consistencia ó forma de las heces (Longstreth *et al.*, 2006). Asimismo, para la conformación del grupo control se consideró a aquellos pacientes que clínicamente presentaron alguna otra alteración gastrointestinal del tubo digestivo diferente al SII.

### **Criterios de Inclusión**

Pacientes interesados en participar que hubieran cumplido los criterios de selección, firmado su carta de consentimiento informado y se hubieran sometido a un estudio colonoscópico para descartar causas orgánicas que pudieran manifestarse con síntomas similares al SII. Asimismo, los participantes debieron contar con los resultados de estudios de laboratorio que incluyeron: exámenes coproparasitológicos, coprocultivo, y una prueba comercial de escrutinio para la identificación rotavirus-adenovirus.

### **Criterios de exclusión**

Mujeres embarazadas y pacientes que no desearan ingresar al estudio.

### **Criterios de eliminación**

Pacientes sometidos al estudio colonoscópico, pero en los cuales no se hubiera obtenido suficiente aspirado del colon (> 5 ml) durante el procedimiento ó en aquellos casos en los que se presentaron fallas en la separación ó procesamiento de las muestras que impidieron la obtención de DNA fecal de *Blastocystis* >20 ng/ml, y pacientes de los que se contó solo de manera parcial con sus exámenes de laboratorio (exámenes coproparasitológicos y/ó coprocultivo, y/ó una prueba comercial de escrutinio para la identificación rotavirus-adenovirus).

### **Tamaño de la muestra**

El tamaño de muestra se calculó con base en los resultados de Yakoob *et al.* (2004), debido a que los datos son similares a las prevalencias de *Blastocystis sp.* reportadas en

México y a que es un estudio en el cual se conocen la prevalencias de portadores de *Blastocystis sp.* en pacientes con SII y sin SII.

Considerando 95% de poder de confianza y 80% de potencia de prueba, con dos grupos pareados en una proporción 1:1. Con los siguientes datos:

<b>Frecuencia de exposición entre los casos (p1)</b>	<b>0.32</b>
<b>Frecuencia de exposición entre los controles (p2)</b>	<b>0.07</b>
<b>Razón de momios a detectar</b>	<b>2.00</b>
<b>Poder de confianza</b>	<b>0.95</b>
<b>Potencia de la prueba</b>	<b>0.80</b>
<b>Número de controles por caso</b>	<b>1</b>

Empleando la formula:

$$n = \frac{\left[ z_{1-\alpha/2} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

Se obtienen dos grupos pareados 1:1 de 38 individuos.

Sin embargo se ajusto el número de participantes, a los que pudieron reclutarse bajo los criterios anteriormente mencionados en el periodo de febrero de 2008 a enero de 2010, considerándose que nuestra población es diferente a la analizada por Yakoob et al., en 2004.

### **Consideraciones éticas**

Todos los procedimientos estuvieron de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección III, investigación con riesgo mayor al mínimo. Asimismo, esta tesis formó parte del protocolo “Síndrome de intestino irritable, genotipos de *Blastocystis hominis* y polimorfismos de los alelos TNF  $\alpha$  y de la IL -8: estudio de casos y controles”, aprobado por la Comisión de Ética del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, con el número de registro 12-58-2007, de acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud, en materia de investigación para la salud. Se anexa hoja del consentimiento informado usado.

### **Estudios de colonoscopia**

En el Servicio de Endoscopia se llevaron a cabo los estudios con los que se ayudo a confirmar los diagnósticos clínicos.

Para ello se realizaron estudios colonoscópicos, previa preparación para el procedimiento. Durante el procedimiento colonoscópico se tomaron más de 5 ml de un aspirado colónico el cual fue colectado en una “trampa” (frasco de plástico trasparente estéril con tapa con capacidad de 50 ml) y se llevó inmediatamente al laboratorio clínico para ser dividido, congelado y procesado.

### **Estudios de laboratorio**

En el laboratorio clínico, se tomaron distintas alícuotas en tubos tipo eppendorf de 1.5 ml, las cuales se congelaron inmediatamente a -20°C para su posterior análisis. Se realizaron coprocultivos para la identificación de entero bacterias patógenas por medio del sistema MicroScan System (Siemens, UK) y se utilizó un sistema comercial de aglutinación para el escrutinio rápido de rotavirus-adenovirus (VIKIA, Rota-Adeno, BioMérieux, France). Con el aspirado de heces remanente, se realizó un estudio coproparasitoscópico de concentración por la técnica de Faust y posteriormente, a todos los participantes se les pidieron 3 muestras de heces seriadas a las que también se les realizaron estudios coproparasitoscópicos.

### **Extracción de DNA fecal total**

La extracción de DNA fecal total se realizó en los primeros 7 días de la toma de cada aspirado de heces. Para esto se utilizó el sistema comercial Puregene™ DNA purification system cell and tissue kit (Gentra Systems; Alemania). Las extracciones se realizaron de acuerdo a las especificaciones del equipo. En resumen, a cada 300 mg de muestra se le agregó solución de lisis (Tris [hidroximetil] aminometano, ácido etilenodiaminotetraacético y duodecil sulfato de sodio) en una proporción 1:3 y se incubó a 65°C en baño María durante 45 minutos, este procedimiento permitió degradar las membranas celulares e inactivar la función de DNAsas, posteriormente se agregaron 200µl de una solución para precipitar proteínas (acetato de amonio) y se centrifugó durante 3 minutos a 14,000 revoluciones por minuto (RPM), esto hizo que todas las proteínas se precipitaran en el fondo y que el DNA se encontrara en el sobrenadante. Se separó el DNA y se desechó la pastilla, al sobrenadante se le agregaron nuevamente 200µl de la solución para precipitar proteínas y se centrifugó para asegurar que la muestra

estuviera libre de proteínas. Posteriormente se agregó isopropanol frío al sobrenadante en una proporción 1:1, se centrifugó a 14,000 RPM durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 600µl de etanol frío y se centrifugó a 14,000 RPM durante 5 minutos. Se eliminó el etanol y se dejó secar la pastilla con el DNA a temperatura ambiente. Una vez secos se agregaron 40µl de solución hidratadora (DNA Hydration Solution Tris [hidroximetil] aminometano, ácido etilendiaminotetraacético), se incubó durante 12 horas a 4°C y el DNA resuspendido se conservó a -20 °C, hasta su uso. La concentración del DNA se determinó en un espectrofotómetro (WPA UV 1101 Biotech Photometer) a 260nm, considerando que cada unidad de absorbancia corresponde a 50µg/ml de DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Posteriormente se analizó la integridad del DNA mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (Promega Agarose LE, Analytical Grade) al 1.5% en tampón TAE (tris –acetato- ácido etilendiaminotetraacético) 1x, pH 7.7, con bromuro de etidio (0,006%). Las muestras y los marcadores moleculares (Amresco E687) fueron diluidos en tampón de carga (rojo de cresol y glicerol 1:10), depositados en el gel y sometidos a migración electroforética a un voltaje constante de 90V, durante una hora y media (Thermo EC1000-90), después, se procedió a su observación mediante luz ultravioleta y foto-documentación (Fotodocumentador UVP Bioluminescence Imaging Systems Epichemi II Darkroom).

#### **Diagnóstico de *Blastocystis* sp.**

El diagnóstico molecular de *Blastocystis* se llevó a cabo por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para esto se utilizaron los oligonucleótidos específicos diseñados por Stensvold *et al.*, (2006), los cuales amplifican un fragmento de 310pb de la SSUrDNA de *Blastocystis*:

**B1: 5'GGAATCTCTTAGAGGGACACTATACAT3'**

**B2: 5'TTACTAAAATCCAAAGTGTTTCATCGGAC3'**

Para las amplificaciones se utilizaron los termocicladores comerciales Axygen y Thermo Hybrid PCR/Express, con los siguientes programas de amplificación: un ciclo de activación de la enzima, a 94°C durante 5 minutos. 35 ciclos de amplificación con 94°C, 1 minuto (para desnaturalizar el DNA), 57°C, 1min (para el reconocimiento de los oligonucleótidos específicos) y 72°C, 1 min (extensión). Finalmente se agregó un ciclo final a 72°C, 7 minutos (extensión final). La reacciones de amplificación se llevaron a cabo

en tubos eppendorf de 0.2ml, conteniendo 5µl de DNA (concentración mínima de 20ng/ml y máxima de 250ng/ml), 3 unidades de Taqpol (Epicentre, MasterAmp), 3µl de MgCl 25mM (Promega), 5µl de desoxinucleótidos (200mM c/u), 3µl de B1 (20pm/µl), 3µl de B2 (20pm/µl), 1µl de enhancer (betaina 10X), aforando la reacción a 50µl con agua inyectable (agua inyectable Pisa).

Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% en tampón TAE 1x, pH 7.7, con bromuro de etidio. Las muestras y los marcadores moleculares (Amresco E687) se diluyeron en tampón de carga (rojo de cresol y glicerol 1:10), depositados en el gel y se sometieron a migración electroforética en un voltaje constante de 90 V, durante una hora. Se observaron los geles con luz ultravioleta y se foto-documentaron los resultados. Se utilizó como control positivo DNA de *Blastocystis sp.* obtenido de un estudio coproparasitoscópico positivo a este parásito, así como DNA de *Blastocystis* ST3 donado por el Dr. Damien Stark; como control negativo se utilizó DNA humano obtenido de sangre periférica.

#### **Identificación de los subtipos de *Blastocystis sp.***

Para la identificación de los ST se utilizaron los oligonucleótidos desarrollados por Yoshikawa *et al* (2003), cuyas secuencias se resumen en la Figura 6. En general, las condiciones de amplificación de cada subtipo fueron: un ciclo 94°C durante 5 minutos. 35 ciclos de amplificación con 94°C, 1 minuto, 57°C, 1min y 72°C, 1 min, y un ciclo final a 72°C, 7 minutos. Es importante señalar que para identificar a cada ST se desarrolló un PCR diferente, por lo que se llevaron a cabo 7 reacciones de PCR por cada muestra positiva a *Blastocystis*. Debido a que como control solo se contó con una muestra de DNA del ST3, el resto de los subtipos se estableció cuando al utilizar un par de oligonucleótidos específicos se obtuvo un amplicón del tamaño teórico documentado. Las reacciones de amplificación se realizaron en tubos eppendorf de 0.2ml, conteniendo 5µl de DNA (concentración mínima de 20ng/ml y máxima de 250ng/ml), 3 unidades de Taqpol (Epicentre, MasterAmp), 3µl de MgCl 25mM (Promega), 5µl de desoxinucleótidos (200mM c/u), 3µl de oligonucleótido F (20pm/µl), 3µl de oligonucleótido R (20pm/µl), (20ng/ml), 1µl de enhancer (betaina 10X), aforando la reacción a 50µl con agua inyectable.

Los amplicones fueron visualizados por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.5% en tampón TAE 1x, pH 7.7, con bromuro de etidio y a un voltaje constante de 90V, durante hora y media. Después se procedió a su observación mediante luz ultravioleta y se foto-documentaron los resultados.

Subtipo	Gen bank	Producto	Primers 5' –3'	
I	AF166086 SB83	351 pb	F	GAAGGACTCTCTGACGATGA
			R	GTCCAAATGAAAGGCAGC
II	AY048752 SB340	704 pb	F	TGTTCTTGTTCTTCTCAGCTC
			R	TTCTTTCACACTCCCGTCAT
III	AF166088 SB227	526 pb	F	TAGGATTTGGTGTGGAGA
			R	TTAGAAAGTGAAGGAGATGGAAG
IV	AY048750 SB337	487 pb	F	GTCTTTCCTGTCTATTCTGCA
			R	AATTCGGTCTGCTTCTCTG
V	AY048752 SB336	317 pb	F	GTGGGTAGAGGAAGGAAAACA
			R	AGAACAAGTCGATGAAGTGAGAT
VI	AF166091 SB332	338 pb	F	GCATCCAGACTACTATCAACATT
			R	CCATTTTCAGACAACCACTTA
VII	AF166087 SB155	650 pb	F	ATCAGCTACAATCTCCTC
			R	ATCGCCAATTCTCCAAT

**Figura 6.** Oligonucleotidos usados para la identificación de los subtipos de *Blastocystis sp.*

### **Análisis de la SSUrDNA de *Blastocystis sp.***

Una vez identificados los portadores de *Blastocystis* y su ST, se llevó a cabo la estandarización de un PCR para la amplificación de un fragmento interno de 650 pb de la SSUrDNA, debido a que los oligonucleótidos diseñados por Yoshikawa *et al*, (2003) solo identifican los subtipos y, con la SSUrDNA, por ser un fragmento de un gen único se puede comparar entre sí.

Para la obtención de la secuencia completa del SSUrDNA, se amplificó la región 18S con el oligonucleótido de inicio “SRF1” documentado por Yoshikawa y colaboradores (2000) y el oligonucleótido reverso “R1Diego” aún no documentado, diseñado con base en una región conservada entre los distintos subtipos de *Blastocystis*, para la obtención de un amplicón de tamaño teórico de ~1790 pb.

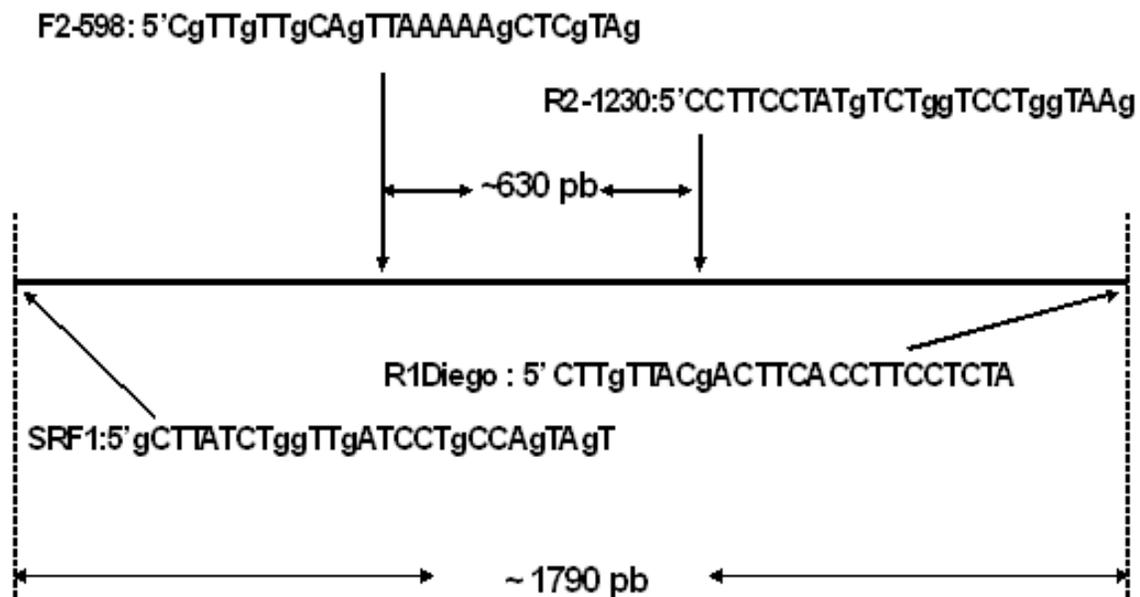
Sr1F:1-5' gCTTATCTggTTgATCCTgCCAgTAgT 3'

R1Diego 5' CCTTgTTACgACTTCACCTTCCTCTA 3'

Debido a que no es recomendable que se lleve a cabo la secuenciación directa de amplicones de más de 1000 pb, se diseñaron otros dos oligonucleótidos internos (F2-598 y R2-1230) en regiones conservadas para la amplificación de un producto interno de ~650 pb., como se muestra en la Figura 7.

F2-598: 5' CgTTgTTgCAgTTAAAAgCTCgTAg 3'

R2-1230: 5' CCTTCCTATgTCTggTCCTggTAAg 3'



**Figura 7.** Oligonucleótidos para la confirmación de los subtipos de *Blastocystis sp.* Esquema en el que se muestran los sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos diseñados para el análisis de la SSUrDNA de los subtipos de *Blastocystis*. Para llevar a cabo las estandarizaciones, como fue señalado previamente, se utilizó DNA de *Blastocystis* obtenido de cultivo axénico (cultivo dónde solo se encuentra una sola especie microbiana, en este caso "*Blastocystis sp.*") donado por el Dr. Demian Stark (Investigador de la división de microbiología en el St. Vincent's Hospital en Australia). También se analizaron muestras de pacientes con diagnóstico negativo para *Blastocystis* por PCR, como control negativo, en las cuales no se observó ningún amplificado de la 18S.

Las reacciones de amplificación se realizaron en tubos eppendorf de 0.2ml, conteniendo 5µl de DNA (concentración mínima de 20ng/ml y máxima de 250ng/ml), 3 unidades de Taqpol (Epicentre, MasterAmp), 3µl de MgCl 25mM (Promega), 5µl de desoxinucleótidos (200mM c/u), 3µl de oligonucleótido F (20pm/µl), 3µl de oligonucleótido R (20pm/µl), (20ng/ml), 1µl de enhancer (betaina 10X), aforando la reacción a 50µl con agua inyectable (agua inyectable Pisa).

Los programas de amplificación estandarizados para el fragmento completo de la SSUrDNA fueron: un ciclo de 94°C durante 5 minutos. 35 ciclos de amplificación con 94°C, 1 minuto, 57°C, 1 minuto y 30 segundos y 72°C, 1 min, con un ciclo final a 72°C, 7 minutos. Para el fragmento parcial de 650 pb se uso un ciclo de 94°C, 5 minutos, 35 ciclos de amplificación a 94°C, 1 minuto, 57°C, 1 minuto y 72°C, 1 min, con un ciclo final a 72°C, 7 minutos.

### **Análisis de secuencias**

Se purificaron los amplicones obtenidos con los iniciadores específicos diseñados por Stensvold *et al.* (2007), así como amplicones de ~650 pb de los ST1, ST2 y ST3 de la región interna de la SSUrDNA por medio del sistema QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) y se enviaron a secuenciar a un proveedor comercial. El análisis de las secuencias se realizó con el programa BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) y se obtuvieron los índices de identidad; se llevó a cabo un análisis filogenético utilizando el programa Mega versión 4.0 para evidenciar la ubicación de los subtipos de *Blastocystis* de nuestra población con respecto a otros países.

### **Análisis estadístico.**

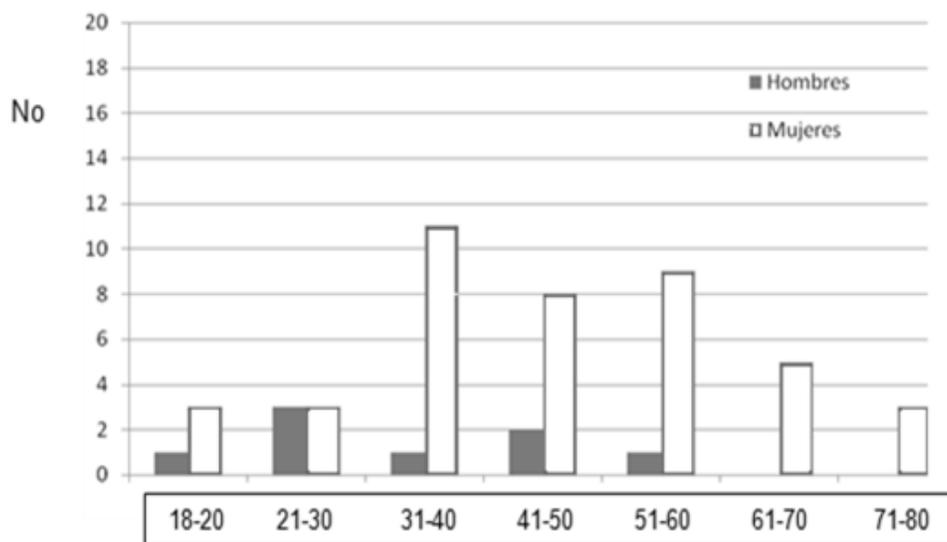
Se llevó a cabo un análisis descriptivo, estratificando la proporción de los diferentes padecimientos en el grupo control, así como las prevalencias de los distintos microorganismos encontrados. Los resultados se concentraron en una matriz de Excel para identificar asociaciones entre las manifestaciones clínicas con la presencia de *Blastocystis* y con los subtipos obtenidos y se analizaron usando las pruebas de  $X^2$  y t de Student, dentro de las medidas de asociación se calculó la razón de momios (OR por sus siglas en inglés *odds ratio*) y se obtuvo también el intervalo de confianza (CI por sus siglas en inglés). El análisis estadístico de los datos obtenidos fue desarrollado con el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), versión 15.0 para Windows y con el programa EpiInfo & versión 6.04.

## RESULTADOS

### Descripción de los grupos en estudio

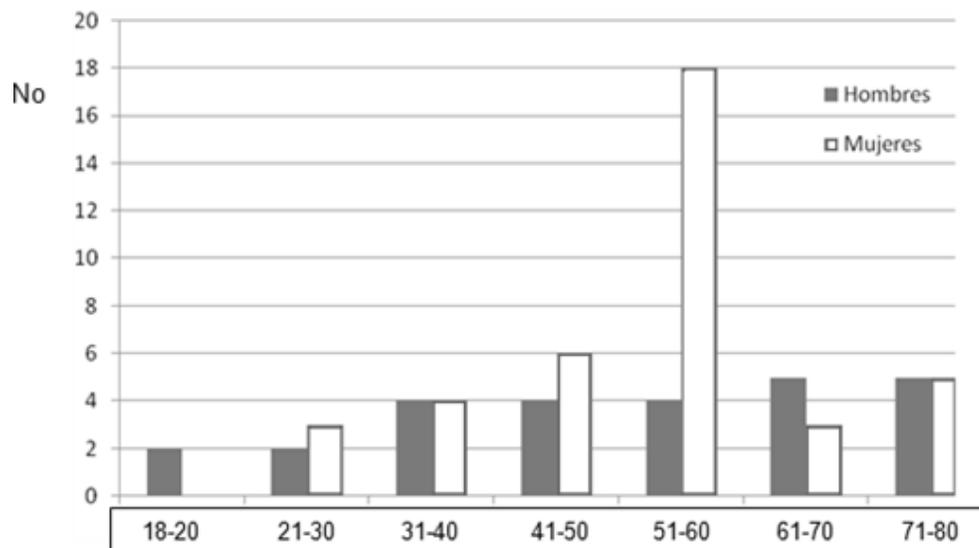
Se contó con la participación de 62 pacientes en el grupo de casos, de los cuales 50 cumplieron con los criterios de inclusión, los 12 individuos restantes, se eliminaron por falta resultado colonoscópico en el historial clínico y/o falta de suficiente aspirado de colon (> 5 ml) y/o por no contar con sus exámenes de laboratorio completos (resultados de exámenes coproparasitológicos y/o coprocultivo y/o pruebas para rotavirus). En el grupo de controles se reclutaron 95 participantes, de los cuales 65 tuvieron todos los criterios de inclusión, presentándose 30 individuos que no cumplieron con los criterios de inclusión, ya que no contaron con resultado colonoscópico en el historial clínico y/o con suficiente aspirado de colon (> 5 ml) y/o por no contar con sus exámenes de laboratorio completos (resultados de exámenes coproparasitológicos y/o coprocultivo y/o pruebas para virus). La edad promedio de los individuos de ambos grupos (n=115) fue de 49 años, con una desviación estándar de  $\pm 15.6$ . No se encontraron diferencias significativas en la edad ( $p > 0.05$ ) entre los grupos.

En el grupo de casos diagnosticados con SII mediante los criterios de Roma III, se realizó colonoscopia para descartar causas orgánicas que pudiera dar los mismos síntomas. Su intervalo de edad fue de 21 a 79 años, con una edad promedio de 45 años  $\pm 15.4$ . Este grupo estuvo integrado por 42 mujeres y 8 hombres, lo cual está acorde a lo documentado en la literatura (Longstreth *et al.*, 2006), siendo las mujeres mayores de 31 años las más frecuentes (Figura 8).



**Figura 8.** Distribución de frecuencias por edad y sexo en el grupo de casos.

Por otro lado, el grupo control estuvo conformado por pacientes que presentaron alguna alteración en el tubo digestivo, diferente al SII y cuyo diagnóstico presuntivo fue corroborado durante la colonoscopia. El intervalo de edad fue de 18 a 83 años, con una edad promedio de 52 años  $\pm$ 15.2, siendo el grupo de mujeres de 51 a 60 años el más frecuente aunque, igual que en el grupo de casos, se observó una participación mayor de mujeres en comparación a hombres (39 mujeres vs 26 hombres) como se observa en la Figura 9.



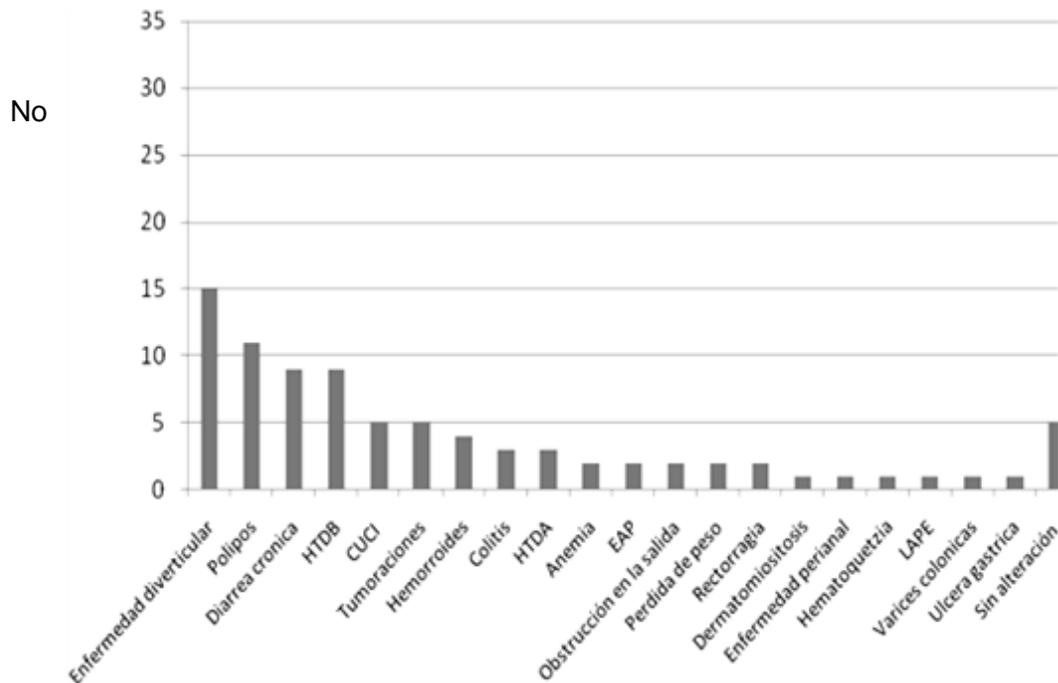
**Figura 9.** Distribución de frecuencias por edad y sexo en el grupo control.

### Hallazgos colonoscópicos

En el grupo de los casos se identificó que la mayoría de los pacientes (80.6%) presentaron una colonoscopia normal, en el 20% restante se identificó la presencia de 3 pacientes con hemorroides, 3 con pólipos, 1 con rectorragia, 1 con divertículos y 1 caso de una úlcera colónica (no se contó con 3 estudios de colonoscopia, los cuales fueron excluidos), en suma estos 12 casos no se consideraron para el análisis estadístico. Se consideraron solo 50 casos con SII, entre los que se observó 3 pacientes con ERGE, 3 pacientes con EAP, 2 pacientes con diarrea crónica, 1 paciente con anemia, 1 con diabetes, 1 con dolor cervical y 1 con lupus eritematoso observándose 38 individuos solo con SII.

En el grupo control, se presentaron diferentes afecciones gastrointestinales, siendo la enfermedad diverticular, la presencia de pólipos y la diarrea crónica, los hallazgos más frecuentes (Figura 10). Es importante notar que en algunos casos, al igual que en el grupo de los casos, al revisar los expedientes clínicos se encontraron afecciones superpuestas.

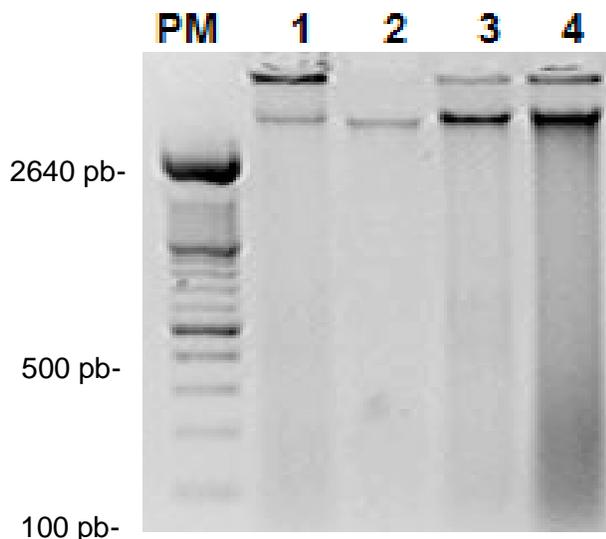
Algunas afecciones como la diarrea crónica, hemorragia en el tubo digestivo alto (HTDA), hemorragia en el tubo digestivo bajo (HTDB), así como la colitis han sido asociadas a la presencia de algún microorganismo patógeno.



**Figura 10.** Hallazgos colonoscópicos y alteraciones observadas en el grupo control.

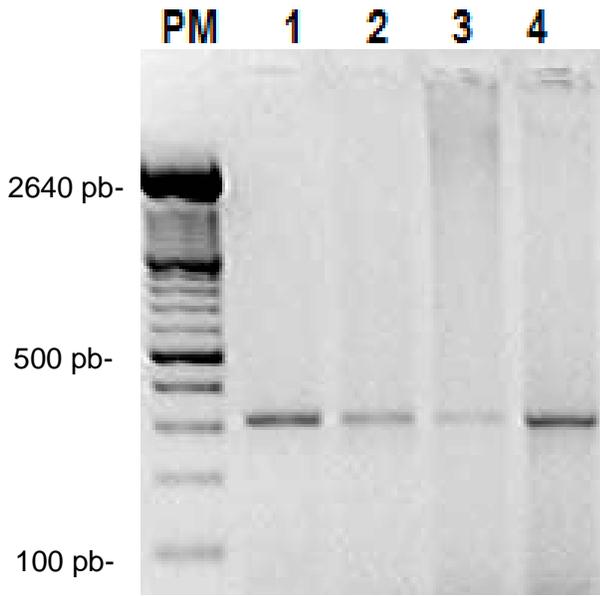
#### Diagnóstico de *Blastocystis sp.*

De las muestras de heces almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  obtenidas durante la colonoscopia, se obtuvo suficiente DNA total ( $>20\text{ ng/ml}$ ) y con buena integridad, que se determinó mediante corrimiento electroforético en geles de agarosa, que se muestra en la Figura 11.



**Figura 11.** Integridad de las extracciones de DNA total de origen fecal. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV (ultra violeta) en el que se observan ejemplos de la integridad de algunos DNA obtenidos en aspirados colónicos. **PM**, pesos moleculares; **1 a 4**, DNA total fecal de alto peso molecular. La muestra del carril 4 está un poco degradada.

El diagnóstico por PCR para *Blastocystis* se estandarizó con muestras de heces positivas y con aspirados intestinales, ambos confirmados por microscopia. En todas las muestras positivas se obtuvo una banda única de 310pb correspondiente a un fragmento de la SSUrDNA de *Blastocystis sp.* (Figura 12).



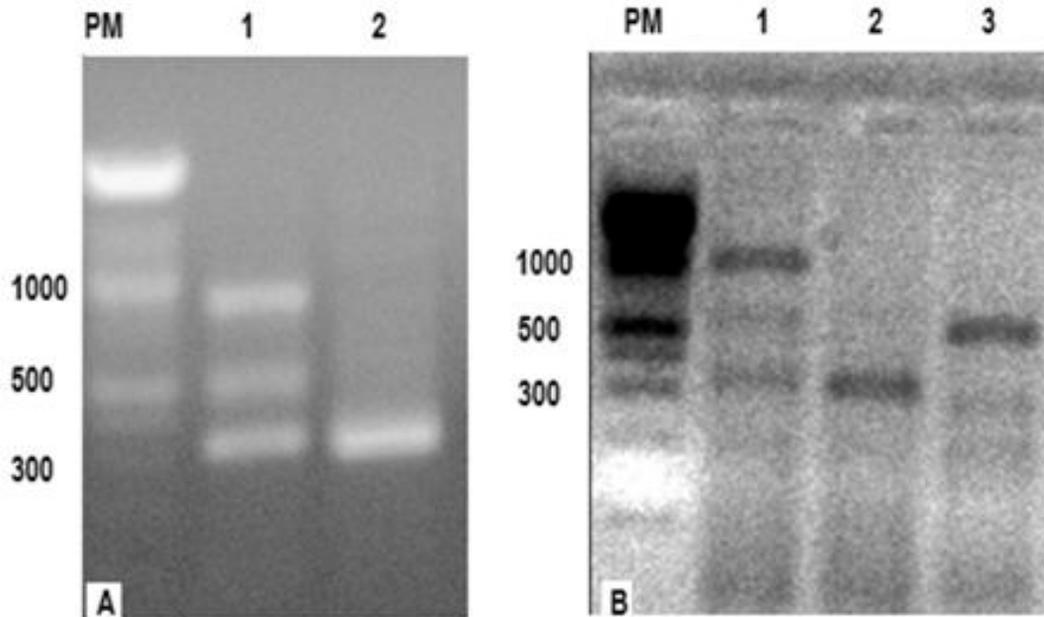
**Figura 12.** Amplicón diagnóstico de *Blastocystis sp.* Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV en el que se muestra el amplicón diagnóstico de 310 pb, característico de *Blastocystis sp.* Los carriles corresponden a **PM**, pesos moleculares; **1 y 2**, DNA de muestras de material fecal positivas a *Blastocystis* confirmadas por microscopia; **3 y 4**, DNA de muestras de heces de aspirado intestinal, de las cuales el paciente fue previamente identificado como portador de *Blastocystis sp.* por CPS.

En los casos en los que hubo duda respecto a la intensidad del amplicón, las muestras se sometieron a una segunda re-amplificación, lo cual permitió confirmar la presencia de *Blastocystis*. Se obtuvieron los resultados de 142 participantes (62 pacientes con SII y 80 controles), se incluyeron en el análisis final los resultados de 115 pacientes (50 casos y 65 controles) de acuerdo a los criterios de inclusión y eliminación, de los cuales se contó con sus datos completos. Al término del análisis, 16/50 (32%) pacientes con SII y 11/65 (16.9%) controles fueron portadores de *Blastocystis* lo que muestra una prevalencia global del 23.5%, mientras que la asociación entre *Blastocystis* y SII mostró valores de  $p=0.058$ ,  $OR=2.31$  y un  $IC=0.956-5.567$ .

#### **Subtipos de *Blastocystis sp.***

Se obtuvieron los ST de *Blastocystis* en las 27 muestras positivas por PCR, por lo que se identificaron amplicones cuyo peso molecular correspondían al valor teórico documentado utilizando oligonucleótidos subtipo específicos, de esta manera se obtuvo un amplicón de ~350pb para subtipo 1, otro de ~520 pb para el subtipo 3 y uno más de ~650 pb para el subtipo 2. Durante el periodo de la subtipificación no se contó con un sistema de foto-

documentación, por lo que las imágenes se tomaron con una cámara digital Sony cybershot y se muestran en la Figura 13.



**Figura 13.** Estandarización de la PCR para los subtipos de *Blastocystis sp.* Geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV. En estos geles se muestran algunos ejemplos del efecto de la temperatura de alineamiento ( $T_m$  por sus siglas en inglés) de los oligonucleótidos durante la estandarización para identificar subtipos de *Blastocystis*. A) Perfil de amplificación del subtipo 1; en el carril 1 se utilizó una temperatura de 54 °C, mientras que en el carril 2 se utilizó a 57°C, el tamaño del amplicón esperado era de ~350 pb con una  $T_m$  teórica de 55 °C. B) Perfil de amplificación del subtipo 3; en el carril 1 se ensayó una temperatura de 51°C, en el carril 2 de 54°C y en el carril 3 de 57°C, el tamaño del amplicón esperado era de ~526 pb con una  $T_m$  teórica de 60°C.

En el Cuadro 1 se concentran los resultados de los ST de *Blastocystis* identificados; como puede verse, la mayoría de los portadores presentaron una co-infección entre los ST 1 y 3. Se encontró una relación estadísticamente significativa entre el ST2 y el SII, pero no se encontró alguna asociación estadísticamente significativa entre los ST 1 y ST3 con el grupo de SII, ni con los hallazgos colonoscópicos ó complicaciones agregadas, en el cuadro 2 se muestran las relaciones encontradas entre los ST y el SII y se subrayan los resultados cercanos a la significancia estadística ( $p < 0.05$ ,  $OR > 2$ ,  $IC > 1$ ).

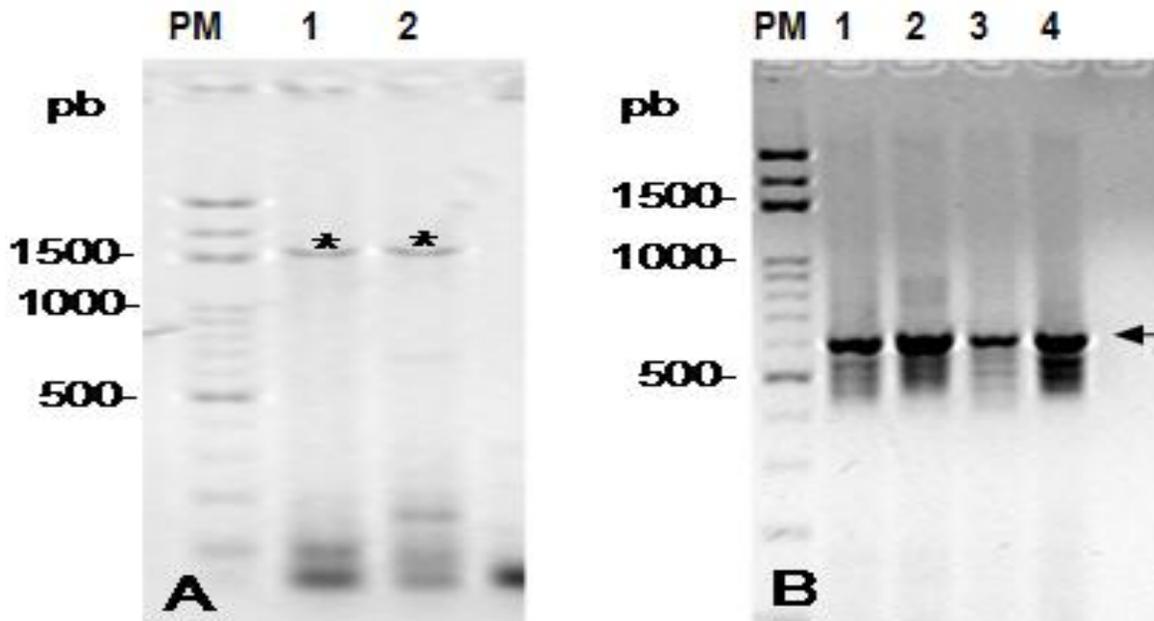
**Cuadro 1.** Subtipos de *Blastocystis* identificados por PCR (ST- subtipo)

Grupo/Subtipo	ST 1	ST 2	ST 3	ST 1/3	ST 2/3	Total
SII	2	1	2	10	1	16
Control	0	0	3	7	1	11

**Cuadro 2.** Relación de los subtipos de *Blastocystis* con el SII

Relación	X <sup>2</sup>	p	OR	IC
<i>Blastocystis</i> subtipo1 vs SII	3.587	<u>0.058</u>	<u>2.617</u>	<u>0.945-7.241</u>
<i>Blastocystis</i> subtipo 2 vs SII	<u>6.072</u>	<u>0.014</u>	<u>12</u>	<u>1.027-140.192</u>
<i>Blastocystis</i> subtipo 3 vs SII	0.94	0.331	0.38	0.03-3.79
<i>Blastocystis</i> subtipo 1/3 vs SII	1.912	0.167	<u>2.071</u>	0.727-5.899

Una vez identificados los subtipos se procedió a analizar la SSUrDNA de las muestras positivas a *Blastocystis sp.*, se amplificó un fragmento interno de ~630pb en que se incluyen los ST que afectan a los humanos. A partir del DNA total fecal y utilizando los oligonucleótidos F2-598 y R2-1230, se obtuvieron amplicones correspondientes a los ST1, ST2 y ST3, los cuales se purificaron y se enviaron a secuenciar (Figura 14), y fueron previamente identificados con los oligonucleótidos subtipo específicos desarrollados por Yoshikawa *et al* 2003.



**Figuras 14.** Amplicón de la SSuRNA de *Blastocystis*. Geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV correspondiente al análisis de la SSUrDNA. En A) el asterisco muestra un amplicón ~1790pb correspondiente al fragmento completo de la SSUrDNA, mientras que en B) la flecha señala el amplicón de ~650pb

correspondiente a un fragmento interno de la SSUrDNA. PM=pesos moleculares, demás carriles=muestras de pacientes portadores de *Blastocystis sp.*

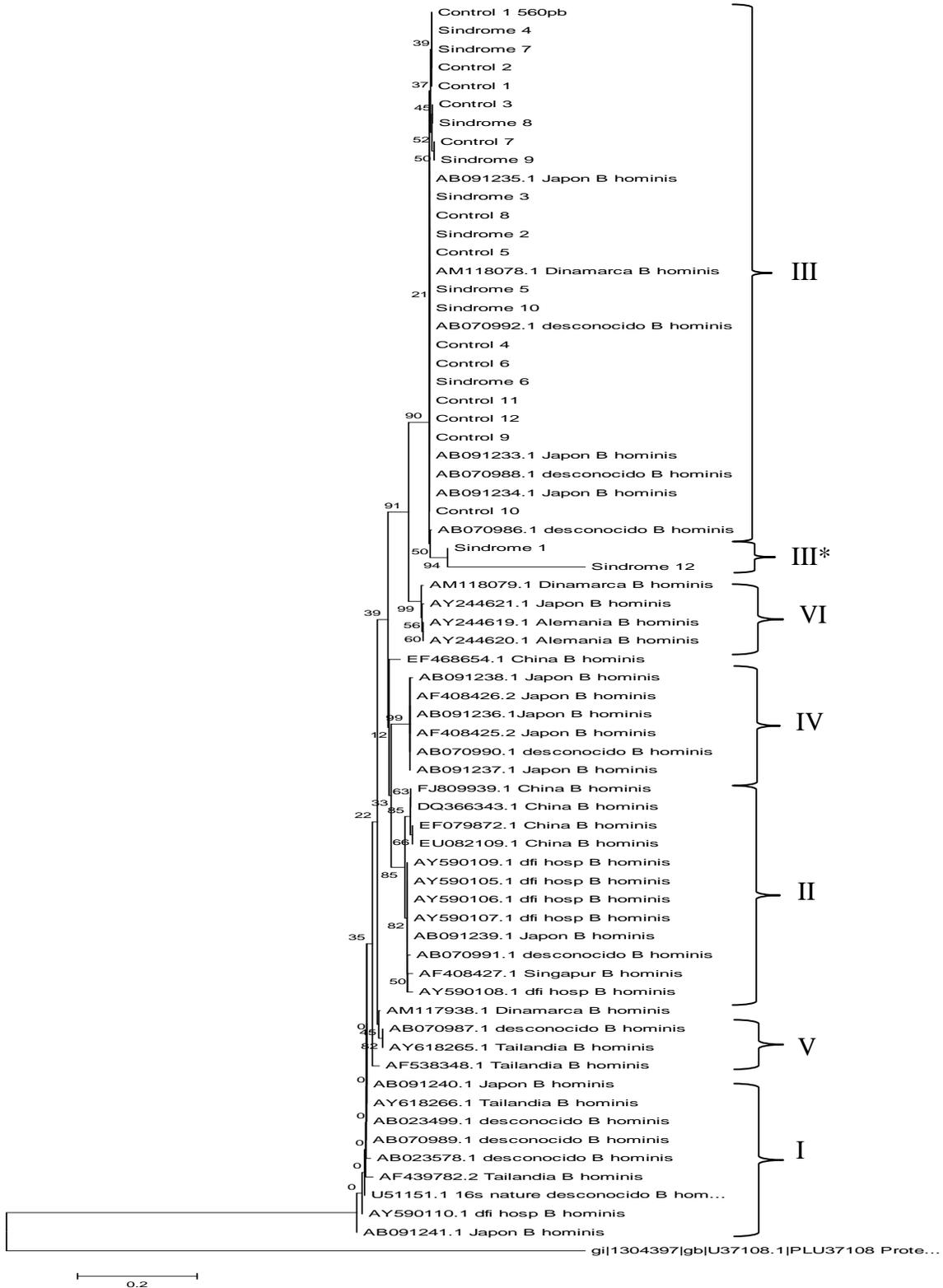
Al término del proceso solo se obtuvieron las secuencias de 3 fragmentos internos de 630pb de la SSUrDNA las cuales se muestran en el anexo 2. Una secuencia mostró 98% de identidad con la secuencia del *GenBank* AM275354 de Dinamarca de un ST1; otra secuencia mostró una identidad del 98% con la secuencia EU679346 de Oregon, EU, y correspondió al ST3. La última secuencia mostró 90% de identidad de acuerdo a la secuencia del *GenBank* EF209016, identificado como ST2 con los oligonucleótidos de Yoshikawa *et al*, (2003); sin embargo esta secuencia mostró 99% de identidad desde el nucleótido 20 hasta el nucleótido 587 con *Poteroochromonas malhamensis*.

En el anexo 3 se muestran 23 secuencias de los fragmentos diagnósticos de 310 pb. El grado de identidad de las secuencias para *Blastocystis* es de aproximadamente 99% en la mayoría de las secuencias, sin embargo utilizando este marcador todas las muestras analizadas correspondieron al ST3.

La Figura 15 muestra una reconstrucción filogenética de las secuencias obtenidas de 310pb (fragmento diagnóstico con oligonucleótidos diseñados por Stensvold *et al.*, 2006) con respecto a las secuencias reportadas en otros países.

En esta reconstrucción observamos que en el subtipo III se agruparon la mayoría de las secuencias identificadas en ambos grupos de nuestra población (ya que en ambos grupos se identifico al ST3), aunque podemos ver secuencias representantes de Japón y Dinamarca muy cercanas a las nuestras. También puede observarse que el haplogrupo III\* (variante del ST3) se conformó por dos secuencias de pacientes con SII.

En el resto de los 5 subtipos se ordenaron secuencias de diferentes partes del mundo aunque en más de 5 haplotipos.



**Figura 15.** Reconstrucción filogenética de las secuencias mexicanas de *Blastocystis sp.* utilizando un algoritmo de Neighbor-joining (agrupamiento de secuencias más cercanas), realizado con el programa Mega versión 4.0 (alineamiento y reconstrucción filogenética).

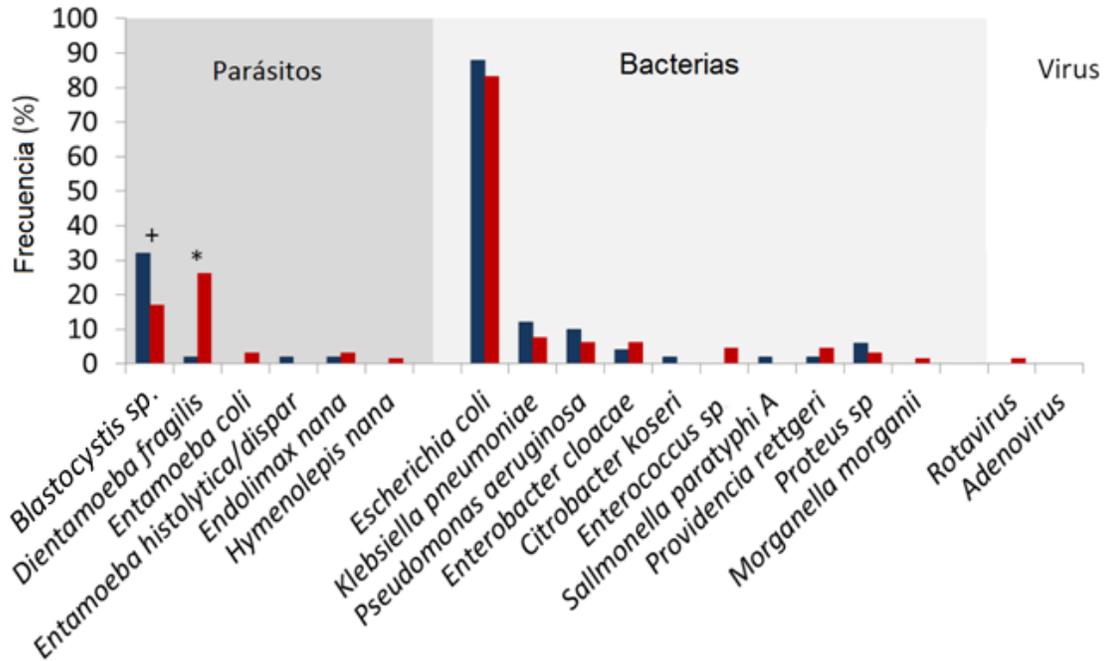
Los Filogramas (ramas) y su distancia indican la distancia en cambios evolutivos, los números en la base de las ramas son los valores de *bootstrap* (consenso de distribuciones de creación repetida) e indican el número de veces en que se encontró dicha rama (consenso). El organismo *Proteromonas lacertae* (código de acceso del GenBank U37108) fue usado como grupo externo. Se emplearon todas las secuencias disponibles que correspondían al fragmento diagnóstico de la SSUrDNA (Stensvold *et al.*, 2006), existiendo secuencias de seis de los 7 subtipos encontrados en humanos (agrupados en 25 haplotipos), siendo las secuencias de este estudio agrupadas dentro del ST3 de acuerdo a la nomenclatura sugerida por Stensvold *et al.*, 2007a, mostrados en números romanos, las secuencias encontradas en este estudio están repartidas en 6 haplotipos, entre las cuales destacan las diferencias encontrada en III\*.

### **Microorganismos identificados**

En la Figura 16 se resume la frecuencia de los principales microorganismos identificados en ambos grupos; como puede observarse *Blastocystis sp.* fue el parásito más frecuente en el grupo de los casos, mientras que en el grupo control lo fue *Dientamoeba fragilis* seguido de *Blastocystis*. También es importante señalar que el diagnóstico de *D. fragilis* se realizó por medio de PCR, ya que este parásito no presenta forma quística y no es observable en exámenes coproparasitoscópicos, además al igual que *Blastocystis*, su papel patógeno aún está en debate y en algunas publicaciones lo asocian al desarrollo de SII (Windsor y Macfarlane, 2005; Stark *et al.*, 2007). Para ambos grupos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron las bacterias más frecuentes. Solo en un paciente del grupo control se identificó un caso de rotavirus y en un paciente con SII una *Salmonella paratyphi A*.

Cabe destacar que existe el sesgo de no tener un grupo control formado por individuos sanos, ya que nuestro grupo control de referencia estuvo solamente integrado por pacientes con alteraciones distintas al SII.

Por el momento podemos indicar que en la figura 16 se observa un mayor número de agentes patógenos, potencialmente patógenos y comensales en el grupo de casos. Siendo que se observó la presencia de uno ó más microorganismos potencialmente patógenos (*Blastocystis sp.*, *D. fragilis*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Proteus sp.* y *Salmonella paratyphi A*) en 29/50 (58%) individuos con SII, sin embargo este dato no es estadísticamente significativo.



**Figura 16.** Frecuencia de microorganismos identificados en pacientes con SII (en azul) y en los participantes del grupo control (en rojo). + $p=0.0581$ ; \* $p=0.0004$

Por microscopía se identificaron solamente 5 portadores de *Blastocystis sp.* en los pacientes con SII, y tres en el grupo control, lo que refleja la poca sensibilidad de las técnicas coproparasitológicas en comparación con el PCR cuya sensibilidad es cercana al 100% (Stensvold *et al.*, 2009).

Algunos ejemplos de la búsqueda de relaciones evaluadas se muestran en el Cuadro 3. Para una asociación robusta, serían necesarios valores de OR superiores a 2, que el intervalo de confianza no cruce la unidad y un valor de  $p$  menor a 0.05. En el cuadro siguiente observamos que no se encontraron asociaciones significativas robustas, pero sí valores de OR superiores a 2.

**Cuadro 3.** Búsqueda de relaciones significativas entre algunas variables estudiadas y la presencia de *Blastocystis sp.*

Asociación	$\chi^2$	$p$	OR	IC
<i>Blastocystis</i> vs SII	3.57	0.058	2.31	0.956-5.567
<i>Blastocystis</i> vs Edad B	4.667	0.097	No determinado	No determinado
<i>Blastocystis</i> vs mujeres	2.068	0.15	2.16	0.68-7.29
<i>Blastocystis</i> vs <i>E. coli</i>	3.43	0.064	5.778	0.729-45.763

<i>Blastocystis</i> vs <i>P. aeruginosa</i>	2.996	0.083	0	0-1.87
<i>Blastocystis</i> vs <i>K. pneumoniae</i>	3.071	0.079	0.187	0.024-1.488
<i>Dientamoeba</i> vs SII	13.52	0.0004	0.053	0.007-0.415

En este estudio se encontró una asociación entre *D. fragilis* y el grupo control ( $p=0.0004$ ) y una tendencia de asociación entre *Blastocystis* sp. y el grupo de pacientes con SII ( $p.0581$ ).

## DISCUSIÓN

En México las infecciones gastrointestinales causadas por parásitos siguen generando miles de casos anualmente, con un alto impacto de morbilidad en la población mexicana, ya que existen deficientes condiciones higiénicas y hábitos sanitarios que promueven su transmisión y endemicidad ([www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd\\_boletin.html](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_boletin.html)).

El presente trabajo se enfocó a estudiar el papel patógeno de *Blastocystis*, el cual es controversial debido a que en años recientes se le ha asociado como un responsable importante del SII; aunque en otros estudios lo exoneran de este síndrome (Tan, 2008).

Aunque existen algunas publicaciones en las que se muestra la prevalencia de *Blastocystis* utilizando técnicas coproparasitoscópicas en diferentes muestras de poblaciones mexicanas, no existe actualmente ningún trabajo en el que se hayan utilizado técnicas moleculares para su diagnóstico y subtipificación en México ni en Latinoamérica.

Recientemente se le ha relacionado a *Blastocystis sp.* con el SII (Giacometti *et al.*, 1999 Yakoob *et al.*, 2004), en México es importante analizar esta relación, ya que se ha observado una prevalencia de *Blastocystis sp.* de entre el 3 y el 42% en la población urbana y con-urbana del DF (Cruz-Licea 2003; Diaz *et al.*, 2003), porcentaje muy parecido a la frecuencia del SII en el país.

Se ha estimado que aproximadamente el 35% de las consultas en la especialidad de Gastroenterología en nuestro país, son de pacientes que padecen SII según los criterios de Roma II (Leyva-Jimenez *et al.*, 2005), teniendo una dominancia del género femenino (Leyva-Jimenez *et al.*, 2005; Schmulson *et al.*, 2010; López-Colombo *et al.*, 2012). En la presente tesis, en el grupo de casos se encontró una proporción de 1 hombre por cada 5 mujeres, contrastando con la relación 1:2-3 que describen algunos autores en otras partes del mundo (Stark *et al.*, 2007), pero más cercano a la relación de 1 hombre por cada 3.3 mujeres que reportan Schmulson y colaboradores en 2010 para México. La proporción aún incrementada de mujeres en nuestros sujetos de estudio se debe probablemente a que se trata de “pacientes” y se conoce que las mujeres consultan o buscan atención médica con mayor frecuencia que los hombres por estos síntomas. En el grupo control se observó una proporción entre hombres y mujeres, más equilibrada de 5 hombres por cada 8 mujeres, esto debido a que en los controles se agruparon una gran variedad de afecciones del tubo digestivo, los cuales no son restringidos por el sexo.

Respecto a la edad de los participantes, en ambos grupos fue similar, sin embargo en el servicio de Endoscopia de nuestro hospital existe una mayor afluencia de pacientes femeninas, particularmente las mayores de 31 años, lo que sugiere un sesgo

sociodemográfico ó de idiosincrasia (comunicación personal con los médicos del servicio). No obstante las diferencias de género y edad no fueron estadísticamente significativas por lo que fue factible llevar a cabo una comparación de variables entre ambos grupos.

Los criterios de Roma III (Longstreth *et al.*, 2006) permitieron confirmar el diagnóstico clínico y la correcta asignación de los sujetos en el estudio. Sin embargo, teniendo en cuenta los hallazgos colonoscópicos un individuo diagnosticado clínicamente como SII se cambió al grupo control por presentar diverticulosis y cuatro pacientes del grupo control con síntomas compatibles con SII pero que por su dieta y edad se debían descartar la presencia de pólipos y/ó divertículos, después de su colonoscopia la cual fue normal, fueron asignados en este estudio como casos.

Es importante observar que se presentó un mayor número de agentes patógenos, potencialmente patógenos y comensales en el grupo de casos y se observó la presencia de uno ó más microorganismos potencialmente patógenos en el 58% de los individuos con SII, sin embargo no encontramos diferencias significativas en las prevalencias de los microorganismos entre el grupo control y el de casos, por lo que el componente biológico para desencadenar el SII en la población mexicana puede ser importante. Sin embargo no hay que olvidar que el SII es un trastorno multifactorial, en el cual, además de la posibilidad de ser desencadenado por agentes infecciosos, es muy importante el componente genético del paciente, su susceptibilidad a algún alimento u alérgeno, el estrés de la persona y alteraciones psicológicas (Camilleri *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2005). También es importante considerar a futuro realizar un seguimiento de los pacientes que presenten una gastroenteritis bacteriana, ya que se ha reportado a este hecho como un factor de riesgo para desarrollar el SII PI (Neal *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004).

Llamó la atención encontrar una prevalencia global *Blastocystis* del 23.5% utilizando PCR, en comparación con los resultados obtenidos con técnicas coproparasitoscópicas, con las que se encontró una frecuencia del 42% en vendedores de alimentos de un mercado de Xochimilco (Cruz-Licea 2003) y del 62% en niños de poblaciones rurales de Guerrero (Rodríguez *et al.*, 2008), sin embargo estas diferencias se pueden deber a diferentes hábitos alimenticios y condiciones higiénicas, las cuales suelen ser deficientes en zonas conurbadas y aun más deficientes en comunidades rurales, basta con comparar estas frecuencias con las del 3% y 7% observadas por Diaz *et al.*, 2003, en zonas urbanas de la ciudad de México que son muy contrastantes con las anteriores. Para este trabajo uno de los criterios de inclusión fue la residencia en el Distrito Federal por lo menos durante un año, ya que el hospital en el que se realizó el estudio atiende a personas de esta entidad

federativa así como de otros estados, por lo que al seleccionar solamente individuos que viven en el Distrito Federal, cerró la población a individuos de Zonas Urbanas y conurbadas, por lo que era de esperar que la prevalencia de *Blastocystis sp.* oscilara entre el 7% y el 42% (frecuencias reportadas por Diaz *et al.*, 2003 y Cruz Licea 2003 respectivamente), aun y cuando se contó con una técnica diagnóstica más sensible que los coproparasitoscópicos.

En la presente tesis, al tratarse de pacientes que acudieron a un hospital general, también se presupuso un sesgo de selección, ya que pueden concentrarse portadores sintomáticos de *Blastocystis* subestimando la prevalencia de este parásito; un estudio preliminar sobre la prevalencia global de *Blastocystis* en muestras de heces analizadas durante un año en el Laboratorio Clínico de nuestro hospital mostró una prevalencia del 45% (Q.C. Arroyo Escalante *comunicación personal*), lo que sugiere que en nuestro estudio probablemente hubo un sesgo de inclusión para ciertos subtipos patógenos u oportunistas de *Blastocystis*, por lo que disminuyó la prevalencia global esperada al excluir a los subtipos no patógenos u oportunistas, ya que el estudio no contó con individuos sanos, propios de una población abierta.

La presencia de *Blastocystis sp.* en el grupo de pacientes con SII (32%) respecto a los controles (16.9%), no mostró una asociación estadística clara, ya que la probabilidad de que esta asociación se deba solo al azar no fue menor a 0.05 (el valor encontrado fue  $p=0.0581$ ), aunque el valor de  $OR=2.31$  indique que los portadores de *Blastocystis sp.* tienen dos veces mayor probabilidad de desarrollar SII, la precisión estadística reflejada por  $CI=0.956-5.567$ , al cruzar por la unidad, no respalda el valor de OR, (no obstante se encuentra muy cerca de la unidad), lo que refleja solo una tendencia de asociación.

Nuestros datos solo muestran una tendencia de asociación entre el *Blastocystis sp.* y el SII, (esto dentro de la población analizada). Para esclarecer fehacientemente el papel de este microorganismo en el SII, deberá de considerarse un tamaño de muestra mayor en los grupos de estudio, así como incluir un grupo de referencia de individuos sanos, que ayudará a incorporar variantes de *Blastocystis sp.* comensales, todo esto a partir de los datos de las frecuencias de los portadores de *Blastocystis sp.* en pacientes con SII y de portadores de *Blastocystis sp.* en pacientes sin SII, datos que hasta antes de la presente tesis nos eran desconocidos, (a partir de los datos obtenidos en la presente tesis podemos re calcular que para un estudio de casos y controles como este, necesitaríamos 111 individuos por grupo). Una limitante del presente estudio es la ausencia de un grupo control proveniente de población abierta. Para evitar ese sesgo, todos los participantes se

tendrían que ser evaluados con los criterios de Roma III y ser sometidos a un examen médico y colonoscópico para descartar organicidad. Aunque es muy difícil contar con voluntarios aparentemente sanos que estén dispuestos a someterse a una colonoscopia, además de que los servicios del Hospital general Dr. Manuel Gea González, en su mayoría ya están comprometidos con los servicios propios de la institución. Probablemente el papel de *Blastocystis sp.* en el SII sea muy limitado. En nuestra población la prevalencia de *Blastocystis sp.*, en nuestros controles es del 16.9% y la prevalencia en pacientes con SII, es del 32%, por lo que difícilmente este microorganismo sea el principal causante del SII en nuestra población.

En cuanto al análisis de la SSuRNA, consideramos que para el caso particular de *Blastocystis*, tratar de relacionar un subtipo genético establecido con base en un gen constitutivo (como lo es la SSUrDNA) con la patogenicidad del microorganismo, es un abordaje inexacto; ya que se debería buscar esta asociación con posibles genes de virulencia (genes de las proteasas de cisteína, de las proteínas involucradas en el enquistamiento ó en el cambio de los estadios ameboide, granular y de cuerpo central, entre otros). Sin embargo actualmente no existen secuencias genéticas de estos marcadores para todos los subtipos conocidos y al desconocer si este organismo presenta eventos de reproducción sexual y solo ser conocida su reproducción asexual (clonal), es factible pensar que al analizar los subtipos genéticos basados en un gen, con este sea posible diferenciar variantes patógenas de las comensales, aunque para esta hipótesis tendríamos que esperar que no existan eventos de recombinación horizontal entre los diferentes subtipos, evento que nos es también desconocido, aunque en general son pocos los eventos de co-infección entre los diferentes subtipos.

Respecto a los subtipos de *Blastocystis* identificados, bajo las condiciones de este estudio, se observaron los ST1, ST2 y ST3, de manera abundante los ST1 y ST3 (ver cuadro 1), que en su mayoría se encontraron co-infectando a un mismo hospedero, mientras que el ST2 se identificó en dos pacientes con SII, por lo cual la asociación que se encontró en este estudio con relación a SII vs ST2, puede ser resultado de un artefacto por la falta de un tamaño de muestra mayor. No hay que olvidar que desconocemos la distribución de los ST en población abierta, sobre todo en portadores asintomáticos, y que es posible que en población abierta encontremos otros ST y que los que encontramos aquí, cambien en su frecuencia en una población más amplia.

En el Cuadro 4 se concentran los resultados de una búsqueda bibliográfica realizada para la presente tesis, en la que se muestran los subtipos de *Blastocystis sp.* identificados en

portadores humanos independientemente de sus manifestaciones clínicas; como puede verse los ST1 y ST3 son los más frecuentes en el mundo, también puede observarse que, aunque en menor frecuencia, se han identificado otros subtipos y que existe el caso excepcional del ST4, que en la población española presenta una frecuencia del 94%. En algunos estudios se encontraron casos de co-infección entre distintos subtipos por lo que la suma de las frecuencias de los ST rebasa el 100%, siendo la co-infección más común entre los ST1/ST3, seguida por las coinfecciones ST3/ST2 y ST1/ST2.

No se han identificado asociaciones claras entre los distintos subtipos de *Blastocystis sp.* y la presencia de síntomas ó alteraciones clínicas (Tan, 2008). Sin embargo, durante el estudio de Dogruman–Al *et al.* (2008), se encontró que al estudiar 96 muestras fecales de portadores de *Blastocystis* sintomáticos como asintomáticos, el ST2 se asoció al grupo de portadores asintomáticos ( $p=0.044$ ), siendo el único estudio en el que se ha encontrado una asociación entre los subtipos de *Blastocystis* y los portadores asintomáticos. En la presente tesis, el ST2 se identificó en un paciente de manera aislada y en co-infección con el ST3, lo que incrementa el debate sobre la virulencia y patogenicidad de los ST de *Blastocystis*.

**Cuadro 4.** Frecuencia de distintos subtipos genéticos de *Blastocystis* en el mundo.

Referencia	Origen (n)*	Subtipos (%)‡								
		1	2	3	4	5	6	7	8, 9 y 10	Otros+
Yoshikawa <i>et al.</i> , 2004b	Alemania (12)	25	16.7	41.7	16.7	0	0	0	0	0
Li <i>et al.</i> , 2007	China (80)	22.5	2.5	70	1.2	0	0	0	0	3.8
Yan <i>et al.</i> , 2006	China (40)	45	10	47.5	0	0	0	2.5	0	0
Stensvold <i>et al.</i> , 2006	Dinamarca (29)	3.4	20.7	51.7	24.1	0	0	0	0	0
Stensvold <i>et al.</i> , 2007b	Dinamarca (28)	17.9	32.1	46.4	3.6	0	0	0	0	0
Yoshikawa <i>et al.</i> , 2004b	Bangladesh (26)	7.7	0	92.3	0	0	0	0	0	0
Menounos <i>et al.</i> , 2007	Grecia (45)	20	13.3	60	2.2	2.2	2.2	0	0	0

Yoshikawa <i>et al.</i> , 2004b	Japón (50)	8	0	52	4	0	22	10	4	0
Wong <i>et al.</i> , 2008	Singapur (9)	22.2	0	77.8	0	0	0	0	0	0
Dogruman –Al <i>et al.</i> , 2008	Turquía (96)	19.8	22.9	57.3	0	0	0	0	0	0
Souppart <i>et al.</i> , 2009	Francia (43)	25.6	9.3	53.5	9.3	0	2.3	0	0	0
Yoshikawa <i>et al.</i> , 2004b	Paquistán (10)	20	0	70	0	0	10	0	0	0
Dominguez-Marquez <i>et al.</i> , 2009	España (51)	2	4		94	0	0	0	0	0
<b>Presente estudio</b>	<b>México (115)</b>	<b>70.3‡</b>	<b>7.4‡</b>	<b>81.4‡</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

\*Número de muestras analizadas; †ST desconocidos o autóctonos; ‡en algunos estudios se encontraron casos de co-infección entre distintos subtipos por lo que la suma de las frecuencias de los ST rebasa el 100%, como ocurrió en la presente tesis.

Después de la corroboración de los subtipos con las secuencias del amplicón interno de 630 pb de la SSUrDNA, se observó que en general tuvieron una identidad >98% para los ST1 y ST3 respecto a las secuencias de otros países. Esto fortalece la hipótesis de que *Blastocystis* podría presentar una serie de linajes clonales distribuidos en el mundo (Tan, 2008), además de que en este microorganismo no se ha comprobado su reproducción sexual por lo que la apreciación del fenómeno de clonalidad se ve fortalecido. Llamó la atención que la secuencia del ST2 presentó una identidad del 99% con el organismo *Poteroochromonas malhamensis* y del 90% a *Blastocystis* (secuencia EF209016). Resultados semejantes en grado de identidad y que corresponden al género *Blastocystis* se han documentado en muestras provenientes de otros hospederos como cerdos y caballos, lo cual implica comportamiento zoonótico de este parásito (Thathaisong *et al.*, 2003).

El análisis de las secuencias del amplicón diagnóstico de 310 pb mostró que todos los aislados correspondían al ST3 con diferente grado de identidad (del 97% al 99%), lo cual sugiere dos cosas 1) que el análisis de este amplicón no es adecuado para el establecimiento de los subtipos de *Blastocystis sp.*, 2) en el caso de tener co-infecciones de distintos ST, como en el presente trabajo, probablemente el DNA del ST más abundante sea el que se sobre-amplifique (en nuestro caso, el ST3), hay que recordar que el ST3 es el único ST que es exclusivo de humanos. Comunicación personal con el

Dr. Rune Stensvold (investigador de la unidad de micología y parasitología de Statens Serum Institut en Dinamarca) señala que en su experiencia ha identificado que en varias ocasiones se encuentran mezclas de diferentes ST al analizar el amplicón diagnóstico de 310pb, además de que los oligonucleótidos diseñados por Yoshikawa *et al.* (2003) (y que se usaron para la presente tesis) no cubren correctamente la subtipificación de *Blastocystis*, por lo que él recomienda analizar la secuencia completa de la SSUrDNA.

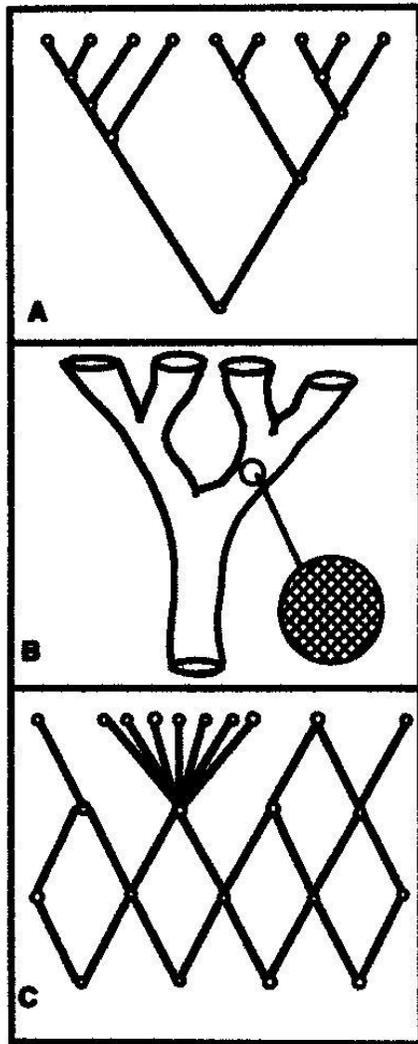
El análisis filogenético mostró que la mayoría de las secuencias del amplicón diagnóstico se congregaron en el ST3, con las secuencias AM118078, EU679346, AB070988, AB070992, AB091233, AB091234, AB091235 y AB070986 de Dinamarca, Filipinas y Japón. El subtipo III\*, se conformó por 2 secuencias mexicanas, las cuales coinciden que fueron de pacientes con SII, presentaron co-infección con los ST1, además de que presentaron el porcentaje de identidad más bajo (97%) respecto a las secuencias del ST3, ya que al encontrarse estas co-infecciones se reduce la identidad de las secuencias analizadas.

Se ha documentado que muchos parásitos presentan una estructura poblacional clonal, aún cuando tienen reproducción sexual (Maravilla *et al.*, 2008; Sibley *et al.*, 2009). Por lo contrario, en algunos otros como el género *Trypanosoma* no existe la evidencia de meiosis ó singamia, sin embargo se han documentado evidencias de recombinación genética, cuando al infectar moscas tsetse simultáneamente con dos cepas de *T. brucei* se recuperaron cepas recombinantes (Gibson, 1996). Asimismo, Smith *et al.* (1993), estudiaron la clonalidad en bacterias y en algunos parásitos como *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi*; en todos ellos se identificaron estructuras genéticas de alta clonalidad, con recombinación y “epidémicas” con alta recombinación (Figura 17). Debido a que actualmente se desconoce cómo es la estructura genética poblacional de *Blastocystis*, considerando los datos obtenidos en la presente tesis y de las secuencias del GenBank, podemos suponer que este parásito puede presentar una estructura clonal con cierto grado de recombinación entre variantes genotípicas cercanas que puedan encontrarse en el ambiente y posteriormente co-infectar a un mismo individuo. Para comprobar esta hipótesis es necesario llevar a cabo un estudio de desequilibrio de ligamiento en genes metabólicos ó de “virulencia” y regiones silenciosas junto con un análisis molecular de selección y pruebas de neutralidad (Pruebas de T de Tajima, Ewens-Watterson).

Aunque en nuestra población encontramos generalmente co-infecciones de los ST1 y ST3, es importante analizar, el porqué en otros estudios se encuentra principalmente una infección

definida por un solo subtipo. Para explicar porque se encuentra principalmente un solo subtipo de *Blastocystis* parasitando a un individuo, tenemos que analizar la posibilidad de una “inmunidad concomitante”. Este tipo de inmunidad se presenta frecuentemente en diversas parasitosis y se refiere a que los hospederos desarrollan una respuesta inmune posterior a una infección inicial, que actúa para prevenir el establecimiento de parásitos de la misma especie ante un reto subsecuente de infección mientras siga vivo el parásito que se estableció durante la exposición inicial (Lightowlers, 2010; Srisawangwong *et al.*, 2011).

Para comprobar esto en la blastocistosis, es necesario contar con cultivos axénicos de distintos ST de *Blastocystis* y llevar a cabo infecciones experimentales; sin embargo, aunque se trata de una zoonosis, muchos animales se infectan pero no presentan síntomas y signos evidentes de infección ó daño y a las pocas semanas resuelven la infección (Tan, 2008) por lo que deberá buscarse un modelo *in vivo* novedoso en el que se pueda llevar a cabo la infección y que se realice un seguimiento de la parasitosis por algún tiempo, para presentar posteriormente un reto de infección y observar el establecimiento de la nueva infección evaluando la respuesta inmune humoral y celular.



**Figura 17.** Representación de estructuras poblacionales. En A y B, son poblaciones formadas por aislados separados por dos ramas principales. La estructura poblacional en A es clonal en todos los niveles, de tal forma que el dendograma es un árbol evolutivo, no hay recombinación intra e inter aislados en la misma rama o entre ramas diferentes del mismo árbol. En B, la recombinación no ocurre entre aislados de las dos ramas principales pero hay recombinación frecuente entre aislados de cada una de las ramas principales; la estructura dentro de estas ramas es por lo tanto de “tipo nido” y es representada por la sección ampliada de una de las ramas principales. En C, se muestra una estructura “epidémica” en la cual es frecuente la recombinación dentro de todos los miembros de la población, por lo que la estructura es una red más que un árbol; sin embargo, ocasionalmente aparecen individuos altamente exitosos y se incrementa rápidamente su frecuencia, produciéndose clonas epidémicas (imagen tomada de Smith *et al.*, 1993).

Sin embargo en nuestra población la presencia de co-infecciones de los ST1 y ST3, se deben de favorecer por algún factor que tengamos en común los mexicanos y que no se comparta con otras regiones del mundo, tal vez algún factor exclusivo de nuestra alimentación que mantenga a ambos ST ó una exposición continua a ambos ST.

Respecto a las bacterias identificadas en los pacientes con SII y en los controles, puede verse que pertenecen a la microbiota normal, excepto en el paciente que presentó *Salmonella paratyphi A* y un participante del grupo control en el que se identificó rotavirus. Entre los parásitos encontrados, llamó la atención la baja prevalencia de parásitos tradicionalmente endémicos y prevalentes en México, como *Giardia* y *Entamoeba histolytica/dispar* ya que si comparamos los resultados de los CPS obtenidos en este estudio con los datos existentes de finales del siglo pasado ([www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx)),

observamos que existe en general una disminución de los protozoarios, lo que sugiere un mejoramiento en los hábitos higiénicos y alimenticios de los ciudadanos.

Otro hallazgo que fue particularmente interesante, fue la asociación clara de *D. fragilis* con pacientes del grupo control ( $p=0.0004$ , OR=0.053, IC=0.007-0.415). Este hallazgo puede ser un generador de hipótesis sobre un probable efecto protector de la infección con *D. fragilis* al desarrollo del SII. Estos datos contrastan con los de otros estudios que lo han asociado al desarrollo de SII, sin embargo es posible que esto se deba a un sesgo de los participantes, ya que los pacientes con SII han tenido tratamiento antimicrobiano previo, principalmente por automedicación (comunicación personal con los médicos tratantes) pudiendo ser más sensible *D. fragilis* que *Blastocystis sp.* a estos fármacos. También se ha postulado la posibilidad de la existencia de variantes comensales y autóctonas de *D. fragilis*, sin embargo esto no se ha documentado ampliamente, por lo que se requiere de un estudio enfocado a este microorganismo, donde se analice su prevalencia en distintas regiones del mundo, así como sus variantes. (Windsor *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2007). Debido a que este microorganismo solo se ha documentado en humanos y existen pocos reportes que lo refieren como patógeno, es factible considerar la existencia de variantes comensales que sean más comunes que las variantes patógenas, en nuestra población. Es posible que *D. fragilis* presente alguna característica que disminuya el riesgo a presentar SII, ayudando en la digestión de los alimentos ricos en carbohidratos y lípidos (aunque hoy en día no se conoce mucho del metabolismo de este microorganismo), ó promoviendo la secreción de IgA (inmunoglobulina de defensa contra virus, bacterias y algunos protozoarios).

Actualmente se tiene un conocimiento limitado de pocos microorganismos como *Bifidobacterium lactis* Bb12(R), microorganismo que incrementa la secreción de IgA y ayuda a prevenir infecciones del tracto gastrointestinal, sobre todo las debidas a bacterias (Kabeerdoss *et al.*, 2011) (este tipo de microorganismos son un punto de estudio importante, sobre todo ante el SII PI). También existe el *Bifidobacterium infantis* 35624, el cual se ha observado alivia los síntomas del SII y normaliza la relación de IL10/IL12 (la cual en pacientes con SII, denotan una respuesta tipo Th1 pro-inflamatoria) (O'Mahony *et al.*, 2005). El microorganismo *Streptococcus thermophilus* nos da otra idea sobre una posible protección de *D. Fragilis* ante el SII, ya que se ha observado que *S. thermophilus* alivia los síntomas de la intolerancia a la lactosa y es que se ha documentado que este microorganismo presenta un metabolismo que le permite crecer en presencia de fuentes de lactosa, sacarosa, galactosa y glucógeno (Thomas *et al.*, 2011).

Probablemente las variantes de *D. Fragilis* presentes en nuestra población muestren fenómenos como los mencionados por los microorganismos *Bifidobacterium lactis* y, *Streptococcus thermophilus*. Será importante analizar el papel de *D. fragilis*, tanto como comensal y/o como patógeno, abarcando estudios epidemiológicos, de su metabolismo, ciclo de vida (ya que se desconoce la existencia de estadio quístico), de su distribución y su genética poblacional, así como su estudiar más a fondo su relación con el SII.

## CONCLUSIONES

- ✓ La frecuencia global de *Blastocystis* determinada por PCR fue del 23%.
- ✓ Se encontró en el 58% de los individuos con SII un microorganismo potencialmente patógeno como posible causa orgánica del SII.
- ✓ Aunque *Blastocystis* fue el parásito más frecuente (32%) entre los pacientes con SII, este microorganismo solo mostró una tendencia de asociación con este trastorno ( $p=0.0581$ ,  $OR=2.31$ ,  $IC=0.956-5.567$ ), por lo que es recomendable ampliar el tamaño de muestra para aclarar ó desechar esta asociación.
- ✓ Encontramos que los subtipos de *Blastocystis* más comunes en nuestra población fueron los ST1 y ST3. Llamó la atención que estos subtipos se presentaron principalmente en co-infección, lo que contrasta con lo que ocurre en otras partes del mundo en donde, si bien estos subtipos son los más frecuentes, generalmente se les identifica en infecciones únicas.
- ✓ Es importante establecer el uso de marcadores moleculares confiables para la subtipificación de *Blastocystis* y con ello, ayudar a aclarar el papel patógeno ó comensal de los haplotipos de este microorganismo.
- ✓ Existe un pobre conocimiento sobre la estructura genética poblacional de *Blastocystis* sp., por lo que trabajos futuros deben encaminarse a su caracterización y podrán impactar en su epidemiología y control, ya que la diversidad genética dentro y entre las poblaciones de parásitos es la que determina los cambios genéticos futuros y los procesos de diferenciación, adaptación y especiación.
- ✓ El presente estudio genera una nueva hipótesis que sugiere que la presencia de *D. fragilis* como factor protector ante el SII ( $p=0.0004$ ,  $OR=0.053$ ,  $IC=0.007-0.415$ ), lo cual debe ser investigado.

## Anexo 1

### Carta de consentimiento informado.

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con La ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como riesgo mínimo o mayor de acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los siguientes aspectos mencionados con el Artículo 21:

I. En México, el Síndrome de Intestino Irritable es enfermedad que afecta al 12% de la población en general. Por otra parte, la información que se tiene sobre los aspectos clínicos y epidemiológicos de la blastocistosis por *Blastocystis hominis* es limitada, no obstante se ha incrementado el número de personas que son diagnosticados como portadores de este parásito diariamente en los laboratorios de parasitología. Por ello, el estudio titulado “Síndrome de Intestino Irritable, genotipos de *Blastocystis hominis* y polimorfismos de los alelos del TNF $\alpha$  y de la IL-8” considero que es importante y deseo participar en el.

II. Se me ha informado que me tomarán 15 ml de sangre y que traeré tres muestras de heces, estas muestras son adicionales al estudio que requiere mi enfermedad. Además se me practicarán mediciones corporales que son totalmente inofensivas. Como apoyo al diagnóstico, ES PROBABLE que se me realice una colonoscopia, la cual se realizará en la División de Gastroenterología de este hospital con los lineamientos y recomendaciones de la propia división y cuyos riesgos se me explicarán ampliamente por los médicos especialistas que la llevarán a cabo.

III. Se me explicó que la toma de sangre se realizará con una aguja y jeringa pequeña; sin embargo puede dar como resultado moretones, sangrados e infección, estos se resolverán con las indicaciones del médico en término de una o 2 semanas.

IV. Los resultados de este estudio ayudarán a determinar el mejor tratamiento para el Intestino Irritable como en mi caso o en el de otros pacientes.

V. Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con el estudio y mi participación

VI. Se me aclaró que puedo abandonar el estudio en cuanto yo lo decida, sin que ello afecte mi atención de parte del médico o del hospital

VII. Autorizo la publicación de los resultados de mi estudio a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o revelará mi identidad.

Con fecha \_\_\_\_\_, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación en el proyecto, y reitero que **ACEPTO participar en el estudio titulado: “Síndrome de Intestino Irritable, genotipos de *Blastocystis hominis* y polimorfismos de los alelos del TNF $\alpha$  y de la IL-8: Estudio de casos y controles”**

Nombre, y firma del testigo 1  
Dirección  
Relación que guarda con el paciente

Nombre, y firma del testigo 2  
Dirección  
Relación que guarda con el paciente

Nombre y firma del Investigador Responsable o Principal

Este documento se extiende por duplicado, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y el otro en poder del investigador.

Para preguntas o comentarios comunicarse con el Dr. Pablo Maravilla, investigador responsable de este proyecto en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” al (01 55) 4000-3000.

## Anexo 2

### Secuencias de un fragmento de 560 pb de la SSUrDNA de *Blastocystis*

Secuencia 1: Control 3, 560 pb

GGTAGTTGGGTGATCGCTATTGTGAGACTTCGGTCTCTCGATAGTAAGTCACCCCCTTCCAGT  
ATCCAGTAGTGGGTATTCCAGTTACTTACTATTGTGTGTTGGTCCTTTACTGTGAGAAAATTAGAG  
TGTTCAAAGCAGGCGTTTGCTTGAATAGATTAGCATGGAATAATAATTGAAGGCTTTCGTGTTT  
GATTTGATTGGTTTGTTCATGGAAGCAAGGTTAAAAGGAACAGTTGGGGGTATTCATATTTACT  
AGTTAGAGGTGAAATTCTCGGATTTATGGAAGATGAACAAGTGCGAAAGCATTACCAAGGATG  
TTTTCATTAATCAAGAACGAAAGCTAGGGGATCGAAGAGGATTAGATACCCTCGTAGTCTTAGC  
TATAAACGATACCGACTAGGGTTAGTAGAGGTCAAAGTGCTTTATTAGTACCTTATGAGAAA  
TCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGACGGA  
AGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAACTTACCAGG  
ACCAGCATTAAAGGAAGGAGGG

Secuencia 2: Síndrome 29, 560 pb

CCCTGTCCTTACGACGTAGCATGTGTATGAGACATTCGTGTATTTTGTATTCAAGTATCCTCCT  
TCTAAATTCGATATATGAGTATTAATTTACTTGTATATGGTTTTAGACTTTTACTGTGAGAAAATT  
AGAGTGTTCAAAGCAGGCATTTGCTTGAATATATTAGCATGGAATAATCATGTATGATTTTCATG  
ATGTATTTGATTGGTTTGGTTGATGAGAATAAGATTAAGGGACAGTTGGGGGTATTCATATT  
CAATAGTCAGAGGTGAAATTCTCGGATTTATGGAAGATGAACAAGTGCGAAAGCATTACCAAG  
GATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGAGGATTAGATACCCTCGTAGTCT  
TAACTATAAACGATACCGACTAGAGGTTAGTGAAGGTCATTGTGTCTTGACTAGTATCTTATGA  
GAAATCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGA  
CGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACCTTAC  
CAGGACCAGCATAAGGAAAGG

Secuencia 3: Síndrome 3, 560pb

CGTACTTCGTGCGTCTATAGACGCGGAAGCCTCAGGGGCGATGCTGTGGATCGGGACCATC  
CTCGAGGAGAACATATCTGTCATTGAGTTGATGGGTATGGGACCCTCGTCATTTACTGTGAGC  
AAAATAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCGTTGAATACATTAGCATGGAATAATAAGATAGGA  
CCTTGGTCTATTTTGTGGTTATACTCCGAGGTAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCCG  
TATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGATTTATGGAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTAC  
CAAGGATGTTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTA  
GTCTTAACCATAAACTATGCCGACTAGGGATTGGTGGGTGTTATTAGCGACTCCATCAGCACCT  
TATGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGAA  
ATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAA  
CTTACCAGGACCAGCATTAGGGAAGGA

### Anexo 3

#### Secuencias de 310 pb de la SSUrDNA de *Blastocystis*.

La secuencia inicial se obtuvo por duplicado para corroborar el grado de fidelidad de la secuenciación. De la secuencia número 2 (Control 1') en adelante solo se distinguen los nucleótidos que son diferentes a la secuencia de referencia, la cual es Control\_1\_\*560pb'.

'Control\_1\_\*560pb'

TCTGTCCCTTAGGTCCGGGCTGCGCGGACCTTCTTCAACAGTGGCTGAATCGATAATTGCAATTTA  
AGAACGTGATGGGGTGATCTGTAAAACGTCATGAAGAGGAATTCTATATGCAGTCATCAACTGCGTT  
AGCCCTGCCTTGAAACCCCGTCGATACATTGATGGTCCATGAACACTTAATTTTG

'Control\_1'

.....  
.....

'Control\_2'

.....  
.....

'Control\_3'

.....  
.....GT.....

'Control\_4'

.....  
.....G.....

'Control\_5'

.....  
.....G.....

'Control\_6'

.....  
.....G.....

'Control\_7'

.....  
.....T.....

'Control\_8'

.....  
.....G.....

'Control\_9'

.....  
.....G.....

'Control\_10'

.....  
.....G.....

'Control\_11'

.....G.....

'Control\_12'

.....G.....

'Sindrome\_1'

.C..GGAC.....G..A.....C.....  
.....G....T

'Sindrome\_2'

.....G.....

'Sindrome\_3'

.....G.....

'Sindrome\_4'

.....

'Sindrome\_5'

.....G.....

'Sindrome\_6'

.....G.....

'Sindrome\_7'

.....

'Sindrome\_8'

.....GT.....

'Sindrome\_9'

.....T.....

'Sindrome\_10'

.....G.....

'Sindrome\_12'

AACCAGTGGGGA.A.TAAAGG.ACAAT.GT....C.TTTA.TGAATCCCCC.TT.T....CT.....C  
C.....G....AA

## Anexo 4

### Secuencias usadas en la reconstrucción filogenética:

Se uso como referencia la secuencia Control 1, la cual es idéntica a la secuencia AM118078, solo se resaltan los nucleótidos diferentes a las secuencias de referencia.

```
'AM118078.1_Dinamar'
.....
.....G.....

'AM117938.1_Dinamar'
.....T.....CT.....G.....TG.....C.....G.GAG.....CT...TGT.A.....C.....
A.....G...AA
'AM118079.1_Dinamar'
.....G.....A...GG...G.C...C...C.....T...T.T.A.....
.....G...AA
'AB023499.1_descono'
.....T.....CT.....G.....GG...G.C.....G.GAG.....CT...TGT.A.....C.....
A.....G.....G...GAT
'AB023578.1_descono'
.....T.....A.....CT...GA...GG...G.C...G.GAG.....CT...TGT.A.....C.....
A.....G.....G...GAT
'AB070986.1_descono'
A.....
.....G.....
'AB070987.1_descono'
.....T.....CT.....G.....TG.....C.....G.GAG.....CT...TGT.A.....C.....
A.....G.....G...AC
'AB070988.1_descono'
.....
.....G.....
'AB070989.1_descono'
.....T.....CT.....G.....GG...G.C.....G.GAG.....CT...TGT.A.....C.....
A.....G.....G...GAT
'AB070990.1_descono'
.....T.....ACT...G...TG.....C.G...AGT.....CT...TTT.A.....C.....
A.....A.G.....G...CA
'AB070991.1_descono'
.....T.....ACT...G..AT...G.....C.G...AGT.....CT...TTT.A.....T.....
.....G.A..G.....G....T
'AB070992.1_descono'
.....
.....G.....
'AB091233.1_Japon_B'
.....
.....G.....
'AB091234.1_Japon_B'
.....
.....G.....
'AB091235.1_Japon_B'
.....
.....G.....
```

'AB091236.1\_Japon\_B'  
.....T.....ACT.....G.....TG.....C.G.....AGT.....CT...TTT.A.....C.....  
A.....A.....G.....G...CA

'AB091237.1\_Japon\_B'  
.....T.....ACT.....G.....TG.....C.G.....AGT.....CT...TTT.A.....C.....  
A.....A.....G.....G...CA

'AB091238.1\_Japon\_B'  
.....T.....ACT.....G.....TG.....C.G.....AGT.....CT...TTT.A.....C.....G..  
.A.....A.....G.....G...CA

'AB091239.1\_Japon\_B'  
.....T.....ACT.....G..AT...G.....C.G.....AGT.....CT...TTT.A.....  
.....G..A..G.....G...T

'AB091240.1\_Japon\_B'  
.....T.....CT.....G.....GG...G.C.....G.GAG.....CT...TGT.A.....C.....  
.A.....G.....G...GAT

'AB091241.1\_Japon\_B'  
.....T.....CT.....G.....GG...G.C.....G.GAG.....CT...TGT.A.....C.....  
.A.....G.....G...GAT

'AF408425.2\_Japon\_B'  
.....T.....ACT.....G.....TG.....C.G.....AGT.....CT...TTT.A.....C.....  
A.....A.....G.....G...CA

'AF408426.2\_Japon\_B'  
.....T.....ACT.....G.....TG.....C.G.....AGT.....CT...TTT.A.....C.....  
A.....A.....G.....G...CA

'AF408427.1\_Singapu'  
.....T.....A.....ACT.....G..AT...G.....C.G.....AGT.....CT...TTT.A.....G..  
.....G..A..G.....G...T

'AF439782.2\_Tailand'  
.....T.....CT.....G.....GG...G.C.....G.GAG.....CT...TGT.A.....C.....  
.A.....C.T.....G...C...G...GAT

'AF538348.1\_Tailand'  
.....T.....CT.....G.....GG...G.C.....G.GAG.....CT..A.TTT.A.....C.....  
.A.....A.....G.....G...CT

'AY244619.1\_Alemaní'  
.....G.....A...GG...G.C...C...C.....T...T.T.A.....  
.....G...GA

'AY244620.1\_Alemaní'  
.....G.....A...GG...G.C...C...C.....T...T.T.A.....  
.....G...GA

'AY244621.1\_Japon\_B'  
.....G.....A...GG...G.C...C...C.....T...C.T.A.....  
.....G...GA

'AY590105.1\_dfi\_hos'  
.....T.....ACT.....G..AT...G.....C.G.....AGT.....CT...TTT.A.....  
.....G..A..G.....G...T

'AY590106.1\_dfi\_hos'  
.....T.....ACT.....G..AT...G.....C.G.....AGT.....CT...TTT.A.....  
.....G..A..G.....G...T

'AY590107.1\_dfi\_hos'  
.....T.....ACT.....G..AT...G.....C.G.....AGT.....CT...TTT.A.....  
.....G..A..G.....G...T

'AY590108.1\_dfi\_hos'  
.....A.T.....TACT.....G..AT...G.....C.G.....AGT.....CT...TTT.A.....  
.....G..A..G.....G...T

'AY590109.1\_dfi\_hos'  
 .....T.....ACT....G..AT...G.....C..G.....AGT.....CT...TTT.A.....  
 .....G..A..G.....G....T  
 'AY590110.1\_dfi\_hos'  
 .....T.....CT....G.....GG...G..C.....G..GAG.....CT...TGT.A.....C.....  
 ..A.....G.....G...GAT  
 'AY618265.1\_Tailand'  
 .....T.....CT....G.....TG.....C.....G..GAG.....CT...TGT.A.....C.....  
 A.....G.....G...AC  
 'AY618266.1\_Tailand'  
 .....T.....CT....G.....GG...G..C.....G..GAG.....CT...TGT.A.....C.....  
 ..A.....G.....G...GAT  
 'FJ809939.1\_China\_B'  
 .....T.....ACT....G.GTT...G.....C..G.....AGT.....CT...TTT.A.....  
 .....G..A..G.....G....C  
 'U51151.1\_16s\_natur'  
 .....T.....CT....G.....GG...G..C.....G..GAG.....CT...TGT.A.....C.....  
 ..A.....G.....G...GAT  
 'DQ366343.1\_China\_B'  
 .....T.....ACT....G.GTT...G.....C..G.....AGT.....CT...TTT.A.....  
 .....G..A..G.....G....C  
 'EF079872.1\_China\_B'  
 .....T.....ACT....G.GTT...G.....C..G.....AGT.....CT...TTT.A.....  
 .....G..A..G.....G....GC  
 'EF468654.1\_China\_B'  
 .....T.....CT.....A.....T.....AG.....CT..A.TTT.A.....C.....A.....  
 .....A..G.....G...CT  
 'EU082109.1\_China\_B'  
 .....T.....ACT....G.GTT...G.....C..G.....AGT.....CT...TTT.A.....  
 .....G..A..G.....G....GC  
 'gi|1304397|gb|U371'  
 .....T.....C...T.AC..A.AT.AAT...TGA...A..ATTGCTGACAG.GGGCTCATGAAAATATATCATTG  
 GATAGGCTGCAAT.ATTATCTTGAAGAGACCCTGTAAGGGT.AGCATCACCTGAATAGCCCGCTT  
 TTAACACGCGTCACCTCC.ATT.ATG.TGAGG..AAGA.

**Anexo 5**  
**Haplotipos encontrados en la SSUrDNA de *Blastocystis* sp.**

Subtipo:	Haplotipo:
3	Hap_1: 5 [Control_1_560pb Control_1 Control_2 Sindrome_4 Sindrome_7]
3	Hap_2: 2 [Control_3 Sindrome_8]
3	Hap_3: 19 [Control_4 Control_5 Control_6 Control_8 Control_9 Control_10 AM118078.1_Dinamarca Control_11 Control_12 Sindrome_2 Sindrome_3 Sindrome_5 Sindrome_6 Sindrome_10 AB070988.1_desconoci AB070992.1_desconoci AB091233.1_Japon_B_h AB091234.1_Japon_B_h AB091235.1_Japon_B_h]
3	Hap_4: 2 [Control_7 Sindrome_9]
3	Hap_5: 1 [Sindrome_1]
3	Hap_6: 1 [Sindrome_12]
5	Hap_7: 1 [AM117938.1_Dinamarca]
6	Hap_8: 1 [AM118079.1_Dinamarca]
1	Hap_9: 7 [AB023499.1_desconoci AB070989.1_desconoci AB091240.1_Japon_B_h AB091241.1_Japon_B_h AY590110.1_dfi_hosp_ AY618266.1_Tailandia U51151.1_16s_nature_]
1	Hap_10: 1 [AB023578.1_desconoci]
3	Hap_11: 1 [AB070986.1_desconoci]
5	Hap_12: 2 [AB070987.1_desconoci AY618265.1_Tailandia]
4	Hap_13: 5 [AB070990.1_desconoci AB091236.1_Japon_B_ho AB091237.1_Japon_B_h AF408425.2_Japon_B_h AF408426.2_Japon_B_h]
2	Hap_14: 1 [AB070991.1_desconoci]
4	Hap_15: 1 [AB091238.1_Japon_B_h]
2	Hap_16: 5 [AB091239.1_Japon_B_h AY590105.1_dfi_hosp_ AY590106.1_dfi_hosp_ AY590107.1_dfi_hosp_ AY590109.1_dfi_hosp_]
2	Hap_17: 1 [AF408427.1_Singapur_]
1	Hap_18: 1 [AF439782.2_Tailandia]
-----	Hap_19: 1 [AF538348.1_Tailandia]
6	Hap_20: 2 [AY244619.1_Alemania_ AY244620.1_Alemania_]
6	Hap_21: 1 [AY244621.1_Japon_B_h]
2	Hap_22: 1 [AY590108.1_dfi_hosp_]
2	Hap_23: 2 [FJ809939.1_China_B_h DQ366343.1_China_B_h]
2	Hap_24: 2 [EF079872.1_China_B_h EU082109.1_China_B_h]
-----	Hap_25: 1 [EF468654.1_China_B_h]
-----	Hap_26: 1 [gi 1304397 gb U37108] ( <i>Proteromonas</i> )

## *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population

Diego Emiliano Jimenez-Gonzalez · Williams Arony Martínez-Flores · Jesus Reyes-Gordillo · María Elena Ramírez-Miranda · Sara Arroyo-Escalante · Mirza Romero-Valdovinos · Damien Stark · Valeria Souza-Saldivar · Fernando Martínez-Hernández · Ana Flisser · Angelica Olivo-Díaz · Pablo Maravilla

Received: 3 May 2011 / Accepted: 12 August 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** In recent times, some common “non-pathogenic” parasites, such as *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis*, have been associated to the aetiology of irritable bowel syndrome (IBS), while host pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms might have a role in the pathophysiology of the disease. Therefore, *Blastocystis* subtypes (ST), *D. fragilis* and gene promoter single nucleotide polymorphisms of interleukin-6 (IL-6) and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in IBS patients and controls were studied. After giving written consent, 45 patients with symptoms of IBS according to the Rome III criteria and 45

controls were enrolled. DNA was extracted from peripheral blood for SNP analysis at position -174 for IL-6 as well as -238 and -308 for TNF- $\alpha$ . *Blastocystis* was more common in the IBS group ( $p=0.043$ ). Interestingly, *D. fragilis* was found more frequently in the control group ( $p=0.002$ ); *Blastocystis* ST1 and 3 were most frequent in both groups. Haploview analysis revealed linkage disequilibrium in TNF- $\alpha$  ( $p<0.0001$ ); however, none of the SNPs for IL-6 and TNF- $\alpha$  were found to be significantly related with IBS. The clinical and molecular approaches undertaken for the first time in Latin American IBS patients demonstrated an association with *Blastocystis* that supports a pathogenic role of this parasite in IBS. Furthermore, co-infections with ST1 and ST3 were frequent; thus, the genetic diversity proposed within ST polymorphisms does not rule out that particular strains might be associated with disease. In addition, our results do not support a major contribution of IL-6 and TNF- $\alpha$  gene polymorphisms in the susceptibility to IBS.

D. E. Jimenez-Gonzalez · W. A. Martínez-Flores · J. Reyes-Gordillo · M. E. Ramírez-Miranda · M. Romero-Valdovinos · F. Martínez-Hernández · A. Olivo-Díaz · P. Maravilla (✉)  
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”,  
Dirección de Investigación,  
México, DF 14080, México  
e-mail: maravillap@yahoo.com

S. Arroyo-Escalante  
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”,  
Laboratorio Clínico,  
México, DF 14080, México

D. Stark  
Department of Microbiology, St Vincent’s Hospital,  
Darlinghurst 2010 NSW, Australia

V. Souza-Saldivar  
Instituto de Ecología,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
México, DF 04510, México

A. Flisser  
Departamento de Microbiología y Parasitología,  
Facultad de Medicina,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
México, DF 04536, México

### Introduction

Irritable bowel syndrome (IBS) is a functional disorder in which abdominal pain or discomfort is associated with a change in bowel habits and disordered defecation (Longstreth et al. 2006). The pathophysiology of IBS remains poorly understood, and no mechanism is unique to, or characteristic of, IBS (Gasbarrini et al. 2008). Several factors occur in IBS patients that account for clinical symptoms. These include altered gut reactivity (colonic and/or small-bowel motility) in response to luminal or psychological stimuli and visceral and gut hypersensitivity, with enhanced visceral perception and pain (Thompson et al. 2000; Stark et al. 2007).

The pathogenic role of *Blastocystis* is still controversial because it is found not only in individuals with enteric

symptoms but also in healthy and asymptomatic subjects (Boorom et al. 2008; Tan 2008; Stensvold et al. 2009a; Stark et al. 2010). In addition, *Dientamoeba fragilis* has been reported to cause IBS-like symptoms and has a propensity to remain as a chronic infection, but has never been reported in Mexico, probably because its diagnosis relies on techniques which fail to identify most positive cases. PCR testing of genomic DNA extracted from faeces has been shown to identify more cases (Stark et al. 2010). However, PCR analysis of stool specimens is not commonly available in most clinical settings (Stark et al. 2007, 2010; Yakoob et al. 2010a).

Due to extensive genetic diversity within the genus *Blastocystis*, differences in the genetic make-up of this microorganism are thought to be associated with the clinical outcome of infections (Li et al. 2007a; Dogruman-Al et al. 2008; Tan 2008; Yakoob et al. 2010a, b). On the other hand, considering the pathophysiology of IBS, it has been suggested that host pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms might be important within coding and promoter regions of cytokine genes (Melk et al. 2003). Studies performed in Dutch and Iranian IBS patients (matched with healthy control subjects) demonstrated that certain genetic polymorphisms related to several pro-inflammatory interleukins were associated with susceptibility to this disease (van der Veek et al. 2005; Barkhordari et al. 2010a, b). The purpose of the present study is to analyse if there is an association of IBS with these two parasites and, if so, if there is a further relation with *Blastocystis* subtypes (ST) or with IL-6 and TNF- $\alpha$  cytokine polymorphisms.

## Materials and methods

### Subjects

Patients who had attended the gastroenterology clinic of the Hospital General "Dr. Manuel Gea Gonzalez" between January 2008 and July 2009 were recruited. This case-control study was reviewed and approved by the Ethical and Research Committee of the hospital. Cases consisted of patients with normal colonoscopy and symptoms of IBS according to the Rome III criteria. These criteria require recurrent abdominal pain or discomfort at least 3 days/month in the last 3 months associated with two or more of the following: (1) improvement with defecation, (2) onset associated with a change in frequency of stool deposition, (3) onset associated with a change in form or appearance of stools and were defined as patients (Longstreth et al. 2006). The control group consisted of individuals with bowel alterations, i.e. polyps, diverticular disease and haemorrhoids, but not with IBS. Exclusion criteria for both groups were presence of intestinal viruses (such as adenovirus or rotavirus) or bacteria that cause diarrhoea and parasites other than *Blastocystis* and *D. fragilis*, such as

*Entamoeba histolytica/dispar*, *Giardia*, *Endolimax* and *Hymenolepis*; presence of an organic cause of disease; evident psychological alterations; social problems; pregnancy; dependence on analgesics; ulcerative colitis; tumours or diverticulitis. Written informed consent was obtained from all patients. All participants provided faecal and blood samples for microbiological and molecular tests. All study participants were diagnosed and treated by the same two gastroenterologists.

### Coprological and PCR analyses for parasites and *Blastocystis* subtypes

Colonoscopies were carried out in each patient after medical informed consent was obtained, and biopsies were performed cases of any abnormal findings. During colonoscopy, liquid stools were aspirated and used for coproparasitologic analysis by Faust's technique for detection of cysts and ova (Guimarães and Sogayar 1993; Rodriguez et al. 2008). To complete serial coproparasitologic analysis, two other faecal samples were obtained. Also, *Rotavirus* and *Adenovirus* were screened using a commercial rapid test (VIKIA, Rota-Adeno, BioMérieux, France), and identification of possible pathogenic enterobacteria was performed using a MicroScan system (Siemens, UK). PCR was performed on DNA from all stool aspirates to identify *Blastocystis*, *D. fragilis* and, in positive PCR samples, *Blastocystis* ST. Briefly, DNA was extracted from stool by using Puregene DNA Purification System (Gentra Systems, Germany) according to the manufacturer's protocol and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Primers and PCR amplification conditions were as described for detection of *Blastocystis* and *D. fragilis* in stool (Stensvold et al. 2006 and Stark et al. 2005, respectively). For *Blastocystis* ST identification, seven standardized subtype-specific primers and PCR procedures were used (Yoshikawa et al. 2000, 2003, 2004a, b; Yan et al. 2006; Li et al. 2007b; Yakoob et al. 2010b) and adjusted to the terminology recently proposed (Stensvold et al. 2007). To corroborate *Blastocystis* ST profile, the amplicon of approximately 632 bp, which corresponds to a central fragment of the internal region of the small subunit rRNA (SSUrDNA) gene, was obtained for four samples in which enough DNA was recovered, purified and submitted to sequencing; primers used were F2/598 (5'-GCTTATCTGGTTGATCCTGCCAGTAGT-3') and R2/1230 (5'-CCTTCCTATGTCCTGGCTGCTAAG-3'), which were designed based on the sequence data for the SSUrDNA of *Blastocystis* in the US National Center for Biotechnology Information nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### Genotyping of IL-6-174 and TNF- $\alpha$ -238 and -308

Host DNA was obtained from 10 mL EDTA-peripheral blood using proteinase K and phenol/chloroform extraction (Sambrook et al. 2001). The TNF- $\alpha$ -308 polymorphism

was detected with a restriction fragment length polymorphism technique. PCR was performed using primers TNF-1 (5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT3') and TNF-2 (5'-TCCTCCCTGCTCCGATCCG-3'). Restriction of the PCR product with *NcoI* defined two alleles: TNF-1 (G)=107 bp and TNF-2 (A)=87 and 20 bp. The digested products were separated on a 6% 19:1 acrylamide/bisacrylamide gel, and bands were visualized with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and UV light (Fajardo-Dolci et al. 2006). Typing of the TNF- $\alpha$ -238 (rs361525) polymorphism was achieved by PCR with the primers TNF-2-1 (5'-CCCCTCCAGTTC-TAGTTCTATC-3') and TNF-1-2 (5'-AAGCGG-TAGTGGGCCCTGC-ACCTT-3') that generate a 308-bp fragment (Camarena et al. 2001) and with the probes TNF-238-G (5'-GGAATCGGAGCAGGGA-3') and TNF-238-A (5'-GGAATCAGAGCAGGGA-3') (Fajardo-Dolci et al. 2006). The IL-6-174 (rs1800795) polymorphism was typed with the primers IL-6 (-174)F (5'-AATGACGACC-TAAGTGCACCTT-3') (Minton et al. 2005) and RIL-6 (5'-AGGAGTTCAATAGCTGGG-CTCCTGGAG-3') which generate a 290-bp fragment, and with the probes IL-6-G (5'-GTCTTGCGATGCTAAAG-3') and IL-6-C (5'-GTCTTGCCATGCTAAAG-3') (Meenagh et al. 2002). Probes were digoxigenin-11-ddUTP labelled and alleles identified by dot-blot analysis with chemiluminescence.

### Statistical analysis

Descriptive statistics are expressed as mean and standard deviation (SD). Analysis by Student's *t* test, Mantel-Haenszel test or Fisher's exact test, two tail (when the expected frequency in at least one cell was less than 5), were applied; odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) were also obtained. Data analysis was performed with Epi-Info6 v6.04 software and Primer of Biostatistics software (Glantz 1992). Arlequin Program version 2000 was used for the linkage disequilibrium analysis (Schneider et al. 2000). Allele frequencies (AF) and genotype frequencies (GF) were calculated by direct counting of alleles and were compared between patients and controls.

### Results

#### Subjects and colonoscopy outcomes

Both the IBS and control groups were predominantly female. The male-female ratio in the IBS group was 1:4, while it was 1:2 in the control group. No further statistical differences in age and gender were found between the two groups. Constipation-predominant IBS (IBS-C) was the most frequent IBS clinical subtype (64%), while alternating diarrhoea and

constipation (IBS-A) was the least frequent (12%). These presentations may change with time (Longstreth et al. 2006); thus, no special consideration was given. Regarding the colonoscopies in the control group, most presented a normal study (65%), followed by polyps, diverticulosis and, finally, haemorrhoids (Table 1).

#### Microorganisms found and *Blastocystis* subtypes

Table 1 also summarizes the microbiota found; *Blastocystis* was present in 31% of the IBS group and in 13% of the control; statistical analysis showed an association with IBS group ( $p=0.043$ ); in contrast, *D. fragilis* was found in 2% of the IBS group and in 27% of the control, showing a statistical association with the control group ( $p=0.002$ ). Frequencies were obtained before anti-parasitic treatment was provided. Only one patient of the control group presented co-infection of *Blastocystis* and *D. fragilis*. Although no association of gender/parasite between IBS and control group was found, the relationship *D. fragilis*/male showed a statistical association ( $p=0.036$  by Fisher's exact test, two tail; OR=0.24; 95% CI=0.06-0.95). Patients with parasitic infections other than *Blastocystis* and *D. fragilis* as defined in a series of three faecal exams were excluded from the study. PCR for *Blastocystis* and *D. fragilis* presented characteristic diagnostic amplicons of ~310 pb and ~850 pb respectively, as well as those corresponding to *Blastocystis* ST1 (~351 pb) and 3 (~526 pb). Sequences corresponded to ST1 and ST3 and were similar between IBS and control groups; interestingly, many of *Blastocystis* carriers exhibited co-infection by ST1 and ST3 while ST2 was identified only in one case of the IBS group. The presence of IBS did not correlate to any particular subtype or sequence, though the sequences showed that ST exhibited an identity of >98% with those of other countries. Regarding bacteria found, *Escherichia coli* was identified in >86% of participants; 2nd and 3rd places in frequency were *Klebsiella* and *Pseudomonas*.

#### Genotyping of IL-6-174, TNF- $\alpha$ -238 and -308

After extraction and purification of DNA, only 78 samples presented the quality and adequate concentration for SNP analysis. General comparison of IL-6-174 and TNF- $\alpha$ -238 and -308 polymorphisms between IBS and control groups is shown in Table 2. AF and GF were similar in both groups, being the most frequent alleles IL6-174 G (IBS 93%, control 89%), TNF-238 G (IBS 97%, control 96%) and TNF-308 G (IBS 97%, control 96%). With respect to genotypes, the highest frequencies were found in IL-6-174 G/G, TNF-238 G/G TNF-308 G/G in both groups. No statistical significance was detected in any polymorphism; however, a linkage disequilibrium between the -238 and -308 SNP between IBS and control groups was found ( $p<0.0001$ ).

**Table 1** Demographic, clinical characteristics and microbiological findings in IBS patients and in the control group

Characteristic	Frequency		p value	OR (95% CI) <sup>a</sup>
	IBS group	Control group		
Age, years (mean±SD)	46.5±14.3	42.2±14.4	0.063 <sup>b</sup>	(-11.71-0.31)
Female/Male, n	36/9	30/15	0.154 <sup>c</sup>	2.0 (0.70-5.82)
	IBS clinical subtype, %			
Constipation	64			
Diarrhoea	24			
Diarrhoea-constipation	12			
	Coloscopy findings, %			
Normal colonoscopy	100	64.6		
Polyps	0	13.3		
Diverticulosis	0	13.3		
Haemorrhoids	0	8.8		
<i>Dientamoeba</i> (%)	1 (2.2)	12 (26.6)	0.002 <sup>d</sup>	0.06 (0-0.47)
Female/Male with <i>Dientamoeba</i> , n	0/1	6/6	1.000 <sup>d</sup>	(0-23.4)
<i>Blastocystis</i> (%)	14 (31.1)	6 (13.3)	0.043 <sup>c</sup>	2.9 (0.92-10.34)
Female/Male with <i>Blastocystis</i> , n	12/2	3/3	0.131 <sup>d</sup>	6 (0.46-101.87)
ST1	2 (14.3)	0	0.247 <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>
ST2	1 (7.1)	0	1.000 <sup>d</sup>	ND
ST3	2 (14.3)	3 (50)	1.000 <sup>d</sup>	0.65 (0.05-6.01)
ST1+3	8 (57.2)	3 (50)	0.197 <sup>d</sup>	3.03 (0.66-18.79)
ST1+2	1 (7.1)	0	1.000 <sup>d</sup>	ND
	Microbiota (%)			
<i>Escherichia coli</i>	39 (86.6)	43 (95.5)	0.266 <sup>d</sup>	0.03 (0.03-1.84)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5 (11.1)	4 (8.8)	1.000 <sup>d</sup>	1.28 (0.27-6.22)
<i>Proteus mirabilis</i>	3 (6.6)	1 (2.2)	0.616 <sup>d</sup>	3.14 (0.24-81.71)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (4.4)	4 (8.8)	0.676 <sup>d</sup>	0.48 (0.06-3.28)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (2.2)	2 (4.4)	1.000 <sup>d</sup>	0.49 (0.02-7.26)
<i>Citrobacter koseri</i>	1 (2.2)	0	1.000 <sup>d</sup>	ND
<i>Enterococcus</i> sp	0	1 (2.2)	1.000 <sup>d</sup>	ND
<i>Providencia alcaligenes/heittgeri</i>	1 (2.2)	4 (8.8)	0.360 <sup>d</sup>	0.23 (0.01-2.37)
<i>Morganella morganii</i>	0	1 (2.2)	1.000 <sup>d</sup>	ND

<sup>a</sup>Odds ratio (95% confidence interval)

<sup>b</sup>Student's *t* test

<sup>c</sup>Mantel-Haenszel test

<sup>d</sup>Fisher's exact test

<sup>e</sup>Not determined

Comparisons were performed between subgroups that included: patients only with IBS, with IBS and *Blastocystis*, only with *Blastocystis* or *D. fragilis* and without IBS, *Blastocystis* or *D. fragilis* vs. IL-6 and TNF- $\alpha$  polymorphisms and are summarized in Table 3. No significant associations were observed in the subgroups.

## Discussion

In our knowledge, there are no frequency data of *Blastocystis* and/or *D. fragilis* obtained by PCR in Latin American patients. In a previous study performed by coproparasitological studies, *Blastocystis*, *Endolimax nana* and *E. histolytica*/*E. dispar* were found in 16%, 9% and 3% of the IBS cases, respectively (Ramirez-Miranda et al. 2010), indicating that *Blastocystis* is the parasite found with

higher prevalence. Regarding the importance of identifying *Blastocystis*, Spiegel and colleagues (2010) discuss the lack of need for ova and parasite examinations in patients with symptoms of diarrhoea-predominant IBS, because of low prevalence and/or low technical sensitivity. However, in the present paper, *Blastocystis* was found in 31% of Mexican IBS patients, indicating that Spiegel's line of thought should not be followed particularly in endemic areas and when modern and sensitive techniques are available.

The fact that more males were enrolled suggests that this gender is more susceptible to infection by *D. fragilis*, as occurs in some human populations infected with *E. histolytica* and *Schistosoma haematobium* (Shamsuzzaman and Hashiguchi 2002; Agnew-Blais et al. 2010). The average age of IBS patients (47±14) in the study was higher than the median age of the Mexican population (26 years, INEGI 2010). A similar value was obtained by Schulson and

**Table 2** Allele and genotype frequencies of IL-6 and TNF- $\alpha$  promoter at -174, -238 and -308 positions, respectively

	IBS group (n=36)	Control group (n=42)	p value <sup>a</sup>	OR (95% CI) <sup>b</sup>
<b>Alleles</b>	<b>AF<sup>c</sup> (%)</b>	<b>AF (%)</b>		
IL-6-174(G)	93.1	89.0	0.38	1.65 (0.47–6.01)
IL-6-174(C)	6.9	11.0		0.61 (0.17–2.11)
TNF-238(G)	97.3	96.5	0.78	1.30 (0.17–11.49)
TNF-238(A)	2.7	3.5		0.77 (0.09–5.86)
TNF-308(G)	97.3	96.5	0.78	1.30 (0.17–11.49)
TNF-308(A)	2.7	3.5		0.77 (0.09–5.86)
<b>Genotypes</b>	<b>GF<sup>d</sup> (%)</b>	<b>GF (%)</b>		
IL-6-174(G/G)	86.1	78.0	0.36	1.74 (0.46–6.84)
IL-6-174(C/C)	0	0	ND <sup>e</sup>	ND
IL-6-174(G/C)	13.9	22.0	0.36	0.57 (0.15–2.17)
TNF-238(G/G)	94.6	93.0	0.77	1.31 (0.16–12.05)
TNF-238(A/A)	0	0	ND	ND
TNF-238(A/G)	5.4	7.0	0.77	0.76 (0.08–6.08)
TNF-308(G/G)	94.6	93.0	0.77	1.31 (0.16–12.05)
TNF-308(A/A)	0	0	ND	ND
TNF-308(A/G)	5.4	7.0	0.77	0.76 (0.08–6.08)

<sup>a</sup>Mantel-Haenszel test<sup>b</sup>Odds ratio (95% confidence interval)<sup>c</sup>Allele frequency<sup>d</sup>Genotype frequency<sup>e</sup>Not determined

colleagues (2010), also in Mexican IBD patients (37±9 years) suggesting that pathogenicity of *Blastocystis* increases with age since this parasite has been detected in children without IBD (Rodriguez et al. 2008).

Two independent studies performed in a Danish population showed that *Blastocystis* had an association with IBS, but not with any particular ST, similar to the present study (Stensvold et al. 2009b). In Pakistani IBS patients, an association with *Blastocystis* was identified by microscopy (Yakoob et al. 2004) and was confirmed in a subsequent report using PCR techniques that showed a higher frequency of *Blastocystis* than *D. fragilis* in IBS patients (Yakoob et al.

2010a). The association of *Blastocystis* and IBS in Mexican patients supports its pathogenic role. In the present study, *Blastocystis* ST1 and ST3 were common in IBS and control groups, as was co-infection of these two STs, as compared to other reports that describe mostly single ST infections (Yoshikawa et al. 2004a, b; Yan et al. 2006; Li et al. 2007a, b; Yakoob et al. 2010b), indicating that ST1 and ST3 are very common in our environment or that they are transmitted together (Yoshikawa et al. 2004a; Yakoob et al. 2010b) since these two are shared in humans (Stensvold et al. 2009a, c).

Two relevant cytokine gene polymorphisms were evaluated, because it has been seen that SNPs in the promoter

**Table 3** Search of associations between IBS, alleles and parasites

Subgroup	Relationship	Alleles	p value <sup>a</sup>	OR (95% CI) <sup>b</sup>
1	IBS and <i>Blastocystis</i> carrier (n=14) vs no IBS and <i>Blastocystis</i> carrier (n=6)	IL6-174(C)	0.569	2.6 (0.22–31.38)
		TNF-238(A)	1.000	(0.0–36.85)
		TNF-308(A)	1.000	(0.0–36.85)
2	No IBS and <i>Blastocystis</i> carrier (n=6) vs no IBS and no <i>Blastocystis</i> carrier (n=36)	IL6-174(C)	0.609	0.54 (0.08–4.37)
		TNF-238(A)	1.000	(0.0–0.0)
		TNF-308(A)	1.000	(0.0–0.0)
3	<i>Blastocystis</i> carrier (n=20) vs no <i>Blastocystis</i> carrier (n=58)	IL6-174(C)	0.755	0.85 (0.23–3.45)
		TNF-238(A)	1.000	1.34 (0.13–32.57)
		TNF-308(A)	1.000	1.34 (0.13–32.57)
4	IBS (n=36) vs no IBS (n=42)	IL6-174(C)	0.588 <sup>c</sup>	1.61 (0.46–5.85)
		TNF-238(A)	1.000	1.30 (0.17–11.49)
		TNF-308(A)	1.000	1.30 (0.17–11.49)
5	<i>Dientamoeba</i> carrier (n=13) vs no <i>Dientamoeba</i> carrier (n=65)	IL6-174(C)	1.000	1.24 (0.24–8.60)
		TNF-238(A)	0.560	1.43 (0.03–15.34)
		TNF-308(A)	0.560	1.43 (0.03–15.34)

<sup>a</sup>Fisher's exact test, two tail<sup>b</sup>Odds ratio (95% confidence interval)<sup>c</sup>Mantel-Haenszel test

region of IL-6 at position -174 influence the degree of IL-6 expression (Fishman et al. 1998), while that SNPs for TNF- $\alpha$  at -238 and -308 are associated to chronic inflammatory states (Melk et al. 2003). In general, our data of allelic frequency for IL-6 and TNF- $\alpha$  gene polymorphisms are in accordance with other studies performed with Mexican patients (Fajardo-Dolci et al. 2006; Mendoza-Carrera et al. 2010) and, remarkably, in IBS Dutch (van der Veek et al. 2005) and IBS Iranian patients (Barkhordari et al. 2010a) also. Furthermore, we did not find evidence for a contribution of these SNPs in the susceptibility to IBS as was reported for Dutch and Iranian patients; however no sub-grouping was performed in these studies, and the presence of parasites and other pathogens was not assessed (van der Veek et al. 2005; Barkhordari et al. 2010a). Interestingly, we found linkage disequilibrium for TNF- $\alpha$  SNPs -238 and -308 that has not been previously reported for Mexican individuals, although there are some papers regarding this genetic feature in other populations and diseases (Heesen et al. 2003; Stayoussef et al. 2010). A familial aggregation in IBS was studied by Saito and colleagues (2010) who found that was stronger in brothers compared with sisters and in sons compared with daughters, supporting a recessive or X-linked basis for its transmission although, as the authors state, a shared household environmental exposure could be the underlying cause of IBS. In the present study, the small number of patients and the lack of familiar groups might have restricted the ability to find genetic associations.

The clinical and molecular approaches undertaken for the first time in Latin American IBS patients demonstrated an association with *Blastocystis* that supports a pathogenic role of this parasite in IBS. Furthermore co-infections with ST1 and ST3 were frequent; thus, the genetic diversity proposed within ST does not rule out that particular strains might be associated with disease. In addition, a retrospective study of medical records performed by our group showed a tendency of association to diarrhoea in patients with IBS and *Blastocystis* (Ramirez-Miranda et al. 2010). The lack of association between IL-6 and TNF- $\alpha$  gene polymorphisms to IBS susceptibility allows us to suggest that the presence of a pathogen such as *Blastocystis* may have an important role in IBS by enhancing some inherent symptoms of this syndrome, since IBS is a multifactorial disorder and other factors, such as the genetic predisposition of some pro-inflammatory cytokines, may be unlikely to play an important role for this disease.

**Acknowledgements** The authors would like to thank Rune Stensvold for his critical comments; Maria Elena Rodriguez-Campa, Alberto Gonzalez-Angulo, Jesus Lopez-Olivera, Joel Martinez-Ocaña, Simon Kawa-Karasik, David Moncada-Barron, Humberto Torres-Pinzon, Maria de Lourdes Puga, Leonor Escobedo-Ramos, Eduardo Lopez-Escamilla, Lucia Guerra-Sanchez, Rocio Jimenez-Lucio and David Sierra performed

colonoscopies, obtained biopsies and undertook routine pathogen identification. This study is part of DEJG Master's studies in the Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autonoma de Mexico. This work was supported by CONACYT grant 69,589.

## References

- Agnew-Blais J, Carnevale J, Gropper A, Shilka E, Bail R, Ngoma M (2010) *Schistosomiasis haematobium* prevalence and risk factors in a school-age population of peri-urban Lusaka, Zambia. *J Trop Pediatr* 56:247–253
- Barkhordari E, Rezaei N, Ansarpour B, Larki P, Alighardashi M, Ahmadi-Ashtiani HR, Mahmoudi M, Keramati MR, Habibollahi P, Bashashati M, Ebrahimi-Daryani N, Amirzargar AA (2010a) Proinflammatory cytokine gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *J Clin Immunol* 30:74–79
- Barkhordari E, Rezaei N, Mahmoudi M, Larki P, Ahmadi-Ashtiani HR, Ansarpour B, Alighardashi M, Bashashati M, Amirzargar AA, Ebrahimi-Daryani N (2010b) Thelper 1, Thelper 2, and T-regulatory cytokines gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Inflammation* 33:281–286
- Boorom KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U, Li LH, Zhou XN, Ok UZ, Leelayoova S, Jones MS (2008) Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *BMC Parasit Vectors* 1:40
- Camarena A, Juárez A, Mejía M, Estrada A, Carrillo G, Falfán R, Zufiga J, Navarro C, Granados J, Selman M (2001) Major histocompatibility complex and tumor necrosis factor- $\alpha$  polymorphisms in pigeon Breeder's disease. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1528–1533
- Dogruman-AI F, Dagi H, Yoshikawa H, Kurt O, Demirel M (2008) A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 103:685–689
- Fajardo-Dolci G, Solorio-Abreu J, Romero-Alvarez JC, Zavaleta-Villa B, Cerezo-Camacho O, Jiménez-Lucio R, Olivo-Díaz A (2006) DQA1 and DQB1 association and nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 135:243–247
- Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102:1369–1376
- Gasbarrini A, Lauritano EC, Garcovich M, Sparano L, Gasbarrini G (2008) New insights into the pathophysiology of IBS: intestinal microflora, gas production and gut motility. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 12(Suppl 1):111–117
- Glantz SA (1992) *Primer of biostatistics: the program v 3.01*. McGraw-Hill, Columbus
- Guimarães S, Sogayar MI (1993) *Blastocystis hominis*: occurrence in children and staff members of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88:427–429
- Heesen M, Kunz D, Bachmann-Mennenga MHF, Bloemke B (2003) Linkage disequilibrium between tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -308 G/A promoter and TNF-beta NcoI polymorphisms: association with TNF-alpha response of granulocyte to endotoxin stimulation. *Crit Care Med* 31:211–214
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Anuario estadístico de los Estados Unidos Mexicanos 2010. <http://www.inegi.org.mx/>. Accessed 30 June 2011.
- Li LH, Zhou XN, Du ZW, Wang XZ, Wang LB, Jiang JY, Yoshikawa H, Steinmann P, Utzinger J, Wu Z, Chen JX, Chen SH, Zhang L (2007a) Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitol Int* 56:281–286

- Li LH, Zhang XP, Lv S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, Steinmann P, Utzinger J, Tong XM, Chen SH, Zhou XN (2007b) Cross-sectional surveys and subtype classification of human *Blastocystis* isolates from four epidemiological settings in China. *Parasitol Res* 102:83–90
- Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC (2006) Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 130:1480–1491
- Meenagh A, Williams F, Ross OA, Paterson C, Gorodezky C, Hammond IWA, Middleton D (2002) Frequency of cytokine polymorphisms in populations from Western Europe, Africa, Asia, the Middle East and South America. *Hum Immunol* 63:1055–1061
- Melk A, Henne T, Kollmar T, Strehlau J, Latza K, Offner G, Jhangri GS, Ehrlich JH, Von Schnakenburg C (2003) Cytokine single nucleotide polymorphisms and intrarenal gene expression in chronic allograft nephropathy in children. *Kidney Int* 64:314–320
- Mendoza-Carrera F, Ramírez-López G, Ayala Martínez NA, García-Zapán AG, Flores-Martínez SE, Sánchez-Corona J (2010) Influence of CRP, IL6, and TNFA gene polymorphisms on circulating levels of C-reactive protein in Mexican adolescents. *Arch Med Res* 41:472–477
- Minton EJ, Smillie D, Smith P, Shipley S, McKendrick MW, Gleeson DC, Underwood JC, Cannings C, Wilson AG, Trent Hepatitis C Study Group (2005) Clearance of hepatitis C virus is not associated with single nucleotide polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 genes. *Hum Immunol* 66:127–132
- Ramirez-Miranda ME, Hernandez-Castellanos R, Lopez-Escamilla E, Moncada D, Rodriguez-Magallan A, Pagaza-Melero C, Gonzalez-Angulo A, Flisser A, Kawa-Karasik S, Maravilla P (2010) Parasites in Mexican patients with irritable bowel syndrome: a case-control study. *BMC Parasit Vectors* 3:96
- Rodriguez E, Mateos B, Gonzalez JC, Aguilar YM, Alarcon E, Mendoza AA, Mier M, Mora MA, Bernal R (2008) Transición parasitaria a *Blastocystis hominis* en niños de la zona centro del estado de Guerrero, Mexico. *Parasitol Latinoam* 63:20–28
- Saito YA, Petersen GM, Larson JJ, Adkinson EJ, Fridley BL, de Andrade M, Locke GR 3rd, Zimmerman JM, Almazar-Elder AE, Talley NJ (2010) Familial aggregation of irritable bowel syndrome: a family case-control study. *Am J Gastroenterol* 105:833–841
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) ARLEQUIN Version 2.000. A software for population genetics data analysis. University of Geneva, Switzerland
- Schmulson M, Vargas JA, López-Colombo A, Remes-Troche JM, López-Alvarenga JC (2010) Prevalencia y caracterización de los subtipos de SII según los criterios de Roma III, en un estudio clínico, multicéntrico. Reporte del grupo mexicano de estudio para el SII *Rev Gastroenterol Mex* 75:427–438
- Shamsuzzaman SM, Hashiguchi Y (2002) Thoracic amebiasis. *Clin Chest Med* 23:479–492
- Spiegel BM, Farid M, Esrailian E, Talley J, Chang L (2010) Is irritable bowel syndrome a diagnosis of exclusion?: a survey of primary care providers, gastroenterologists, and IBS experts. *Am J Gastroenterol* 105:848–858
- Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J, Harkness J (2005) Detection of *D. fragilis* in fresh stool specimens using PCR. *Int J Parasitol* 35:57–62
- Stark D, van Hal S, Marriott D, Ellis J, Harkness J (2007) Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their diagnosis. *Int J Parasitol* 37:11–20
- Stark D, Barratt J, Roberts T, Marriott D, Harkness J, Ellis J (2010) A review of the clinical presentation of dientamoebiasis. *Am J Trop Med Hyg* 82:614–619
- Stayoussef M, Benmansour J, Al-Jensidi FA, Rajab MH, Said HB, Ourtani M, Rayana CB, Mahjoub T, Ahmawi WY (2010) Identification of specific tumor necrosis factor- $\alpha$ -susceptible and -protective haplotypes associated with the risk of type 1 diabetes. *Eur Cytokine Netw* 21:285–291
- Stensvold R, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Arendrup MC (2006) Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol* 92:1081–1087
- Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E (2007) Terminology for *Blastocystis* subtypes—a consensus. *Trends Parasitol* 23:93–96
- Stensvold CR, Nielsen HV, Mølbak K, Smith HV (2009a) Pursuing the clinical significance of *Blastocystis*—diagnostic limitations. *Trends Parasitol* 25:23–29
- Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, Porsbo LJ, Nielsen SS, Olsen KE, Arendrup MC, Nielsen HV, Mølbak K (2009b) *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect* 137:1655–1663
- Stensvold CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG (2009c) Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol* 39:473–479
- Tan KS (2008) New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 21:639–665
- Thompson WG, Heaton KW, Smyth GT, Smyth C (2000) Irritable bowel syndrome in general practice: prevalence, characteristics and referral. *Gut* 46:78–82
- van der Veek PE, van den Berg M, de Kroon YE, Verspaget HW, Masclee AA (2005) Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 100:2510–2516
- Yakob J, Jafri W, Jafri N, Khan R, Islam M, Beg MA, Zaman V (2004) Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. *Am J Trop Med Hyg* 70:383–385
- Yakob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R (2010a) *Blastocystis hominis* and *D. fragilis* in patients fulfilling irritable bowel syndrome criteria. *Parasitol Res* 107:679–684
- Yakob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R (2010b) Irritable bowel syndrome: associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res* 106:1033–1038
- Yan Y, Su S, Lai R, Liao H, Ye J, Li X, Luo X, Chen G (2006) Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitol Res* 99:597–601
- Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, Takahashi Y (2000) Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *J Clin Microbiol* 38:1324–1330
- Yoshikawa H, Abe N, Wu Z (2003) Genomic polymorphism among *Blastocystis* isolates and development of PCR-based identification of zoonotic isolates. *J Eukaryot Microbiol* 50(Suppl):710–711
- Yoshikawa H, Wu Z, Kimata I, Iseki M, Ali IK, Hossain MB, Zaman V, Haque R, Takahashi Y (2004a) Polymerase chain reaction based subtype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitol Res* 92:22–29
- Yoshikawa H, Morimoto K, Wu Z, Singh M, Hashimoto T (2004b) Problems in speciation in the genus *Blastocystis*. *Trends Parasitol* 20:251–255



■ Artículo original

## Síndrome de intestino irritable: frecuencia y relación filogenética de *Blastocystis sp.* de pacientes mexicanos

Ramírez-Miranda ME,<sup>1</sup> Jiménez-González DE,<sup>1</sup> Rodríguez-Campa ME,<sup>1</sup> González-Angulo A,<sup>1</sup> Hernández-Castellanos R,<sup>1</sup> Sara Arroyo-Escalante A,<sup>1</sup> Romero-Valdovinos M,<sup>1</sup> Martínez-Hernández F,<sup>1</sup> Flisser A,<sup>2</sup> Maravilla P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hospital General Dr. Manuel Gea González, México, D. F.  
<sup>2</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F.

Recibido el 20 de junio de 2011; aceptado el 1 de septiembre de 2011.

### ■ Resumen

**Introducción:** Estudios recientes basados en la frecuente presencia de *Blastocystis sp.* en pacientes con síndrome de Intestino Irritable (SII), han permitido proponer a este parásito como posible responsable del SII. El papel patógeno de *Blastocystis* aún es controversial, ya que se le identifica en personas asintomáticas y aparentemente saludables. La blastocistosis en México ha sido poco estudiada. **Objetivo:** Identificar la presencia de *Blastocystis sp.* en pacientes con SII, utilizando técnicas de biología molecular y describir su relación filogenética con secuencias de otros países. **Métodos:** Se reclutaron pacientes con SII con base en los criterios de Roma III. En todos los participantes se realizaron colonoscopias, análisis coproparastoscópicos, coprocultivo y escrutinio

**Palabras clave:** Síndrome de intestino irritable, parásitos, *Blastocystis sp.*, México.

### ■ Abstract

**Introduction:** Recent studies reported increased presence of *Blastocystis* in patients with Irritable Bowel Syndrome (IBS) and an etiologic role has been proposed. The pathogenic role of *Blastocystis* is controversial, because it is frequently found not only in individuals with enteric symptoms but also in healthy and asymptomatic subjects. Furthermore, there are few studies of blastocistosis in Mexico. **Objective:** To assess the frequency of *Blastocystis sp.* in IBS patients using molecular techniques and to describe its phylogenetic relationship with sequences of other countries. **Methods:** IBS patients according to Rome III criteria were enrolled. In all patients evaluations included: colonoscopies, copropanastoscopic studies,

**Keywords:** Irritable Bowel Syndrome (IBS), parasites, *Blastocystis sp.*, Mexico.

Correspondencia: Dr. Pablo Maravilla. Dirección de Investigación, México D. F. C.P. 14080, México. Teléfono: 5528 4228. Correo electrónico: maravillap@yahoo.com.

0375-0906/\$ - see front matter © 2011 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Elsevier México. Todos los derechos reservados.

para la detección de Rotavirus/Adenovirus. La identificación *Blastocystis* sp se realizó por PCR y secuenciación.

**Resultados:** Se estudiaron 11 hombres y 51 mujeres con una media de edad de  $45.6 \pm 15.7$  años. EL 86% de los pacientes tuvo una colonoscopia normal, 8% presentaron pólipos y 6% enfermedad diverticular. *Blastocystis* sp. fue identificado en 25% de los participantes (todos con colonoscopia normal) y solo dos pacientes tuvieron *Endolimax nana* y *Eutamoeba histolytica/E. dispar* respectivamente. El análisis filogenético mostró que la mayoría de las secuencias mexicanas se agruparon en un clúster junto con secuencias de Japón y de Dinamarca. Asimismo, dos secuencias de nuestros pacientes con SII se ubicaron en otro clúster cercano.

**Conclusiones:** *Blastocystis* sp. fue identificado en 25% de los pacientes con SII. Nuestros datos apoyan la hipótesis de linajes clonales de este parásito en el mundo.

*coproculture, fecal virus screening, PCR and sequencing for Blastocystis sp. were also performed.*

**Results:** We recruited 11 men and 51 women with a mean age of  $45.6 (SD \pm 15.7)$  years. Eighty-six percent of the IBS patients presented a normal colonoscopy, 8% showed polyps and 6% diverticular disease. *Blastocystis* sp. was identified in 25% patients (all of them with normal colonoscopy), while two patients had *Endolimax nana* and *Eutamoeba histolytica/E. dispar*, respectively. Phylogenetic analysis showed that major sequences of Mexican carriers clustered together with sequences of parasites from Japan and Denmark; furthermore, two sequences from IBS patients were grouped in a single cluster.

**Conclusions:** *Blastocystis* sp. was identified in 25% of the IBS patients. Our data support the hypothesis of clonal lineages in distinct geographical areas in the world.

## ■ Introducción

El síndrome de intestino irritable (SII) es una enfermedad funcional gastrointestinal que se caracteriza clínicamente por la asociación de dolor, molestia abdominal o ambos, así como alteraciones en el hábito de las deposiciones fecales.<sup>1,2</sup> El SII se presenta entre 10% y 20% de los adultos y adolescentes de todo el mundo.<sup>1,3</sup> En México, la prevalencia del SII varía de 16% a 35.5% con un intervalo de edad que va de los 15 a los 40 años.<sup>4,5</sup>

Aunque la fisiopatología del SII permanece incierta, algunas publicaciones consideran que la gastroenteritis infecciosa es un factor determinante para desarrollar esta enfermedad,<sup>6</sup> al igual que el posible papel de los polimorfismos en los promotores de las citoquinas proinflamatorias, ya que se encontraron ciertos polimorfismos genéticos de las interleucinas IL-4, IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$  asociados al desarrollo del SII.<sup>8-10</sup> Otros estudios han asociado la presencia de algunos parásitos al

SII, entre los que destaca *Blastocystis* sp.<sup>11,12</sup> que es un microorganismo de distribución mundial cuya prevalencia en países desarrollados de Europa o como Estados Unidos es de 10%, mientras que en países en vías de desarrollo puede ser mayor de 80%.<sup>13-16</sup> En México, la información que se tiene sobre este parásito es limitada. Estudios coprológicos en niños residentes de zonas urbanas mostraron una prevalencia de *Blastocystis* de 3% a 7%,<sup>17,18</sup> mientras que un estudio de factores de riesgo realizado en comerciantes de alimentos de mercados establecidos en la delegación de Xochimilco, México D. F., mostró una prevalencia de 42% y una asociación estadística con el sexo masculino, con hábitos deficientes en higiene personal, antecedentes de parasitosis previas y de tener un familiar que hubiese estado parasitado.<sup>19</sup> Tres estudios desarrollados en niños de comunidades rurales y suburbanas del Estado de Guerrero (México) mostraron frecuencias de 61% a 81% para *Blastocystis*.<sup>20,21</sup> Se ha documentado que los estudios

coproparascópicos (CPS), tradicionalmente utilizados para el diagnóstico de *Blastocystis sp.*, poseen una sensibilidad del 50% a 82%.<sup>13</sup> Recientemente se describió la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de *Blastocystis sp.*, la cual tiene una especificidad de 100% y fue capaz de detectar desde 32 parásitos en 200 mg de heces.<sup>22</sup> Debido al polimorfismo genético de este parásito, continúa debatiéndose su estatus taxonómico, por lo que se recomienda que se le refiera solo por su género, como *Blastocystis sp.* o simplemente como *Blastocystis*.<sup>23</sup>

#### ■ Objetivo

Identificar la presencia de *Blastocystis sp.* en pacientes con SII, utilizando técnicas de biología molecular y describir su relación filogenética con secuencias de otros países.

#### ■ Métodos

**Pacientes:** Previa autorización de las Comisiones de Ética y de Investigación del Hospital General Dr. Manuel Gea González, se llevó a cabo el estudio de febrero de 2008 a enero de 2010, en el servicio de Gastroenterología de la Consulta Externa, en el que se invitó a participar a hombres y mujeres, mayores de 18 años, que presentaran SII. El diagnóstico de SII se hizo con base en los criterios de Roma III, los cuales establecen la presencia de malestar o dolor abdominal al menos tres días por mes, en los últimos tres meses presentando dos de las siguientes características: A) alivio con la defecación; B) cambio en la frecuencia de las deposiciones; C) cambio en la consistencia o forma de las heces.<sup>2</sup> Los pacientes interesados en participar aceptaron firmar una carta de consentimiento informado y se sometieron a un estudio colonoscópico para eliminar la presencia de pólipos y otras alteraciones estructurales que pudieran ser responsables de la sintomatología referente. Se excluyeron a mujeres embarazadas, con historia clínica o con síntomas sugerentes de diabetes mellitus tipo I y II, colitis ulcerativa crónica inespecífica, enfermedad de Crohn, hemorroides, sangrado rectal y pacientes con alteraciones psiquiátricas evidentes. Se eliminaron aquellos pacientes cuyas muestras fecales no fueron adecuadas para el análisis molecular o aquellos participantes que no

hubieran aceptado realizarse los estudios colonoscópicos o manifestaran su deseo de ser dados de baja del presente estudio.

**Análisis microbiológico y molecular:** Durante el estudio colonoscópico, se tomó una muestra de aspirado de material colónico (heces líquidas) de aproximadamente 10 mL en una trampa de plástico estéril, la cual fue llevada al laboratorio clínico para su procesamiento inmediato. Las muestras del aspirado se procesaron para la identificación de bacterias patógenas usando el sistema MicroScan system (Siemens, Reino Unido) y la búsqueda rápida de Rotavirus/Adenovirus (VIKIA, Rota-Adeno, BioMérieux, France). También se llevaron a cabo estudios coproparascópicos mediante la técnica de Faust para la búsqueda de otros parásitos. Una alícuota del aspirado de aproximadamente 1.5 mL se conservó en congelación a -20°C para su posterior análisis molecular e identificación de *Blastocystis sp.* por PCR.

La extracción de DNA fecal total se llevó a cabo en los primeros siete días después de la toma de cada aspirado de heces. Para ello, se utilizó el sistema comercial Puregene™ DNA purification system cell and tissue kit (Gentra Systems; Alemania). Las extracciones se realizaron de acuerdo a las especificaciones del proveedor. El diagnóstico molecular de *Blastocystis* se llevó a cabo por medio de un PCR utilizando los oligonucleótidos específicos diseñados por Stensvold y colaboradores,<sup>22</sup> los cuales amplifican un fragmento de 310 pares de bases (pb) de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSUrDNA) de *Blastocystis sp.* Los productos amplificados fueron visualizados en electroforesis horizontal en geles de agarosa a 1.5% y purificados para ser analizados posteriormente mediante su secuenciación por un proveedor comercial.

**Análisis estadístico:** Se calculó un tamaño de muestra de 62 participantes, utilizando el programa *Primer of Biostatistics*,<sup>24</sup> considerando que es un estudio descriptivo para determinar la prevalencia de un evento en salud, con una frecuencia esperada de 80% de portadores de *Blastocystis*, 95% de potencia de prueba y un error de 10%. Se utilizó estadística descriptiva expresada en porcentaje, media y desviación estándar (DE). El análisis filogenético se construyó a partir de un algoritmo de *Neighbor-joining* (agrupamiento de secuencias más cercanas), realizado con el programa Mega versión 4.0.<sup>25</sup> Para este análisis, también se incluyeron secuencias de *Blastocystis sp.* de portadores

mexicanos sin SII (controles), así como de 43 secuencias de la SSUrDNA de *Blastocystis*, obtenidas del GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)) de otras partes del mundo, cuyos números de acceso y origen se muestran en la **Tabla 1**. Como grupo externo se utilizó una secuencia de *Proteromonas*.

### ■ Resultados

Se incorporaron 62 pacientes con SII: 11 hombres y 51 mujeres cuya media de edad fue  $45.6 \pm 15.7$  años. El estudio colonoscópico reveló que cinco (8%) presentaron pólipos, cuatro (6%) tuvieron enfermedad diverticular y los 56 restantes (86%) tuvieron resultados en parámetros normales. Respecto a los subtipos clínicos del SII,<sup>2</sup> se identificó que el más frecuente fue el asociado a estreñimiento (64%), seguido de diarrea (24%) y el mixto (12%).

Las muestras del aspirado para la identificación de bacterias mostraron que *Escherichia coli* fue la bacteria más frecuente, seguida de *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus sp.*; sin embargo, se identificó un caso con *Salmonella paratyphi A*. La búsqueda rápida de Rotavirus/Adenovirus no detectó ningún caso con estas infecciones. Los estudios coproparasitológicos mediante la técnica de Faust mostraron un portador con *Entamoeba histolytica/E. dispar* y a otro con *Endolimax nana*.

El análisis de PCR mostró que 16 (25%) fueron portadores de *Blastocystis*. Todos los portadores de *Blastocystis* presentaron colonoscopias normales. En la **Figura 1** se resumen los hallazgos microbiológicos de los 62 pacientes. En todas las muestras positivas por PCR para *Blastocystis sp.* se obtuvo una banda única de 310 pares de bases (**Figura 2**). El análisis filogenético mostró la formación de siete conglomerados o clústeres, en los que la mayoría de las secuencias mexicanas, se concentraron en un clúster, el cual también integró a parásitos de Japón, Dinamarca y algunas secuencias cuyo origen no fue documentado, con las cuales hubo una identidad ~97%. Solo dos secuencias de pacientes con SII se congregaron en otro clúster cercano, el cual no agrupó secuencias de otros países. El resto de las secuencias se agruparon en los otros cinco clústeres (**Figura 3**).

### ■ Discusión

Nuestro trabajo demuestra que *Blastocystis sp.* fue identificado en 25% de los pacientes con SII estudiados y fue el parásito más frecuentemente encontrado en nuestra serie.

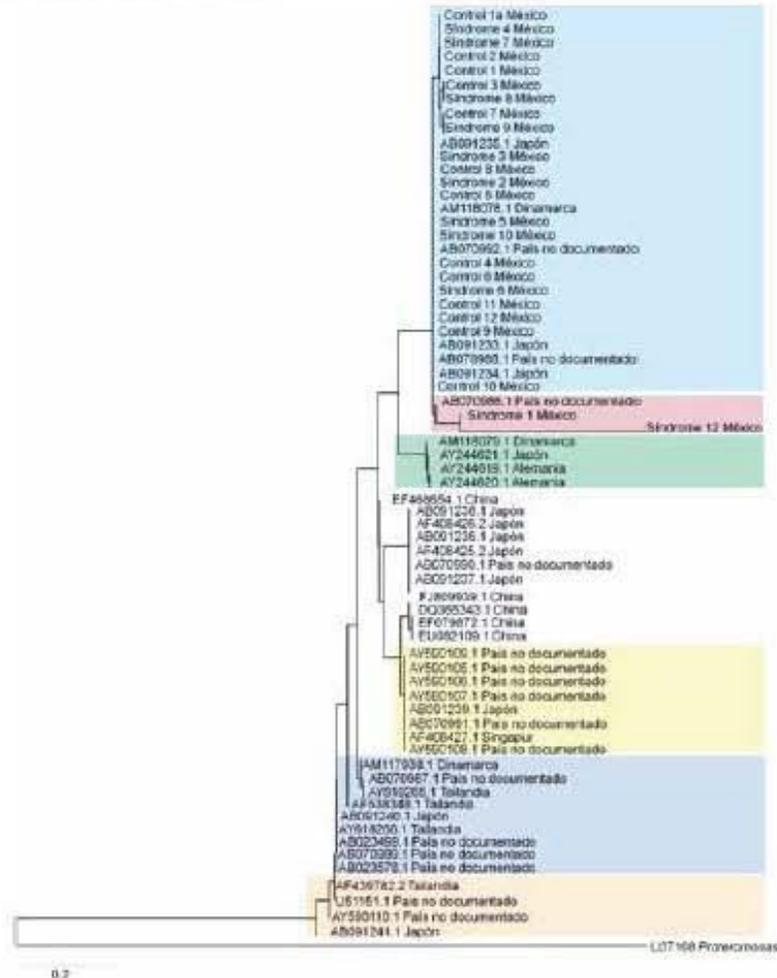
En el presente trabajo se incorporaron pacientes con SII en proporción de 5:1 a favor de las mujeres, con un predominio en el subtipo con

■ **Tabla 1.** Número de acceso del GenBank de 43 secuencias de la SSUrDNA de *Blastocystis* usadas en la reconstrucción filogenética y país de origen del aislamiento.

No. Acceso	País	No. Acceso	País	No. Acceso	País
AB023499.1	No documentado	AB091239.1	Japón	AY590106.1	No documentado
AB023578.1	No documentado	AB091240.1	Japón	AY590107.1	No documentado
AB070986.1	No documentado	AB091241.1	Japón	AY590108.1	No documentado
AB070987.1	No documentado	AF408425.2	Japón	AY590109.1	No documentado
AB070988.1	No documentado	AF408426.2	Japón	AY590110.1	No documentado
AB070989.1	No documentado	AF408427.1	Singapur	AY618265.1	Tailandia
AB070990.1	No documentado	AF439782.2	Tailandia	AY618266.1	Tailandia
AB070991.1	No documentado	AF538348.1	Tailandia	DQ366343.1	China
AB070992.1	No documentado	AM117938.1	Dinamarca	EF079872.1	China
AB091233.1	Japón	AM118078.1	Dinamarca	EF468654.1	China
AB091234.1	Japón	AM118079.1	Dinamarca	EU082109.1	China
AB091235.1	Japón	AY244619.1	Alemania	FJ809939.1	China
AB091236.1	Japón	AY244620.1	Alemania	U51151.1	No documentado
AB091237.1	Japón	AY244621.1	Japón		
AB091238.1	Japón	AY590105.1	No documentado		



Figura 3. Árbol filogenético construido con un algoritmo de Neighbor-joining, con secuencias de *Blastocystis* sp. de pacientes mexicanos con SII (síndrome) y sin SII (controles) y de otras partes del mundo. Se identifican siete clústeres en colores: en azul se observa la mayoría de las secuencias mexicanas y en rosa dos secuencias de pacientes mexicanos con SII.



El análisis microbiológico mostró que todas las bacterias pertenecían a la flora intestinal, a excepción la un caso con *Salmonella paratyphi* A el cual recibió tratamiento farmacológico *ad hoc*. No se identificaron adenovirus o rotavirus.

Rodríguez y colaboradores<sup>20</sup> encontraron una prevalencia de *Blastocystis* mayor de 60% en niños de zonas rurales, y discutieron que al encontrarse las parasitosis en constante transición debido a la introducción de mejoras en los servicios

sanitarios, la movilización de individuos, los cambios en los hábitos higiénico-dietético y las relaciones zoonóticas, que ha favorecido la presencia de otros organismos como nuevos patógenos para el hombre desplazando a otros, como puede ser el caso de *Blastocystis*.

Un hallazgo relevante del presente trabajo fue que la mayoría de las secuencias de *Blastocystis* sp. de portadores mexicanos se agruparon en un solo clúster del árbol filogenético con algunas

secuencias de parásitos de Japón, Dinamarca y de un origen no documentado, fortaleciendo la hipótesis de que existen varios genotipos o un complejo de linajes clonales de *Blastocystis* sp. que explicaría las diferencias en la prevalencia y patogenticidad observadas en diferentes áreas geográficas.<sup>30,32</sup> Además, la presencia de dos secuencias de parásitos exclusivamente en pacientes con SII, también sugiere la presencia de genotipos autóctonos potencialmente patógenos, los cuales por distintos procesos evolutivos cambiaron y se fijaron localmente.<sup>32</sup>

Si bien en el presente artículo, se incluyó una serie de casos con SII que fueron estudiados con técnicas convencionales para identificar organismos patógenos cuyo desempeño cumple con las normas de calidad que exige la Secretaría de Salud de México, presenta algunas deficiencias como el no contar con un grupo control y no aplicar la técnica de PCR para la detección de otros parásitos. Por ello, consideramos importante que se lleven a cabo estudios de casos y controles, e idealmente de causalidad, en los que se incluyan aspectos clínicos soportados por técnicas moleculares para esclarecer el papel patógeno de *Blastocystis* en nuestro país. Rodríguez y colaboradores<sup>20</sup> proponen que si continúa incrementándose la frecuencia de este microorganismo y no se establecen mecanismos dirigidos hasta su control, se corre el riesgo de que la blastocistosis deje de ser un problema individual de salud para convertirse en un problema de salud pública.

## ■ Conclusión

*Blastocystis* sp. fue identificado en 25% de los pacientes con SII estudiados. Nuestros datos apoyan la hipótesis de linajes clonales en este parásito en distintas regiones del mundo; es decir, que hay muchos parásitos genéticamente idénticos en distintas partes del mundo, aunque por procesos evolutivos se podrían encontrar eventualmente poblaciones autóctonas.

## ■ Agradecimiento

Estudio realizado con el apoyo del proyecto CONACYT N° 69589.

## Referencias

1. Camilleri M, Heading RC, Thompson WG. Consensus report: clinical perspectives, mechanisms, diagnosis, and management of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;6:1407-30.

2. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, et al. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1480-91.
3. Kang JY. Systematic review: the influence of geography and ethnicity in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;21:663-76.
4. Leyva-Jiménez R, Olvera-Torres P, Alvarez-Córdova MM, et al. Síndrome de intestino irritable en el adulto que acude a una unidad de medicina familiar. *Rev Mex Inst Mex Seg Soc* 2006;44:473-9.
5. Schulson M, Vargas JA, López-Colombo A, et al. Prevalencia y caracterización de los subtipos de SII según los criterios de Roma III, en un estudio clínico, multicéntrico. Reporte del grupo mexicano de estudio para el SII. *Rev Gastroenterol Mex* 2010;75:42-38.
6. Barista-Cercado R, Ortiz-Espinoza HM, Muñoz-Juárez S. Síndrome de intestino irritable en estudios de medicina. *Rev Fac Med* 2011;54:4-11.
7. Gwee KA, Leong YI, Graham JC. The role of psychological and biological factors in post-infective gut dysfunction. *Gut* 1999;44:400-6.
8. van der Vliet AP, van den Berg M, de Kroon YE, et al. Role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2006;100:2510-6.
9. Barkhordari E, Rozati N, Ansaripour B, et al. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *J Clin Immunol* 2010;30:74-9.
10. Barkhordari E, Rozati N, Mahmoudi M, et al. T-helper 1, T-helper 2, and T-regulatory cytokines gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Inflammation* 2010;33:281-6.
11. Sauri D, van Hal S, Marrison D, et al. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their diagnosis. *Int J Parasitol* 2007;37:11-20.
12. Yakoub J, Jafri W, Beg MA, et al. Irritable bowel syndrome: associated with genotypes of *Blastocystis* sp. *hominis*. *Parasitol Res* 2010;106:1033-8.
13. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:639-65.
14. Soggiari L, Sanctis C, Cian A, et al. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* sp. isolates in France. *Parasitol Res* 2009;105:413-21.
15. Church C, Nellis A, Schuchman AM. Intestinal infections in humans in the Rocky Mountain region, United States. *J Parasitol* 2010;96:194-4.
16. Utzinger J, Bourso-Klöster S, Caselli F, et al. Microscopic diagnosis of sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed stool samples for helminths and intestinal protozoa: a comparison among European reference laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:267-73.
17. Larrusa-Haro A, Ruiz-Perez M, Aguilera-Benavides S. Utilidad de los estratos en heces para el diagnóstico y manejo de infantes y niños pre-escolares con diarrea aguda. *Salud Pública Mex* 2002;44:328-34.
18. Diaz E, Mondragón J, Ramírez E, et al. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2005;68:384-5.
19. Cruz-Licona V, Blancane-Ortega A, Morán-Alvarado C. *Blastocystis* sp. *hominis* among food vendors in Xochimilco markets. *Rev Latinoam Microbiol* 2003;45:12-9.
20. Rodríguez E, Mases B, González JC, et al. Transición parasitaria a *Blastocystis* sp. *hominis* en niños de la zona centro del estado de Guerrero, México. *Parasitol Latinoam* 2008;63:20-8.
21. Martínez-Barbosa I, Gutiérrez-Quiroz M, Ruiz-González L, et al. *Blastocystis* sp. *hominis* y su relación con el estado nutricional de escolares en una comunidad de la sierra de Huayacocotla, Veracruz, México. *Rev Biomed* 2010;21:77-84.
22. Semsvald CR, Brillowska-Dabrowska RA, et al. Detection of *Blastocystis* sp. *hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol* 2004;92:1981-7.
23. Semsvald CR, Suresh GK, Tan KSW, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. *Trends Parasitol* 2007;23:95-6.
24. Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1992. pp.133.
25. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 4: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004;5:150-63.
26. Thompson L, Roeder T, Abel G. 'I can't get my husband to go and have a colonoscopy': Gender and screening for colorectal cancer. *Health (London)* 2011;in press.
27. Chen TL, Chan CC, Chen HP, et al. Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis* sp. *hominis* in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69:213-6.
28. Yakoub J, Jafri W, Jafri N, et al. Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis* sp. *hominis*. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70:383-5.
29. Semsvald CR, Löwa HC, Hammerum AM, et al. *Blastocystis* sp.: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect* 2009;137:1605-63.
30. Yoshikawa H, Morimoto K, Wu Z, et al. Problems in speciation in the genus *Blastocystis* sp. *Trends Parasitol* 2004;20:261-5.
31. Ramírez-Miranda ME, Hernández-Castellanos R, López-Escamilla E, et al. Parasites in Mexican patients with irritable bowel syndrome: a case-control study. *Parasit Vectors* 2010;3:96.
32. Jilinski T, Poyet G, Loscher T, et al. The role of *Blastocystis* sp. *hominis* as a possible intestinal pathogen in travelers. *J Infect* 1997;36:63-6.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

Aaron, L.A., Buchwald, D. A review of the evidence for overlap among unexplained clinical conditions. 2001. *Annals of Internal Medicine*. 134:868-881.

Adam, B., Liebrechts, T., Gschossmann, J.M., Krippner, C., Scholl, F., Ruwe, M., Holtmann, G. 2006. Severity of mucosal inflammation as a predictor for alterations of visceral sensory function in a rat model. *Pain*.123:179-186.

Abe, N. 2004. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Veterinary Parasitology*. 120:235-242.

Abe, N., Wu, Z., Yoshikawa, H. 2003A. Zoonotic genotypes of *Blastocystis hominis* detected in cattle and pigs by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitology Research*. 90(2):124-128.

Abe, N., Wu, Z., Yoshikawa, H. 2003B. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from birds by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitology Research*. 89(5):393–396.

Amin, O.M. 2006. The epidemiology of *Blastocystis hominis* in the United States. *Research Journal of Parasitology*. 1:1-10.

Arisue, N., Hashimoto, T. and Yoshikawa, H. 2003. Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitology*. 126(1):1–9.

Balboa, A., Mearin, F., Badía, X., Benavent, J., Caballero, A.M., Domínguez-Muñoz, J.E., Garrigues, V., Piqué, J.M., Roset, M., Cucala, M., Figueras, M.; RITMO Group. 2006. Impact of upper digestive symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 18(12):1271-1277.

Barkhordari, E., Rezaei, N., Ansari-pour, B., Larki, P., Alighardashi, M., Ahmadi-Ashtiani, H.R., Mahmoudi, M., Keramati, M.R., Habibollahi, P., Bashashati, M., Ebrahimi-Daryani, N., Amirzargar, A.A. 2010a. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Journal of Clinical Immunology*. 30(1):74-9.

Barkhordari, E., Rezaei, N., Mahmoudi, M., Larki, P., Ahmadi-Ashtiani, H.R., Ansari-pour, B., Alighardashi, M., Bashashati, M., Amirzargar, A.A., Ebrahimi-Daryani, N. 2010b. T-helper 1, T-helper 2, and T-regulatory cytokines gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Inflammation*. 33(5):281-6.

Bercik, P., Verdu, E.F., Collins, S.M. 2005. Is irritable bowel syndrome a low-grade inflammatory bowel disease? *Gastroenterology Clinics of North America*. 34:235-245.

Berkes, J., Viswanathan V. K., Savkovic, S. D., Hecht G. 2003. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*. 52(3):439–451.

Boorom, K.F., 2007. Is this recently characterized gastrointestinal pathogen responsible for rising rates of inflammatory bowel disease (IBD) and IBD associated autism in Europe and the United States in the 1990s? *Medical Hypotheses*. 69(3):652-6599.

Boorom, K.F., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Spanakos, G., Parkar, U., Li, L.H., Zhou, X.N., Ok, U.Z., Leelayoova, S., Jones, M.S. 2008. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasites and Vectors*. 1(1)40.

Boreham, P.F., and Stenzel, D.J. 1993. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Advances in Parasitology*. 32:1-70.

Carbajal, J.A., Villar, J., Lanuza, M.D., Esteban, J.G., Muñoz, C., Borrás, R. 1997a. Significación clínica de la infección por *Blastocystis hominis*: estudio epidemiológico. *Medicina Clínica*. 108(16):608-612.

Carbajal, J.A., Del-Castillo, L., Lanuza, M.D., Villar, J., Borrás, R. 1997b. Karyotypic diversity among *Blastocystis hominis* isolates. *International Journal for Parasitology*. 1997b 27(8):941-945.

Cavalier-Smith, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 73: 203-266.

Cavalier-Smith, T. 2004. Only six kingdoms of life: *Proceedings Biological Sciences / The Royal Society*. 271:1251-1262.

Camilleri, M., Heading, R.C., Thompson, W.G. 2002. Consensus report: clinical perspectives, mechanisms, diagnosis, and management of irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 16(8):1407-1430.

Chen, T.L., Chan, C.C., Chen, H.P., Fung, C.P., Lin, C.P., Chan, W.L., Liu, C.Y. 2003. Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis hominis* in healthy adults. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 69: 213-216.

Chen, X.Q., Singh, M., Ho, L.C., Tan, S.W., Ng, G.C., Moe, K.T., Yap, E.H. 1997. Description of a *Blastocystis* species from *Rattus norvegicus*. *Parasitology Research*. 83(4):313-318.

Cirioni, O., Giacometti, A., Drenaggi, D., Ancarani, F., and Scalise, D. 1999. Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. *European Journal of Epidemiology*. 15:389-393.

Clark, C.G. 1997. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 87(1):79-83.

Cruz-Licea, V. 2003. Estudio epidemiológico para la prevalencia de teniosis y cisticercosis en expendedores de un mercado de alimentos. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UNAM. México, 75 p.

Diaz, E., Mondragon, J., Ramirez, E., Bernal, R. 2003. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 68(4):384-385.

Dogruman-AI, F., Dagci, H., Kurt, O., Demirel, M. 2008. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*. 103 (3):685-689.

Dominguez-Marquez, M., Guna, R., Gomez-Muños, T., Borrás, R. 2009. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitology Research*. 105(4):949-955.

Doyle, P.W., Helgason, M.M., Mathias, R.G., Proctor, E.M. 1990. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 116-121.

Duda A, D. Stenzel, J. and Boreham, P.F. 1998. Detection of *Blastocystis* sp. in domestic dogs and cats. *Veterinary Parasitology*. 76:9-17.

Eguiarte, L.E., Souza, V., Aguirre, X. 2007. *Ecología Molecular*. INE, SEMARNAT, CONABIO, UNAM. 592 págs.

El-Shazly, A.M., Abdel-Magied, A.A., El-Beshbishi, S.N., El-Nahas, H.A., Fouad, M.A., Monib, M.S. 2005. *Blastocystis hominis* among symptomatic and asymptomatic individuals in Talkha Center, Dakahlia Governorate, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 35:653–666.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Fullerton, S. 1998. Functional digestive disorders (FDD) in the year 2000--economic impact. *The European Journal of Surgery*. 582:62-64.

Garavelli, P.L., Scaglione, L., Bicocchi, R., Libanore, M. 1991. Pathogenicity of *Blastocystis hominis* Infection. 19(3):185.

Giacometti, A., Cirioni, O., Antonicelli, L., D'Amato, G., Silvestri, C., Del Prete, M.S., Scalise, G. 2003. Prevalence of intestinal parasites among individuals with allergic diseases. *The Journal of Parasitology*. 89: 490-492.

Giacometti, A., Cirioni, O., Fiorentini, A., Fortuna, M., Scalise, G. 1999. Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*. 18:436-439.

Gibson, W. 1996. Genetic exchange in trypanosomes. *Bulletin et Memoires de l'Academie Royale de Medecine de Belgique*. 151(2):203-10.

Gómez-Escudero, O., Schmulson-Wasserman, M. J., Valdovinos-Díaz, M.A. 2003. Síndrome de intestino irritable postinfeccioso. Una revisión basada en evidencias. *Revista de Gastroenterología de México*. 68(1):55-61.

Gwee, K.A., Leong, Y.I., Graham, J.C. 1999. The role of psychological and biological factors in postinfective gut dysfunction. *Gut* 44: 400-406.

<http://align.genome.jp/sit-bin/clustalw>

<http://dgepi.salud.gob.mx>

[http://dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd\\_boletin.html](http://dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_boletin.html)

Lightowlers, M.W. 2010. Fact or hypothesis: concomitant immunity in taeniid cestode infections. *Parasite Immunology*. 32(8):582-9.

Johnson, A.M., Thanou, A., Boreham, P.F., Baverstock, P.R. 1989. *Blastocystis hominis*: phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison. *Experimental Parasitology* 68: 283-288

Jones, M.S., Whipps, C.M., Ganac, R.D., Hudson, N.R., Boorom, K. 2009. Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. *Parasitology Research*. 104:341-5.

Kain, K.C., Noble, M.A., Freeman, H.J., Barteluk, R.L. 1987. Epidemiology and clinical features associated with *Blastocystis hominis* infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 8:235–244.

Kang J Y. Systematic review: the influence of geography and ethnicity in irritable bowel syndrome. *Alimentary. Pharmacology & Therapeutics*. 2005; 21:663-76.

Katsarou-Katsari, A., Vassalos, C.M., Tzanetou, K., Spanakos, G., Papadopoulou, P. Vakalis, N. 2008. Acute urticaria associated with amoeboid forms of *Blastocystis* sp. subtype 3. *Acta Dermato Venereologica*. 88:80-81.

Kaya, S., Cetin, E.S., Aridoğan, B.C., Arikan, S., Demirci, M. 2007. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*. 31(3):184-7.

Kabeerdoss, J., Shobana Devi, R., Regina Mary, R., Prabhavathi, D., Vidya, R., Mechenro, J., Mahendri, N.V., Pugazhendhi, S., Ramakrishna, B.S. 2001. Effect of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12(R) on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin-2 in healthy adult volunteers. *Nutrition Journal*. 23; 10(1):138.

Lanuza, M.D., Carbajal, J.A., Villar, J., Mir, A., Borrás, R. 1999. Soluble-protein and antigenic heterogeneity in axenic *Blastocystis hominis* isolates: pathogenic implications. *Parasitology Research*. 85(2):93-7.

Lee, M.G., and Stenzel, D.J. 1999. A survey of *Blastocystis* in domestic chickens. *Parasitology Research*. 85:109-117.

Leelayoova, S., Rangsin, R., Taamasri, P., Naaglor, T., Thathaisong, U., Mungthin, M. 2004. Evidence of waterborne transmission of *Blastocystis hominis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 70(6):658-662.

Leelayoova, S., Siripattanapipong, S., Thathaisong, U., Naaglor, T., Taamasri, P., Piyaraj, P., Mungthin, M. 2008. Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 79(3):401-406.

Leelayoova, S. Taamasri, P., Rangsin, R., Naaglor, T., Thathaisong, U., Mungthin, M. 2002. In-vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 96(8):803-7.

Leyva-Jimenez, R. 2006. Síndrome de intestino irritable en el adulto que acude a una unidad de medicina familiar. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*.44:473-479.

Li, L.H., Zhou, X.N., Du, Z.W., Wang, X.Z., Wang, L.B., Jiang, J.Y., Yoshikawa, H., Steinmann, P., Utzinger, J., Wu, Z., Chen, J.X., Chen, S.H., Zhang, L. 2007. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitology International*. 56:281-286.

Limsui, D., Pardi, D.S., Camilleri, M., Loftus, E.V., Kammer, P.P., Tremaine, W.J., Sandborn, W.J. 2007. Symptomatic overlap between irritable bowel syndrome and microscopic colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*.13: 175-181.

López-Colombo A, Morgan D, Bravo-González D, Montiel-Jarquín A, Méndez-Martínez S, Schmulson M. The epidemiology of functional gastrointestinal disorders in Mexico: A population-based study. *Gastroenterology Research and Practice*. 2012; In press.

Long, H.Y., Handschack, A., König, W., Ambrosch, A. 2001. *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitology Research*. 87(12):1029-1030.

Longstreth, G.F., Thompson, W.G., Chey, W.D., Houghton, L.A., Mearin, F., Spiller, R.C. 2006. Functional Bowel disorders. *Gastroenterology*. 2006 130(5):1480-91.

Maravilla, P., Gonzalez-Guzman, R., Zuñiga, G., Peniche, A., Dominguez-Alpizar, J.L., Reyes-Montes, R., Flisser, A. 2008. Genetic polymorphism in *Taenia solium* cysticerci recovered from experimental infections in pigs. *Infection and Genetic Evolution*. 8(2):213-6.

Masud, M.A., Hasan, M., Khan AK. 2001. Irritable bowel syndrome in a rural community in Bangladesh: prevalence, symptoms pattern, and health care seeking behavior. *The American Journal of Gastroenterology*. 96:1547-1552.

Mearin, F., Mearin, F. 2004. Criterios diagnósticos, epidemiología y coste social del Síndrome del Intestino Irritable. *Med Clin*. 5:2-7.

Mearin, F., Perelló, A., Balboa, A. 2007. Síndrome del intestino irritable y enfermedad inflamatoria intestinal: ¿el eslabón perdido en el espectro de la inflamación? En: *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*. Ed. M.A. Gassull, A. Obrador, F. Gomollón, J. Hinojosa. Arán Ediciones, S. L. Madrid.

Mehlhorn, H. 1988. *Blastocystis hominis*, Brumpt, 1912: are there different stages or species? *Parasitology Research*. 74(4):393-395.

Menounos, P.G., Spanakos, G., Tegos, N., Vassalos, C.M., Papadopoulou, C., Vakalis, N.C. 2007. Direct detection of *Blastocystis sp.* in human fecal samples and subtype

assignment using single strand conformational polymorphism and sequencing. *Molecular and Cellular Probes*. 22:24-29.

Moe, K.T., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Chen, X.Q., Ng, G.C., and Yap, E.H. 1997. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitology Research*. 83:319-325.

Moe, K.T., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Chen, X.Q., Yap, E.H. 1999. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitology Research*. 85: 103-108.

Moe, K.T., Singh, M., Howe, J., Ho, L.C., Tan, S.W., Ng, G.C., Chen, X.Q., Yap, E.H. 1996. Observations on the ultrastructure and viability of the stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitology Research*. 82(5): 439-444.

Moghaddam, D.D., Ghadirian, E., Azami, M. 2005. *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Parasitology Research*. 96(4):273-275

Morgan, D.R., Benschoff, M., Cáceres, M., Becker-Dreps, S., Cortes, L., Martin, C.F., Schmulson, M., Peña, R. 2011. Irritable bowel syndrome and gastrointestinal parasite infection in a developing nation environment. *Gastroenterology Research and Practice*.

Neal, K., R., Hebden, J., Spiller R. 1997. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. *BMJ*. 314:779-82

Nei, M., Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.

Nigro, L., Larocca, L., Massarelli, L., Patamia, I., Minniti, S., Palermo, F., Cacopardo, B. 2003. A placebo-controlled treatment trial of *Blastocystis hominis* infection with metronidazole. *Journal of Travel Medicine*. 10(2):128-130.

Noël, C.F., Dufernez, D., Gerbod, V.P., Edgcomb, P., Delgado-Viscogliosi, L.C., Ho, M., Singh, R., Wintjens, M.L., Sogin, M., Capron, R., Pierce, L., Zenner, L., Viscogliosi, E. 2005. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 43:348-355.

Ok, U., Girginkardesler, Z.N., Balcioglu, C., Ertan, P., Pirildar, T., Kilimcioglu, A.A. 1999. Effect of trimethoprim-sulfamethaxazole in *Blastocystis hominis* infection. *The American Journal of Gastroenterology*. 94:3245-3247.

O'Mahony, L., McCarthy, J., Kelly, P., Hurley, G., Luo, F., Chen, K., O'Sullivan, G.C., Kiely, B., Collins, J.K., Shanahan, F., Quigley, E.M. 2005. Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*. 128(3):541-51.

- Parkar, U., Traub, R.J., Kumar, S., Mungthin, M., Vitali, S., Leelayoova, S., Morris, K., Thompson, R.C. 2007. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. *Parasitology* 134:359–367.
- Parkar, U., Traub, R.J., Vitali, S., Elliot, A., Levecke, B., Robertson, I., Geurden, T., Steele, J., Drake, B., Thompson, R.C. 2010. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology*. 169:8-17
- Pasqui, A.L., Savini, E., Saletti, M., Guzzo, C., Puccetti, L., Auteri, A. 2004. Chronic urticaria and *Blastocystis hominis* infection: a case report. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 8(3):117–120.
- Pegelow, K., Gross, R., Pietrzik, K., Lukito, W., Richards, A.L., Fryauff, D.J. 1997. Parasitological and nutritional situation of school children in the Sukaraja district, West Java, Indonesia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 28:173–190.
- Puthia, M.K., Lu, J., and Tan, K.S. 2008. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF- $\kappa$ B-dependent manner. *Eukaryotic Cell* 7:435–443.
- Puthia, M.K., Sio, S.W., Lu, J., Tan, K.S. 2006. *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infection and Immunity*. 74:4114-4123.
- Puthia, M.K., Vaithilingam, A., Lu, J., Tan, K.S. 2005. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitology Research*. 97:386–389.
- Rangel Martinez Cecilia. 2010. Identificación de *Blastocystis hominis* en muestras de agua de la Ciudad Universitaria de la UNAM en México, DF. Universidad Simón Bolívar.
- Rene, B.A., Stensvold, C.R., Badsberg, J.H., Nielsen, H.V. 2009. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 80(4):588-92.
- Rodríguez, E., Mateos, B., González, J.C. Aguilar, Y.M., Alarcón, E. Mendoza, A.A., Mier, M., Mora, M.A. y Bernal, R.M. 2008. Transición parasitaria a *Blastocystis hominis* en niños de la zona centro del estado de Guerrero, México. *Parasitología Latinoamericana*. 63: 20 - 28
- Rosignol, J.F., Kabil, S.M., Said, M., Samir, H., Younis. 2005. Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with *Blastocystis hominis*. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 3:987-991
- Rzhetsky, A, Nei, M. 1992. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Molecular Biology and Evolution* 9:945-967.
- Saito, Y.A., Locke, G.R., Talley, N.J., Zinsmeister, A.R., Fett, S.L., Melton, L.J. 2000. A comparison of the Rome and Manning criteria for case identification in epidemiological investigations of irritable bowel syndrome. *The American Journal of Gastroenterology*. 95:2816-2824.

- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Schmulson, M., Ortíz, O., Santiago-Lomeli, M., Gutiérrez-Reyes, G., Gutiérrez-Ruiz, M.C., Robles-Díaz, G., Morgan, D. 2006. Frequency of functional bowel disorders among healthy volunteers in Mexico City. *Digestive Diseases*. 24(3-4):342-7.
- Schmulson, M., Vargas, J.A., López-Colombo, A., Remes-Troche, J.M., López-Alvarenga, J.C. 2010. Prevalencia y caracterización de los subtipos de SII según los criterios de Roma III, en un estudio clínico, multicéntrico. Reporte del grupo mexicano de estudio para el SII *Revista de Gastroenterología de México*. 75:427-438
- Sibley, L.D., Ajioka, J.W. 2009. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps. *Annual Review of Microbiology*. 62:329-51.
- Silberman, J.D., Sogin, M.L., Leipe, D.D., Clark, C.G. 1996. Human parasite finds taxonomic home. *Nature*. 380-398.
- Scicluna, S.M., Tawari, B., Clark, C.G. 2006. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*. 157:77-85.
- Smith, J.M., Smith, N.H., O'Rourke, M., Spratt, B.G. 1993. How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 15; 90(10):4384-8.
- Singh, M., Suresh, K., Ho, L.C., Ng, G.C., Yap, E.H. 1995. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 81(5):446-450.
- Souppart, L., Sancier, G., Cian, A., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Capron, M., Dei-Cas, E., Boorom, K., Delhaes, L., Viscogliosi, E. 2009. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitology Research*. 105(2):413-21.
- Stark, D., Hal van S, Marriott D, Ellis J, Harkness. 2007. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *International journal for Parasitology*. 37: 11-20.
- Suresh, K., Howe, J., Chong, S.Y., Ng, G.C., Ho, L.C., Loh, A.K., Ramachandran, N.P., Yap, E.H., Singh, M. 1994. Ultrastructural changes during *in vitro* encystment of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*. 80:327-335.
- Suresh, K., Smith, H.V. 2004. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 23(6):509-511.
- Suresh, K., Smith, H.V., Tan, T.C. 2005. Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(9):5619-20.

- Suresh, K., Venilla, G.D., Tan, T.C., Rohela, M. 2009. In vivo encystation of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 104(6):1373-1380.
- Stark D, van Hal S, Marriott D, Ellis J, Harkness J. 2007. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *International Journal of Parasitology*. 37(1):11-20
- Stensvold, C.R. Arendrup, M.C., Nielsen, H.V., Bada, A., Thorsen, S. 2008. Symptomatic *Blastocystis* infection successfully treated with trimethoprim/sulfamethoxazole. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 102:271-274.
- Stensvold, C.R. Arendrup, M.C., Jespersgaard, C., Mølbak, K., Nielsen, H.V. 2007b. Detecting *Blastocystis* by parasitological and DNA-based methods: a comparative study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 59(3):303–307.
- Stensvold, C.R., Brillowska-Dabrowska, A., Nielsen, H.V., Arendrup, M.C. 2006. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *Journal of Parasitology*. 92(5):1081-1087.
- Stensvold, C.R., Nielsen, H.V., Mølbak K., Smith, H.V. 2009. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. *Trends in Parasitology*. 25: 23-29.
- Stensvold, C.R., Suresh, G.K., Tan, K.S., Thompson, R.C., Traub, R.J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H., Clark, C.G. 2007a. Terminology for *Blastocystis* subtypes—a consensus. *Trends in Parasitology*. 23:93-96.
- Stenzel, D.J., Boreham, P.F. 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Reviews*. 9(4):563-584
- Stenzel, D.J., Cassidy, M.F., Boreham, P.F. 1994. Morphology of *Blastocystis* sp. from domestic birds. *Parasitology Research*. 80(2):131-137.
- Srisawangwong, T., Sithithaworn, P., Sukkasaem, P., Jintakanon, D., Tesana, S., Sithithaworn, J., Andrews, R.H., Fried, B. 2011. Concomitant and protective immunity in mice exposed to repeated infections with *Echinostoma malayanum*. *Experimental Parasitology*. 127(4):740-4.
- Talley, N.J., Zinsmeister, A.R., Van Dyke, C., Melton, L.J. 3<sup>rd</sup>. Epidemiology of colonic symptoms and the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 101(4): 927-934.
- Tan, K.S. 2004. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Veterinary Parasitology*. 126:121–144.
- Tan, K.S. 2008. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*. 21(4):639-665.
- Tan, K.S., Sing, M., Yap, E.H. 2002. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *International Journal of Parasitology*. 32:789-804
- Tan, S.W., Singh, M., Yap, E.H., Ho, L.C., Moe, K.T., Howe, J., Ng, G.C. 1996. Colony formation of *Blastocystis hominis* in soft agar. *Parasitology Research*. 82:375-377.

- Tan, T.C., Suresh K.G. 2006a. Amoeboid form of *Blastocystis hominis* – a detailed ultrastructural insight. *Parasitology Research*. 99:737-742
- Tan, T.C., Suresh, K.G. 2006b. Predominance of amoeboid forms of *Blastocystis hominis* in isolates from symptomatic patients. *Parasitology Research*. 98(3):189-93.
- Tan, T.C., Suresh, K.G., Smith, H.V. 2008. Phenotypic and genotypic characterization of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential. *Parasitology Research*. 104:85-93.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24:1596-1599.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:11030-11035.
- Teow, W.L., Ng, G.C., Chan, P.P., Chan, Y.C., Yap, E.H., Zaman, V., Singh, M. 1992. A survey of *Blastocystis* in reptiles. *Parasitology Research*. 78:453-455.
- Thathaisong, U., Worapong, J., Mungthin, M., Tan-Ariya, P., Viputtigul, K., Sadutis, A., Noonai, A., Leelayoova, S. 2003. *Blastocystis* isolates from a pig and horse are closely related to *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(3):967-95.
- Thomas, M., Wrzosek, L., Ben-Yahia, L., Noordine, M.L., Gitton, C., Chevret, D., Langella, P., Mayeur, C., Cherbuy, C., Rul, F. 2011. Carbohydrate Metabolism Is Essential for the Colonization of *Streptococcus thermophilus* in the Digestive Tract of Gnotobiotic Rats. *PLoS One*. 6(12):e28789.
- Van der Veek, P.P., van den Berg, M., de Kroon, Y.E., Verspaget, H.W., Masclee, A.A. 2005. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *American Journal of Gastroenterology*. 100(11):2510-6.
- Valsecchi, R., Leghissa, P., Greco, V. 2004. Cutaneous lesions in *Blastocystis hominis* infection. *Acta Dermato Venereologica*. 84:322–323.
- Wang, L., H., Gang, X., C., Pan, G., Z., 2004. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut*. 53:1096–1101
- Windsor, J.J. 2007. *D. fragilis* and *B. hominis*: neglected human protozoa. *The Biomedical Scientist*. 524-527.
- Windsor, J.J., Macfarlane, L. 2005. Irritable bowel syndrome: the need to exclude *Dientamoeba fragilis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 72(5):501.
- Wong, K.H., Ng, G.C., Lin, R.T., Yoshikawa, H., Taylor, M.B., Tan, K.S. 2008. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitology Research*. 102(4):663-70.

- Yakoob, J., Jafri, W., Beg, M.A., Abbas, Z., Naz, S., Islam, M., Khan, R. 2010. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*. 106(5):1033-8.
- Yakoob, J., Jafri, W., Jafri, N., Khan, R., Islam, M., Beg, M.A., Zaman, V. 2004. Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 70:383-5.
- Yan, Y., Su, S., Lai, R., Liao, H., Ye, J., Li, X., Luo, X., Chen, G. 2006. Genetic variability of *Blastocystis hominis* isolates in China. *Parasitology Research*. 99(5):597-601.
- Yoshikawa, H., Abe, N., Iwasawa, M., Kitano, S., Nagano, I., Wu, Z., Takahashi, Y. 2000. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(4):1324-1330.
- Yoshikawa, H., Nagano, I., Wu, Z., Yap, E.H., Singh, M., Takahashi, Y. 1998. Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. *Molecular and Cellular Probes* 12(3):153-159.
- Yoshikawa, H., Nagano, I., Yap, E.H., Singh, M., Takahashi, Y. 1996. DNA polymorphism revealed by arbitrary primers polymerase chain reaction among *Blastocystis* strains isolated from humans, a chicken and a reptile. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 43(2): 127-130.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Howe, J., Hashimoto, T., Geok-Choo, N., Tan, K.S. 2007. Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 54(1):33-7.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata, I., Iseki, M., Ali, I.K., Hossain, M.B., Zaman, V., Haque, R., Takahashi, Y. 2004b. Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitology Research*. 92(1):22-9.
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Nagano, I., Takahashi, Y. 2003. Molecular comparative studies among *Blastocystis* isolates obtained from humans and animals. *The Journal of Parasitology*. 89(3):585–594.
- Yoshikawa, H., Yoshida, K., Nakajima, A., Yamanari, K., Iwatani, S., Kimata, I. 2004a. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitology Research*. 2004. 94(6):391-396.
- Zaman, V., Howe, J., Ng, M. 1997. Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis* *Parasitology Research*. 83(3):306-308.
- Zierdt, C.H. 1991. *Blastocystis hominis*—past and future. *Clinical Microbiology Reviews*. 4:61–79.