



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS MANCOMUNADA:

DINÁMICA DE INFECCIÓN DE *Blastocystis* spp.

EN PACIENTES CON VIH-SIDA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTAN:

EDUARDO LÓPEZ ESCAMILLA

FABIOLA SÁNCHEZ AGUILLÓN



MÉXICO, D.F.

2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: ABEL GUTIÉRREZ RAMOS
VOCAL: Profesor: JOSÉ CORDERO HERNÁNDEZ
SECRETARIO: Profesor: JOSÉ PABLO MARAVILLA CAMPILLO
1er. SUPLENTE: Profesor: LUIS MANUEL PEREA MEJÍA
2° SUPLENTE: Profesor: GERARDO GARCÍA CAMACHO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA DE AGENTES PATÓGENOS DEL HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ".

ASESOR DEL TEMA:

Dr. JOSÉ PABLO MARAVILLA CAMPILLO



SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. MIRZA GABRIELA ROMERO VALDOVINOS



SUSTENTANTES:

EDUARDO LÓPEZ ESCAMILLA



FABIOLA SÁNCHEZ AGUILLÓN



ÍNDICE	PÁGINA
Índice de cuadros	VI
Índice de figuras	VII
Abreviaturas	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Blastocystis</i> spp	1
1.2 Taxonomía	1
1.3 Subtipos genéticos (ST)	4
1.4 Morfología	6
1.5 Ciclo de vida	9
1.6 Epidemiología	11
1.7 Patología	12
1.8 Binomio de <i>Blastocystis</i> -VIH/SIDA	14
1.9 Diagnóstico molecular de <i>Blastocystis</i> spp.	15
2. PLANTIAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. OBJETIVOS	18
5. OBJETIVOS PARTICULARES	18
6. HIPÓTESIS	18
7. MATERIAL Y MÉTODOS	19
7.1 Diseño experimental	19
7.2 Paciente	20
7.2.1 Criterios de inclusión	20

7.2.2	Criterios de exclusión	20
7.2.3	Criterios de eliminación	20
7.3	Estudios de laboratorio clínico	20
7.3.1	Examen coproparasitoscópico por el método de Faust	22
7.3.2	Tinción de kinyoun	22
7.4	Diagnóstico molecular de <i>Blastocystis</i> spp.	23
7.4.1	Extracción de DNA fecal total	23
7.4.2	Extracción Fenol/Cloroformo	24
7.4.3	Diagnóstico molecular por PCR	25
7.4.4	Identificación de los subtipos genéticos de <i>Blastocystis</i> spp.	27
7.4.5	Secuenciación de productos de PCR	28
7.5	Identificación de los subtipos genéticos por el método Neighbor-joining	28
7.6	Análisis estadístico	28
7.7	Consideraciones éticas	29
8.	RESULTADOS	29
8.1	Descripción del grupo de estudio	29
8.2	Diagnóstico morfológico de parásitos intestinales	30
8.3	Parásitos, síntomas y cuadro clínico desarrollado	34
8.3.1	Análisis estadístico	35
8.4	Estandarización de PCR diagnóstico	36
8.5	Estandarización del PCR subtipo específico de <i>Blastocystis</i>	37
8.6	Diagnóstico molecular de <i>Blastocystis</i> spp.	40

9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
9.1	Grupo de estudio	43
9.2	Caracterización de parásitos que infectaron a los pacientes con VIH/SIDA	43
9.3	Dinámica de la parasitosis y su asociación con síntomas gastrointestinales	46
9.4	Estandarización del PCR y secuenciación	49
9.5	Análisis filogenético y subtipos genéticos de <i>Blastocystis</i> spp.	54
10.	CONCLUSIÓN	57
11.	ANEXOS	58
	ANEXO 1. Carta de consentimiento informado	58
	ANEXO 2. Artículos derivados de la presente tesis	61
	ANEXO 3. Secuencias de referencia y su número de acceso al Genbank	69
12.	BIBLIOGRAFÍA	71

Índice de cuadros

	PÁGINA
Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para el diagnóstico molecular de <i>Blastocystis</i>	26
Cuadro 2. Oligonucleótidos usados para la identificación de los ST 1 y 3 de <i>Blastocystis</i> spp.	27
Cuadro 3. Resumen de parásitos identificados a lo largo del estudio	31
Cuadro 4. Síntomas, cuadro clínico y tratamiento de los pacientes parasitados	34
Cuadro 5. Búsqueda de relaciones significativas entre la presencia de síntomas y cuadro clínico con las distintas parasitosis encontradas	35
Cuadro 6. Identificación de pacientes positivos a <i>Blastocystis</i> spp, subtipo genético y técnica de diagnóstico utilizada.	42

Índice de Figuras

	PÁGINA
Figura 1. Subtipos de <i>Blastocystis</i> spp	3
Figura 2. Características morfológicas de <i>Blastocystis</i> observadas bajo microscopio de luz	8
Figura 3. Propuesta de ciclo de vida de <i>Blastocystis</i>	10
Figura 4. Diseño experimental	19
Figura 5. Flujograma	21
Figura 6. Género de los participantes	30
Figura 7. Fotografías de cuatro ejemplos de preparaciones en fresco con lugol durante el desarrollo de este protocolo	32
Figura 8. Frecuencia de infecciones parasitarias en los 27 participantes del estudio	33
Figura 9. Frecuencia de los parásitos identificados en los 27 participantes del estudio	33
Figura 10. Relación de pacientes sintomáticos y asintomáticos infectados por <i>Blastocystis</i> spp.	36
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de la estandarización del PCR diagnóstico.	37
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de la estandarización del PCR específico subtipo 1.	38
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de PCR específico subtipo 1	38
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de la estandarización del PCR específico subtipo 3	39
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa del PCR específico subtipo 3	39
Figura 16. Árbol filogenético de las secuencias del gen SSUrDNA	42

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
B.	<i>Blastocystis</i>
c/u	Cada uno
cbp	Cuanto baste para
CI	Intervalo de confianza
cm ²	Centímetro cuadrado
CPS	Coproparasitoscópicos
CV	Vacuola Central
DF	Distrito Federal
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gramos
HCl	Ácido clorhídrico
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
kB	Cadenas ligeras kappa de los linfocitos B activados
mg	Miligramos
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min.	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mm ³	Milímetros cúbicos
Nd	No definido
NHP	Primates no humanos
nm	Nanómetro
No.	Número
OR	Razón de momios
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-S	PCR y secuenciación
PM	Pesos moleculares
rpm	Revoluciones por minuto
SCI	Síndrome de intestino irritable
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SM	Sin Muestra
spp.	Todas las especies individuales de un género
SSUrDNA	Subunidad pequeña del gen que codifica para el ribosoma
ST	Subtipos genéticos
SX	Síndrome
T	Tiempo
TAE	Solución tampón TRIS, acetato y EDTA
Taq polimerasa	Enzima DNA polimerasa termoestable
TCFE	Técnica de concentración formol-éter
TE	TRIS-HCl y EDTA

TEM	Microscopía electrónica de transmisión
Th2	Linfocitos T helper 2 (células colaboradoras tipo 2)
Tm	Temperatura de alineamiento
TRIS	Tris (hidroximetil)aminometano
TX	Tratamiento
UV	Ultra violeta
v.	Volumen
V	Volt
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia humana
xg	Gravedades
ZnSO ₄	Sulfato de zinc
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Blastocystis* spp.

Blastocystis es un microorganismo anaerobio de distribución mundial que se encuentra comúnmente en el tracto digestivo de una amplia variedad de hospederos incluidos los seres humanos y animales como los cerdos, monos, cobayos, aves, reptiles y ratas (Boreham y Stenzel, 1993). A pesar de que *B. hominis* fue descrito a principios del siglo XX, sólo se ha estudiado extensamente su morfología, por lo que aún no se han aclarado del todo su virulencia, ciclo de vida y diferentes aspectos de su biología (Zierdt, 1991; Tan, 2008; Tan *et al.*, 2008). Este microorganismo presenta diversas morfologías: la vacuolar, ameboide, granular y el quiste, siendo la forma vacuolar la que comúnmente se encuentra en las heces.

El papel de *Blastocystis* como un patógeno humano sigue siendo incierto, pero los estudios que lo asocian con trastornos digestivos agudos o crónicos han ido en aumento, por lo que en pacientes sintomáticos en quienes no se ha determinado la presencia de otro agente etiológico, *Blastocystis* spp. debe ser considerado como el posible patógeno. (García, 2001).

El interés del estudio de *Blastocystis* se centra en que:

1. Es un microorganismo cosmopolita, con una alta prevalencia mundial (>10% en países desarrollados y >60% en países en vías de desarrollo) (Tan, 2008).
2. Su papel patógeno aún no se esclarece, ya que se conoce poco sobre su patogenicidad (Tan, 2008; Stensvold *et al.*, 2009c).
3. La blastocistosis ha sido considerada como una parasitosis emergente (Stensvold *et al.*, 2009a).

1.2 Taxonomía

El origen etimológico del nombre de *Blastocystis hominis*, (Brumpt, 1912) es:

- ✓ *blasto*- βλαστός (Proviene del griego 'germen, retoño')
- ✓ *Kýstis*- κύστις (Proviene del griego 'bolsa', 'vejiga')
- ✓ *hominis*- (Proviene del latín 'hombre', presente en el hombre)

Durante casi un siglo, la clasificación taxonómica de *B. hominis* estuvo en debate, siendo colocado dentro del reino de los hongos debido a su apariencia brillante de levadura en los preparados frescos y por la ausencia de pseudópodos y locomoción. Más tarde (Zierdt *et al.*, 1967) lo describieron como un protista, basados en los siguientes criterios morfológicos y fisiológicos:

- ✓ La presencia de uno o más núcleos, retículo endoplásmico liso y rugoso, complejo de Golgi y organelos tipo mitocondrias
- ✓ No posee pared celular
- ✓ No crecen en medios para hongos
- ✓ No presenta susceptibilidad a fármacos antimicóticos
- ✓ Tiene preferencia por pH alcalino
- ✓ Se reproduce por fisión binaria
- ✓ Ingiere bacterias
- ✓ Crece muy bien a 37 °C, no se desarrolla a 25°C y es destruido a 4°C

Posteriormente, se le clasifica como esporozooario y más tarde fue reclasificado como sarcodino, aunque debido a pruebas insuficientes, la discusión de su taxonomía continuó por más tiempo (Zierdt, 1991; Tan, 2008).

Mediante el análisis de secuencias parciales de DNA que codifica para la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSUrDNA), se demostró que *B. hominis* no tenía un origen monofilético con las levaduras (*Saccharomyces*), hongos (*Neurospora*), sarcodines (*Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Dictyostelium*) o esporozoos (*Sarcocystis* y *Toxoplasma*) (Johnson *et al.*, 1989); por lo que se concluyó que *Blastocystis* podía ser colocado en un grupo externo, dentro de los Estramenófilos, los cuales se definen como "un conjunto evolutivo complejo y heterogéneo, que incluye protistas unicelulares y pluricelulares, con representantes heterótrofos y fotosintéticos", en donde se encuentran ciertas algas marrones y diatomea. El estudio también reveló que *Blastocystis* se encuentra filogenéticamente relacionado con el Estramenófilo flagelado *Proteromonas lacertae* (figura 1); sin embargo, a diferencia de *Proteromonas*, *Blastocystis* no posee flagelos y es inmóvil (Silberman *et al.*, 1996). De acuerdo a la más

reciente clasificación, *Blastocystis* se coloca en la clase recién creada Blastocystea, dentro del Reino Chromista (Cavalier-Smith, 1998). Esta clasificación hace que *Blastocystis* sea el primer Chromista que parasita a los humanos (Windsor, 2007).

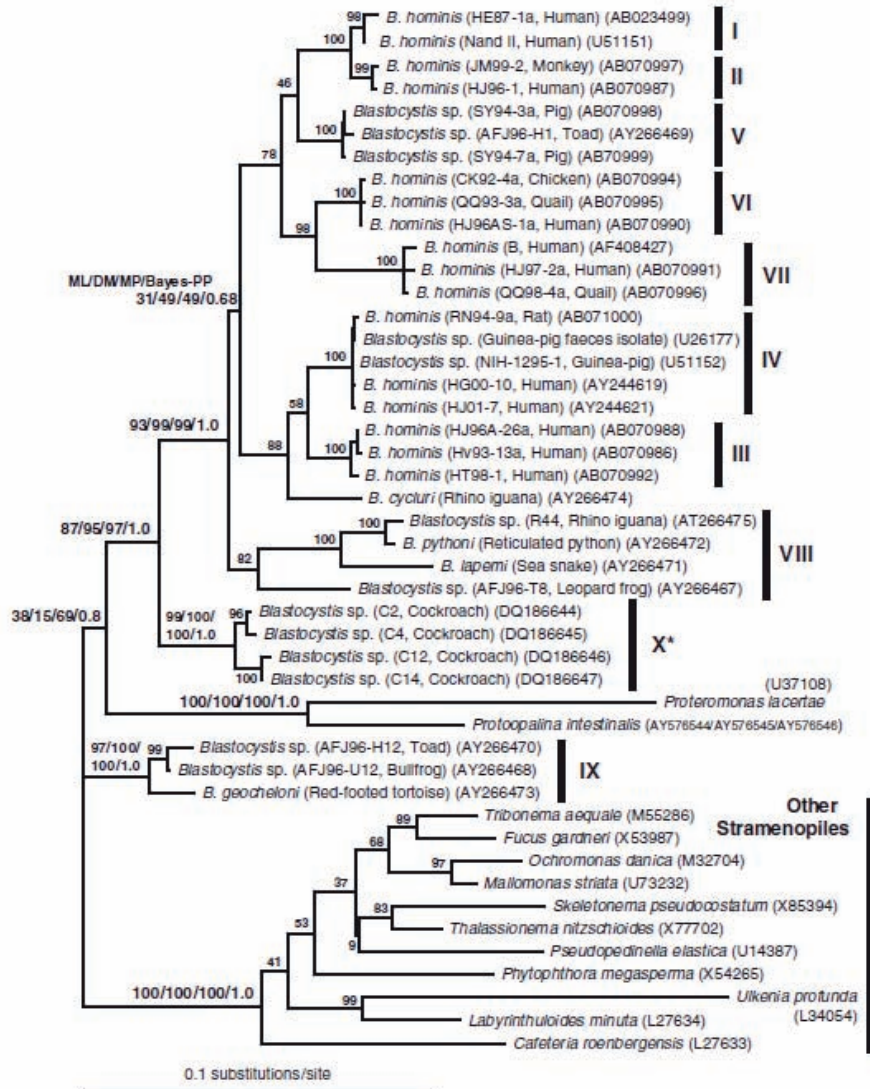


Figura 1. Subtipos de *Blastocystis* spp., (imagen tomada de Yoshikawa *et al.*, 2007). Se incluyen secuencias de *B. hominis*, *Blastocystis pythoni*, *Blastocystis lapemi*, *Blastocystis geocheloni* y de aislados de *Blastocystis* de distintos hospederos (humano, simio, gallina, cerdo, iguana, piton, 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 empleó un algoritmo de Máxima verosimilitud, Máxima parsimonia, un análisis de Probabilidad posterior y un análisis Bayesiano. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap*.

La clasificación taxonómica de *Blastocystis* (Cavalier-Smith, 1998; Yoshikawa *et al.*, 2004) es:

Reino: Chromista

Subreino: *Chromobiota*

Infrareino: *Heterokonta* o Stramenopiles

Subphylum: *Opalinata*

Clase: Blastocystea

Orden: Blastocystida

Familia: Blastocystidae

Género: *Blastocystis*

1.3 Subtipos genéticos (ST)

Dentro del Género *Blastocystis*, existe la discusión sobre la diferenciación de subtipos y especies y el cómo mencionar a sus integrantes, siendo la sugerencia más reciente referirse a estos microorganismos como *Blastocystis* spp., asignándoles un subtipo cuando sea conocido (Stensvold *et al.*, 2006).

Nuevos estudios del gen SSUrDNA de *Blastocystis*, muestran que el género puede ser dividido en al menos 17 subtipos (Alfellani *et al.*, 2013), denominados ST, que son genéticamente tan diferentes que podrían ser considerados especies separadas (Stensvold *et al.*, 2011).

Los seres humanos son principalmente colonizados por los ST1 a ST4 y rara vez por los ST5 a ST9, los subtipos ST10 a ST17 no se han encontrado en los seres humanos hasta la fecha (Stensvold *et al.*, 2009a y 2011; Parkar *et al.*, 2010; Alfellani *et al.*, 2013). La importancia en salud pública de *Blastocystis* y las posibilidades de transmisión zoonótica están sujetos actualmente bajo un intenso escrutinio (Parkar *et al.*, 2007; Stensvold *et al.*, 2009a-c), y es posible que las

diferencias en las manifestaciones clínicas generadas por la infección con *Blastocystis*, estén relacionadas con las diferencias genéticas en el subtipo (Stensvold *et al.*, 2009c y 2011). Además de los seres humanos, el ST3 también se encuentra en una variedad de hospederos en los que se incluyen los primates no humanos (NHP) y algunos ungulados (Stensvold *et al.*, 2009a y 2011), mientras que el subtipo ST4 se ha encontrado en los seres humanos, algunos roedores, NHP y la zarigüeya australiana (Stensvold *et al.*, 2009a; Parkar *et al.*, 2007). Por otra parte, el ST3 parece tener una distribución cosmopolita, mientras que ST4 puede estar restringido principalmente a Europa y América del Norte (Stensvold *et al.*, 2011). Nuevos subtipos son descubiertos (Stensvold *et al.*, 2009a; Parkar *et al.*, 2010; Stensvold *et al.*, 2011) pese a que se sabe muy poco sobre la variación genética en *Blastocystis* a excepción de la SSUrDNA y solo una investigación de la diversidad intra-subtipos ha sido reportada (Stensvold *et al.*, 2011).

Varios estudios muestran que algunos subtipos que antes se consideraban "zoonóticos", también se encuentran en los seres humanos. Un estudio realizado en cuidadores de zoológicos, mostró una transmisión directa de *Blastocystis* de animales a humanos (Alfellani *et al.* 2013). Otro estudio realizado en pacientes daneses, mostró que el ST3 fue el subtipo predominante, seguido de los subtipos 1, 2, y 4. Por otra parte, algunos subtipos tienen una distribución particular, como los subtipos aviarios ST6 y ST7, los cuales son frecuentemente encontrados en Asia y Oriente Medio (Tan, 2008).

También se ha informado que *Blastocystis* sp. ST3, es el parásito predominante en pacientes con enfermedades gastrointestinales crónicas, en estudios realizados en Malasia (Tan *et al.*, 2008), Singapur (Wong *et al.*, 2008), y los EE.UU. (Jones *et al.*, 2009). En un estudio reciente en el que se investigó la diversidad genética intra-subtipo y especificidad del hospedero, mostró que la mayoría de las infecciones en los seres humanos por el subtipo ST3, son el resultado de transmisión de humano a humano (Stensvold *et al.*, 2011).

1.4 Morfología

Blastocystis es un organismo polimórfico, con cuatro formas reconocidas que son: la vacuolar, granular, ameboide y el quiste (Stenzel y Boreham, 1996). Hay poca información sobre las transiciones de una forma a otra. La forma vacuolar, (Figura 2a) también es conocida como la forma de cuerpo central, cuya vacuola puede ocupar hasta el 90% del volumen celular. La forma vacuolar se encuentra principalmente en los cultivos *in vitro* de *Blastocystis* y también es la más frecuentemente observada en los exámenes coproparasitológicos (Leelayoova *et al.*, 2002; Stensvold *et al.*, 2007b; Souppart *et al.*, 2009; Rene *et al.*, 2009); esta forma puede variar mucho en tamaño, de 2 a 200 μm , con un diámetro promedio de 15.4 μm (Stenzel y Boreham, 1996).

Cada célula contiene un borde delgado de citoplasma periférico, núcleo, aparato de Golgi y estructuras tipo mitocondrias, que se encuentran en el borde del citoplasma. Con poca frecuencia, el citoplasma se invagina en la vacuola central, que origina el depósito de los organelos en esta región (Pakandl, 1999; Tan *et al.*, 2001; Nasirudeen *et al.*, 2001b). La función exacta de la vacuola central actualmente no está clara, se ha propuesto que actúa como un organelo de almacenamiento, para funcionar en la reproducción o para el depósito de cuerpos apoptóticos durante la muerte celular (Dunn *et al.*, 1989; Suresh *et al.*, 1994; Nasirudeen *et al.*, 2001b). La forma granular es morfológicamente idéntica a la forma vacuolar, salvo que son notorios los gránulos que se observan en el citoplasma o, más comúnmente, en la vacuola central (Figura 2b), oscila en tamaño de los 2 a los 40 μm y se ve comúnmente en los cultivos no axénicos o viejos. (Tan, 2004).

Hay poca información aún confusa sobre la forma ameboide de *Blastocystis* (McClure *et al.*, 1980; Dunn *et al.*, 1989; Zierdt, 1991; Tan *et al.*, 2001), y se conoce muy poco sobre los factores que inducen la transición hacia esta. Cultivos viejos o tratados con fármacos han demostrado generar formas de tipo amiba (Zierdt, 1973; Tan *et al.*, 1996), así como en algunas muestras fecales (Zierdt, 1973), una similitud general entre estos informes es la presencia de uno o más pseudópodos que, excepcionalmente, no parecen estar implicados en la

locomoción (Figura 2c). La presencia de las bacterias ingeridas, como se observa por microscopía electrónica de transmisión (TEM), apunta hacia un papel fagocítico para esta forma (Boreham y Stenzel, 1993).

El quiste (Figura 2d) es la forma más pequeña del organismo, que va de 2 a 5 μm de diámetro y se cree que es la responsable de la difusión del parásito al medio ambiente (Mehlhorn, 1988; Zaman, *et al.*, 1995 y 1998, Moe *et al.*, 1996, 1999). Los resultados de infecciones experimentales en ratones sugieren que los quistes representan la etapa infecciosa aunque no es la forma común detectada durante el examen parasitológico de las heces (Zaman *et al.*, 1994). Por lo general, el quiste se encuentra rodeado por gruesas multi-capas y carece de una gran vacuola central, pero presenta contenidos internos que incluyen de uno a cuatro núcleos, múltiples vacuolas y depósitos de glucógeno y lípidos (Moe *et al.*, 1996, 1999; Zaman *et al.*, 1997). Se ha documentado que estas formas son resistentes a la lisis por el agua y son capaces de sobrevivir hasta 19 días en ambiente favorables, pero son frágiles en condiciones extremas de calor y frío, y a los desinfectantes comunes (Zaman *et al.*, 1995; Moe *et al.*, 1996). En contraste, las formas vacuolar y granular son sensibles a los cambios de temperatura, ambientes hipertónicos o hipotónicos y a la exposición del aire (Matsumoto *et al.*, 1987; Zierdt, 1991); por ello, se ha sugerido que al ser el quiste la forma más resistente del parásito, sea la forma infectante y de transmisión (Tan, 2004).

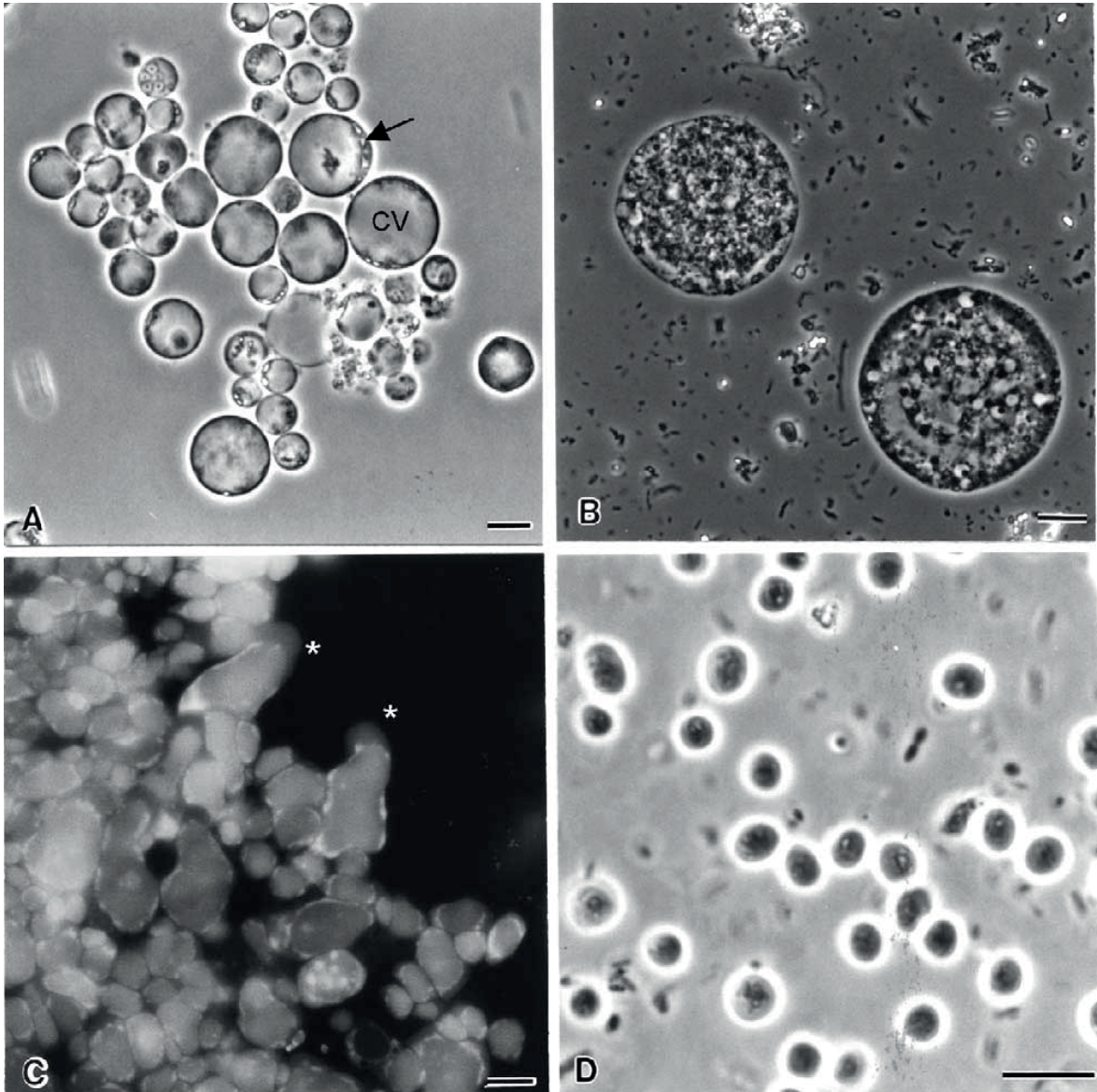


Figura 2. Características morfológicas de *Blastocystis* observadas bajo microscopio de luz. (A) La forma vacuolar es esférica con una gran vacuola central (CV) y un borde delgado periférico al citoplasma, donde son señalados los núcleos con una flecha. (B) La forma granular es generalmente más grande que la forma vacuolar y contiene numerosas inclusiones granulares este estadio refringe bajo la luz del microscopio. (C) La forma ameboide, visualizada a través de microscopía de fluorescencia después de la tinción con naranja de acridina, es de forma irregular y contiene uno o más pseudópodos como proyecciones citoplasmáticas (*). (D) La forma de quiste de *Blastocystis* es generalmente mucho más pequeñas (4-6 μm) que las otras formas y se refractan en la microscopía de contraste de fase. La línea de referencia corresponde a 10 μm . Imagen tomada de Tan (2004).

1.5 Ciclo de vida

Se han propuesto diversos ciclos de vida de *Blastocystis* basados en los estadios conocidos en su momento. Desde el 2008 se propone un ciclo de vida en el que se considera que existen varios reservorios de *Blastocystis* spp. entre poblaciones de animales y que los humanos son hospederos potenciales de distintos subtipos zoonóticos, esto con base en la evidencia de los STs que 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, en donde el quiste penetra al tracto digestivo (de humanos, aves o mamíferos) por la vía oral, a través del consumo de alimentos y/o agua contaminada (Yoshikawa *et al.*, 2004; Leelayoova *et al.*, 2004; Suresh *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007a; 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 y 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 μm (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 que 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 o formas que derivan en los pre-quistes, los cuales son cubiertos por una espesa capa fibrilar, formando así los quistes que finalmente son depositados y expulsados 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, observándose que estos se pueden formar a partir de las formas vacuolares, granulares y ameboideas (Tan 2008). Se ha descrito que hay

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 se ve disminuida después de los dos días, encontrándose quistes viables de *Blastocystis* hasta después de los 19 días de ser expuestos al medio ambiente, esto en un medio acuoso (Moe *et al.*, 1996). Los quistes viables en agua y/o 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.*, 2004; Leelayoova *et al.*, 2008; Tan, 2008).

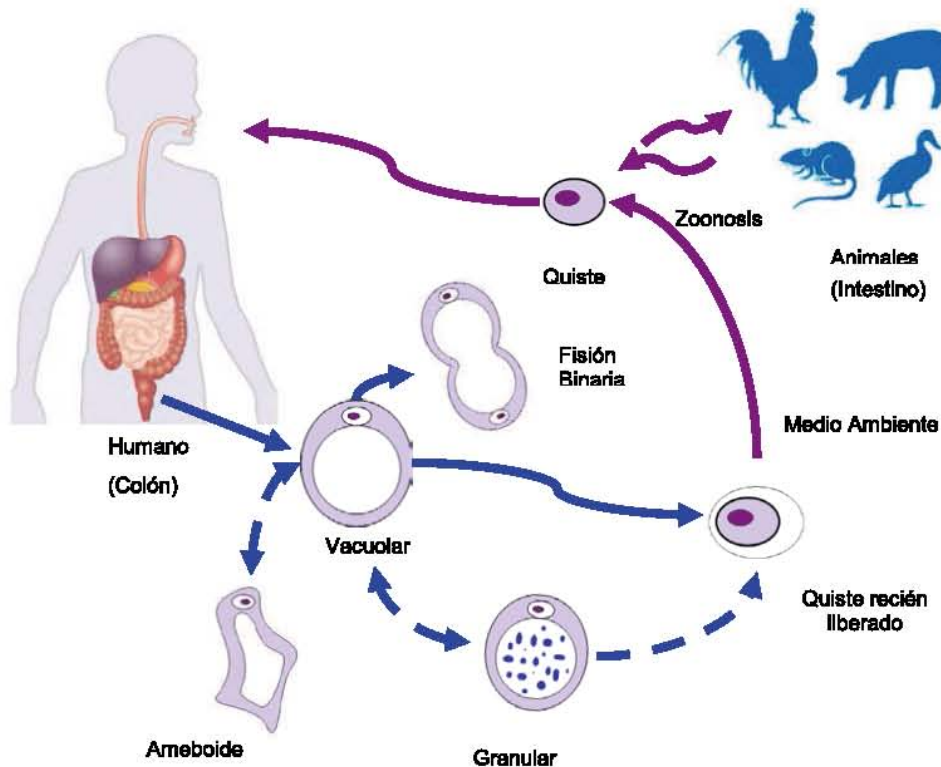


Figura 3. Ciclo de vida de *Blastocystis* (cortesía de la Biol. Cecilia Rangel). Después de la ingesta del quiste, se forma el estadio vacuolar en el tracto digestivo del hospedero (flechas azules), el cual se reproduce por fisión binaria y se presentan transiciones con las formas granular y ameboide (la transición de una forma a otra no está bien comprendida por lo que se representa con líneas punteadas). El enquistamiento ocurre al final del tracto intestinal, para liberar los quistes en las heces y al medio ambiente (flecha roja), los quistes recién liberados presentan una capa fibrilar la cual gradualmente se pierde. En el ciclo de vida de *Blastocystis* podemos decir que se trata de una zoonosis ya que se han encontrado quistes de este parásito en roedores y animales de granja.

1.6 Epidemiología

Blastocystis presenta una mayor prevalencia en países en vías de desarrollo y zonas tropicales pobres, la prevalencia depende del área, siendo más alta en países en vías de desarrollo, >60% de los niños de Indonesia (Pegelow, *et al.*, 1997). *Blastocystis* es también ampliamente observado en los países desarrollados, incluyendo los Estados Unidos (23%), Francia (3%), y el Reino Unido (3.9%) (Amin, 2002; Pinel *et al.*, 1999; Suresh y Smith, 2004). Sin embargo, los datos de prevalencia dependen en gran medida de los métodos utilizados para su detección (Poirier *et al.*, 2011).

En México, la información que se tiene sobre *Blastocystis* es limitada en los aspectos clínicos, epidemiológicos y de identificación de sus subtipos genéticos, además de ser desconocido 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 organismo.

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 suburbana del Distrito Federal), se encontró una prevalencia del 42% (Cruz *et al.*, 2003). En el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, por examen coproparasitoscópico, se ha observado que *Blastocystis* presentó durante el 2011 una prevalencia cercana al 23% (Comunicación verbal con el QBP. David Moncada responsable del diagnóstico coproparasitoscópico en el Laboratorio Clínico del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”).

Cabe recalcar que los métodos de detección como los estudios coproparasitoscópicos y las técnicas de concentración con formol-éter, subestiman la prevalencia de *Blastocystis* en comparación con los cultivos *in vitro* y de las técnicas moleculares (Leelayoova *et al.*, 2002; Stensvold *et al.*, 2007b; Suresh y Smith, 2004; Zaman *et al.*, 1994.). Sin embargo, el cultivo es un método de diagnóstico que involucra mucho tiempo, y algunos subtipos presentan una tasa de crecimiento baja en condiciones de cultivo (Stensvold *et al.*, 2007b).

1.7 Patología

La participación de *Blastocystis* como patógeno para el humano se encuentra en debate, existiendo artículos que lo refieren como un parásito que genera daño y otros que lo refieren como comensal, esto debido a que se han documentado tanto casos de portadores asintomáticos, como de portadores 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; Cimerman *et al.*, 1999; Rossignol *et al.*, 2005; Moghaddam *et al.*, 2005; Boorom *et al.*, 2007; Kaya *et al.*, 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, es que se ha sugerido la existencia de variantes comensales y otras 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). Dentro de las características clínicas no específicas que se le han relacionado a *Blastocystis* se encuentran: náuseas, anorexia, dolor y distensión abdominal, flatulencia y diarrea crónica o aguda, 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, siendo el ST3 el que se le ha asociado con urticaria aguda y con otros padecimientos cutáneos y alérgicos (Katsarou-Katsari *et al.*, 2008; Giacometti *et al.*, 2003).

Recientemente respecto a la patogenicidad de *Blastocystis* se han propuesto algunos determinantes y mecanismos relativos (Stensvold *et al.*, 2009c). 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.*, 2009c). 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.*, 2009c), 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* spp. (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* es desconocida, se ha documentado la degradación de estas inmunoglobulinas secretoras en sobrenadantes y extractos crudos de *B. ratti* (*Blastocystis* spp. 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* spp. 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 trans-epitelial 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 κ 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).

Existe un debate sobre las relaciones entre abundancia de parásitos y los síntomas presentes en individuos infectados con *Blastocystis*, ya que se ha

asociado que pacientes sintomáticos presentaron una cuenta de parásito superior a 5 microorganismos por campo observados con los objetivos 40X o 100X (Stenzel y Boreham, 1996). Por lo contrario, Leder *et al.* (2005), no encontraron ninguna correlación, aunque la microscopía de diagnóstico tiene baja sensibilidad para detectar quistes, por lo tanto subestima la carga parasitaria (Poirier *et al.*, 2011).

1.8 Binomio *Blastocystis*-VIH/SIDA

Las parasitosis intestinales son infecciones comunes a nivel mundial, especialmente en países con problemas de contaminación del agua y condiciones deficientes de salubridad (Maravilla *et al.*; 2007). Los pacientes con inmunosupresión se ven frecuentemente más afectados por parásitos que generan cuadros autolimitantes en los portadores inmunocompetentes; por ejemplo, en pacientes con VIH, se presentan coccidios intestinales como *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e *Isospora* como una causa común de diarrea crónica (Kurniawan *et al.*, 2009). Chinchá *et al.*, (2009), analizaron los resultados de estudios coproparasitológicos de 2056 pacientes adultos, de los cuales 334 fueron VIH positivos, encontraron que para los participantes inmunocompetentes los parásitos más frecuentes fueron *Blastocystis* (38%), *Giardia* (4%) e *Isospora* (3%), mientras que para los pacientes con VIH fueron *Blastocystis* (25%), *Isospora* (8%) y *Cryptosporidium* (5%).

Un estudio realizado en 318 adultos con VIH/SIDA, diarrea crónica y cuentas de CD4+ ≤ 50 células/mm³ en Indonesia, mostró que el 73% de los participantes tuvieron *Blastocystis*, 12% presentaron *Cryptosporidium* y 8% *Cyclospora*. (Kurniawan *et al.*, 2009). También se llevó a cabo la identificación de los subtipos genéticos de *Blastocystis* de 20 pacientes adultos con VIH/SIDA portadores de este parásito de Malasia y se observó que 2 fueron subtipo 1, 1 fue subtipo 2, 9 fueron subtipo 3 y 6 fueron subtipo 4; asimismo, no lograron tipificar 2 muestras que el autor clasificó como subtipos autóctonos. En este estudio no se logró asociar la presencia de los subtipos a manifestaciones clínicas, ni a la cuenta de CD4+ (Tan *et al.*, 2009). Un artículo con pacientes italianos, mostró que aquellos participantes con VIH/SIDA infectados con *Blastocystis*, presentaron una

asociación significativa con síntomas alérgicos solo cuando eran detectados ≥ 5 organismos por campo, con lente de alta potencia (Giacometti *et al.*, 2003); la frecuencia de *Blastocystis* spp. en estos pacientes fue de 19.8%, este valor se acerca a los datos reportados por Junod (1995) de 15 a 16%. Un estudio en el norte de la India, utilizando estudios coproparasitoscópicos, informó que 2 (8%) de 26 pacientes infectados por VIH estaban parasitados con *Blastocystis* spp. (Prasad *et al.* 2000).

1.9 Diagnóstico molecular de *Blastocystis* spp.

El polimorfismo natural de este organismo y el que se presenta de manera tanto sintomática como asintomática, dificultan el diagnóstico de *Blastocystis*. Rutinariamente el diagnóstico se realiza con la identificación de las formas vacuolar y/o quística en exámenes coproparasitoscópicos o por la examinación de un frotis directo de heces con solución salina y lugol con el análisis de al menos tres muestras consecutivas, otra forma de diagnóstico es la técnica de concentración con formol-acetato de etilo. Sin embargo, desde que se ha incrementado el interés en el estudio de este organismo se han implementado nuevas técnicas diagnósticas y de propagación, como lo es el cultivo *in vitro* en medio de Jones, el cual dura de 24 a 72 horas y presenta una mayor sensibilidad en relación a los métodos de concentración y exámenes directos de heces. Aunque existe un reporte que indica que este medio no es útil para crecer aislados pertenecientes a marsupiales. Stensvold *et al.* (2006) elaboraron oligonucleótidos específicos para el diagnóstico de *Blastocystis*, los cuales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), amplifican una región conservada de 310 pares de bases pertenecientes a la SSUrDNA, con una especificidad del 100% cuando la temperatura de alineamiento es de 60 °C, observándose que con esta técnica se pueden detectar desde 32 parásitos por cada 200mg de heces, siendo esta prueba más sensible que la técnica de concentración formol-éter (TCFE) y el cultivo *in vitro*. Posteriormente se han descrito otros protocolos de PCR con la finalidad de abarcar el mayor número de ST en PCR en tiempo final y en tiempo real (Scicluna *et al.*, 2006; Poirier *et al.*, 2011; Santin *et al.*, 2011).

Las técnicas rutinarias de exámenes coproparasitocópicos dependen mucho de la experiencia en la observación al microscopio de las distintas formas de *Blastocystis*, por lo que la sensibilidad y especificidad varía según el observador, sin embargo estas técnicas son rápidas y baratas. El cultivo *in vitro* más que método de diagnóstico es utilizado en la propagación e investigación de *Blastocystis*, siendo el diagnóstico por PCR con oligonucleótidos específicos, el método más sensible y específico, aunque relativamente más complejo y costoso. La PCR descrita por Kary Mullis en 1983, aplica la bioquímica básica de la replicación del DNA, ya que copia secuencias específicas de DNA mediante una serie de reacciones *in vitro*, y puede amplificar secuencias blanco o molde de DNA presentes en cantidades infinitesimales entre una población con otras moléculas de DNA. La porción de DNA que se amplifica da información útil para su estudio o uso diagnóstico (William et. al. 2006).

Uno de los requisitos para la PCR, es que se precisa de alguna información sobre la secuencia nucleotídica del DNA a clonar, información de la secuencia que se utiliza para sintetizar dos iniciadores oligonucleotídicos, uno para el extremo 5' y otro para el extremo 3'. La mezcla de PCR consta del DNA molde para la amplificación y la mezcla maestra; esta, a su vez, se compone de iniciadores, los cuatro nucleótidos trifosfatados, la enzima DNA polimerasa termoestable (*Taq polimerasa*), cloruro de magnesio y agua. La reacción en cadena de la polimerasa consiste en tres fases repetitivas:

- 1) Desnaturalización del DNA. El DNA de doble cadena se desnaturaliza por lo que se disocia en cadenas sencillas (normalmente unos 5 minutos). Es decir, el primer paso es la elevación de la temperatura de la mezcla de reacción hasta aproximadamente 95°C, a esa temperatura, el DNA bicatenario se separa en dos hebras simples. Esto sucede porque la energía térmica rompe los puentes de hidrógeno que mantienen las dos hebras de DNA juntas a temperaturas más bajas. Esta desnaturalización térmica de DNA es fácilmente reversible por enfriamiento.

- 2) Hibridación de los iniciadores. En éste paso se disminuye la temperatura de la reacción y debe encontrarse entre 50 y 70°C, la denominada temperatura de

hibridación, a la que los iniciadores se unen al DNA de cadena sencilla. Los iniciadores son oligonucleótidos sintéticos (de 15 a 30 nucleótidos de longitud) complementarios a las secuencias que flanquean el DNA molde.

3) Extensión. Los iniciadores sirven como el punto de partida para la síntesis de nuevas cadenas de DNA complementarias al DNA molde, ya que a la mezcla de reacción se le añade la enzima *Taq polimerasa*. La síntesis de DNA se realiza a una temperatura de 70-75°C; la enzima extiende los iniciadores añadiendo nucleótidos en dirección 5' a 3', utilizando el DNA de cadena sencilla como molde. El resultado es una molécula de DNA de doble cadena recién sintetizada con los iniciadores incorporados en ella. La repetición de los ciclos de PCR puede amplificar la secuencia original del DNA más de un millón de veces. Cada grupo de tres pasos, desnaturalización del DNA de doble cadena, hibridación de los iniciadores y extensión por la polimerasa, es un ciclo. La PCR es una reacción en cadena porque el número de cadenas nuevas de DNA se dobla a cada ciclo y las nuevas cadenas junto con las viejas sirven de molde para el siguiente ciclo. Este proceso está automatizado y lo realiza una máquina denominada *Termociclador*, que se puede programar para que realice un número predeterminado de ciclos, produciendo grandes cantidades de DNA de segmentos específicos. (William et. al. 2006).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Existe algún subtipo genético de *Blastocystis*, potencialmente patógeno, que pueda presentar recurrencias y ser de alta capacidad infectiva para los pacientes con VIH/SIDA?

3. JUSTIFICACIÓN

En México, la información que se tiene sobre los aspectos clínicos y epidemiológicos de la Blastocistosis es limitada, no obstante se ha incrementado el número de personas inmunocompetentes y con inmunocopromiso que son diagnosticados como portadores de este organismo cotidianamente en los laboratorios de parasitología. Por ello, el presente estudio pretende aclarar la

presencia de algún subtipo genético de *Blastocystis* spp. potencialmente patógeno, al generar síntomas cutáneos y/o gastrointestinales, con alta capacidad infectiva para los pacientes con VIH/SIDA. Los resultados que se deriven de este estudio motivará a que los médicos y el personal de laboratorio encargado del diagnóstico de parásitos intestinales, se sensibilicen sobre el papel patógeno de este protozoo intestinal y de la importancia de la incorporación de técnicas actuales de diagnóstico, para obtener un tratamiento oportuno e incremento en la calidad de vida de los pacientes con VIH/SIDA.

4. OBJETIVO

Llevar a cabo la caracterización de los subtipos genéticos de *Blastocystis* spp. en pacientes con VIH/SIDA, identificando su dinámica de infección mediante procesos de re-infección o desplazamiento de subtipos.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Caracterizar a los parásitos que infectan a pacientes con VIH-SIDA.
- 2) Estandarizar una técnica de PCR en punto final para la identificación de *Blastocystis* spp.
- 3) Identificar los subtipos genéticos de *Blastocystis* presentes en nuestra población, así como su posible asociación con algún trastorno gastrointestinal.
- 4) Determinar la existencia de re-infección o desplazamiento de estos subtipos.

6. HIPÓTESIS

Si existen algún mecanismo biológico que favorezca la infección y colonización por algún subtipo genético de *Blastocystis*, entonces es posible que los pacientes con VIH/SIDA se infecten o re-infecten con un subtipo dominante y se desplacen otros subtipos.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño experimental

El presente estudio es descriptivo (ya que se estudió una muestra poblacional), abierto (debido a que todos los investigadores conocieron las variables del experimento), observacional (se refiere a que los investigadores no modificaron los fenómenos evaluados), prospectivo (los datos obtenidos fueron de eventos que se presentaron en el futuro) y longitudinal (distintos datos se obtuvieron del mismo sujeto en más de una ocasión y se relacionan entre sí).

Previo consentimiento informado (anexo 1), se invitaron a participar a 34 pacientes con VIH/SIDA que asistieron a consulta a la Clínica de VIH/SIDA del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y que cumplieron con los criterios de inclusión de este protocolo. A todos los participantes se les solicitaron 3 muestras seriadas de sus heces (T1) y se les citó para su seguimiento clínico al primer mes (T2), y posteriormente a los 3 (T3), 6 (T4) y 9 (T5) meses, donde nuevamente se les solicitaron muestras fecales seriadas (Figura 4). Durante sus visitas de control se les realizó un examen clínico minucioso, para la búsqueda de alteraciones gastrointestinales y dermatológicas entre otras. Debido a las características del diseño se procuró que el estudio iniciara de manera simultánea con todos los pacientes a manera de cohorte.

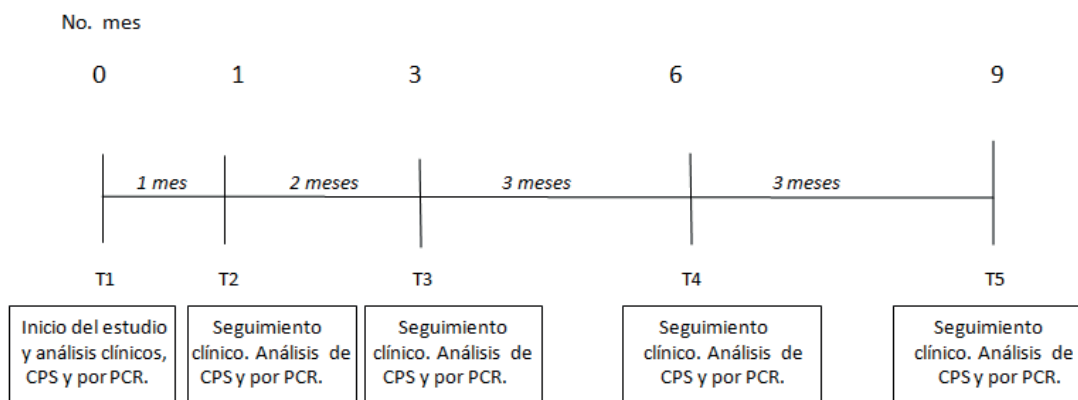


Figura 4. Diseño experimental. Las líneas verticales muestran el tiempo (T) en el que se llevaron a cabo los exámenes coproparasitológicos, moleculares y el control clínico.

7.2 Pacientes

Ya que se ha documentado que la frecuencia de *Blastocystis* en pacientes inmunocompetentes va del 40 al 90% (Cruz-Licea et al., 2003), para el cálculo del tamaño de muestra se estimó una frecuencia de infección del 50%, con un 10% de margen de error y un nivel de potencia de la prueba del 95%, siendo el número total de casos del estudio de 96 participantes. Sin embargo, por factibilidad en la reclusión de los pacientes, por conveniencia solo se incluyeron 34 participantes.

7.2.1 Criterios de inclusión

Pacientes con VIH/SIDA que acudieron a la clínica de VIH/SIDA del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, hombres y mujeres mayores de 18 años con más de un año de residencia en el Distrito Federal, que participen en el programa de VIH/SIDA del Gobierno del DF-Clinica Condesa-Hospital General “Dr. Manuel González” para su atención y seguimiento clínico. Todos los participantes fueron diagnosticados al inicio de su reclutamiento con VIH/SIDA (aproximadamente 1 año), presentaron estudios vigentes (6 meses) de seguimiento de control virológico (carga viral indetectable y cuenta de CD4+ \geq 200 células/mm³), y estaban bajo tratamiento anti-retroviral (HAART) con apego mayor al 90%.

7.2.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron a mujeres embarazadas o en lactancia.

7.2.3 Criterios de eliminación

Pacientes que aceptaron inicialmente participar en el estudio y que posteriormente decidan ser dados de baja, mujeres que se embaracen, pacientes a quienes se les tenga que modificar su esquema de tratamiento retroviral y aquellos participantes que no se apeguen al seguimiento clínico y de tratamiento. También aquellos participantes que recibieron tratamiento antiparasitario con metronidazol, furazolidona, emetina o sulfametoxazol-trimetoprima recetado por médicos distintos a la Clínica de VIH/SIDA.

7.3 Estudios del laboratorio clínico

A todas las muestras fecales seriadas se les realizaron estudios coproparasitológicos (CPS) de concentración por el método de Faust, para la búsqueda de parásitos y posteriormente se les realizó una tinción de Kinyoun para

la búsqueda de coccidias intestinales. Para ello, las muestras fueron remitidas al Laboratorio Clínico de nuestro hospital de las cuales se tomaron 2 alícuotas de 500 a 1000 mg, se guardaron en tubos tipo eppendorf de 1.5 ml y se congelaron a -20°C para su posterior análisis molecular (Figura 5).

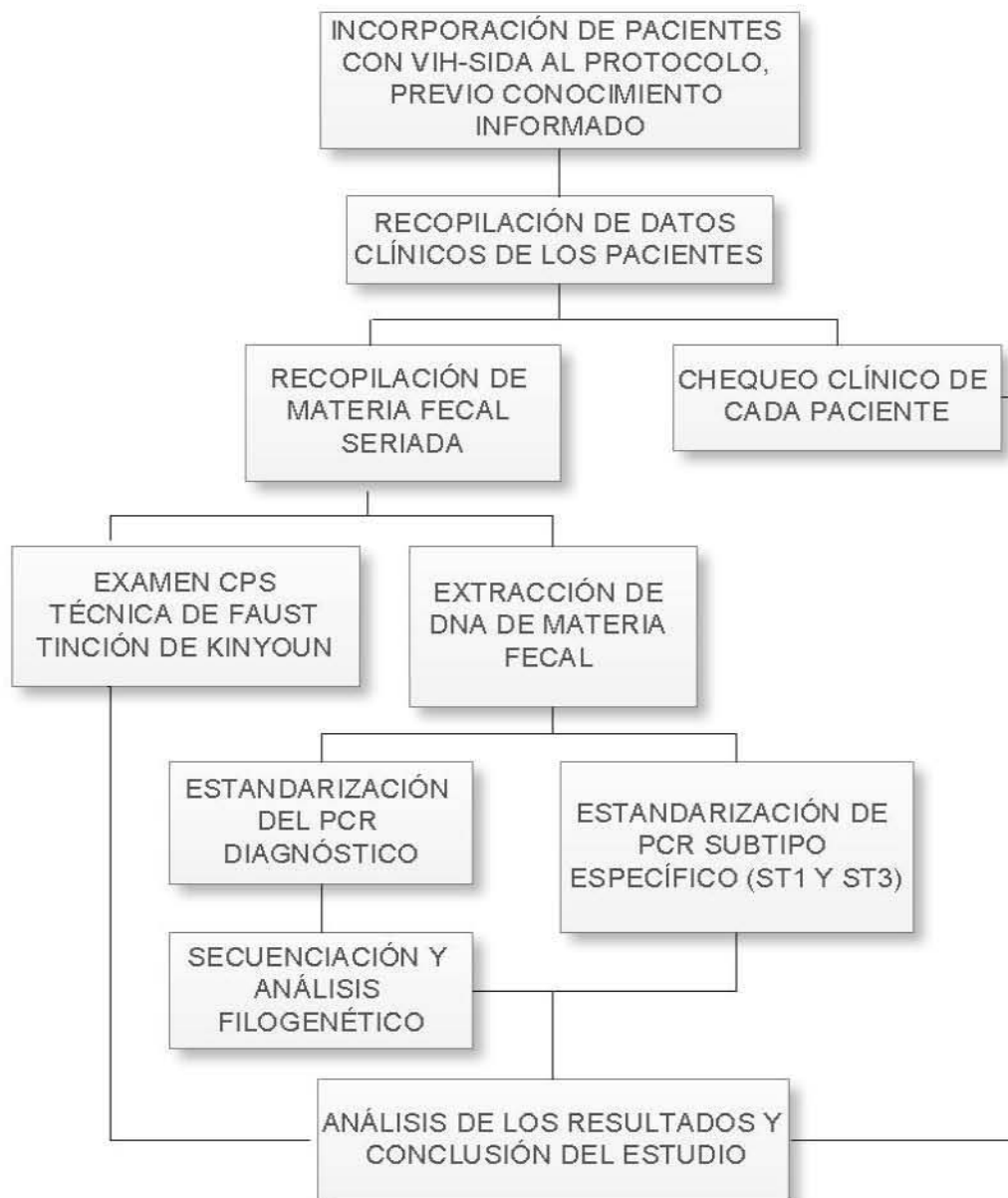


Figura 5. Flujograma. En él se muestran los principales procesos del desarrollo experimental de la presente tesis.

7.3.1 Examen coproparasitoscópico por el método de Faust (Según especificaciones del Programa de Aseguramiento de la Calidad, PACAL)

- 1.- Aproximadamente 2g de materia fecal fueron colocadas en tubos de plástico de 50 mL tipo falcon con pedestal rotulado en las que debía señalarse claramente el nombre del paciente, la fecha y el número de la muestra.
- 2.- Se agregaron 10 mL de agua de la llave y se mezcló con un aplicador de madera.
- 3.- La mezcla homogénea resultante se tamizó con una malla de alambre y el filtrado se recibió en un tubo de ensayo (13X100) claramente rotulado.
- 4.- Se centrifugó durante 10 minutos a 500 xg, y se decantó el sobrenadante.
- 5.- El botón se re-suspendió nuevamente con agua de la llave para realizar un segundo lavado y se centrifugó 10 minutos a 500 xg.
- 6.- Se eliminó el sobrenadante y se agregó al sedimento aproximadamente 2 mL de una solución de ZnSO₄ de densidad conocida de 1.180g/mL. Se re-suspendió el botón con la ayuda de un aplicador de madera hasta que se obtuvo una solución homogénea.
- 7.- Se aforó el tubo de ensayo con ZnSO₄ hasta un nivel de 3 mm antes del borde y se centrifugó a 500 xg durante un minuto.
- 8.- El tubo se colocó en una gradilla y con la ayuda de una pipeta Pasteur se vertió cuidadosamente, resbalando por las paredes del tubo, ZnSO₄, hasta que se formó un menisco en el borde del tubo.
- 9.- Se recogió la película del menisco con un cubreobjetos (22 x 22 mm) y se colocó en un portaobjetos de 25 x 75 mm, donde previamente se adicionó una pequeña gota de lugol.
- 10.- Se observó al microscopio con los objetivos de 10X y 40X.

7.3.2 Tinción de Kinyoun

- 1.- Para materia fecal bien formada (no diarreica) se tomaron aproximadamente 2g de heces con un abatelenguas y se depositaron en un tubo tipo falcon rotulado con los datos del paciente.

- 2.- Se agregó 4 mL de formol (al 10% respecto al grado reactivo) y se mezcló con un aplicador de madera.
- 3.- La mezcla resultante se tamizó con una malla de alambre a un tubo de ensayo (13x100 mm) rotulado como su antecesor.
- 4.- Se centrifugó por 10 minutos a 500 xg y se decantó el sobrenadante.
- 5.- Ayudados con un aplicador de madera, se tomó una pequeña muestra del sedimento y se extendió en un portaobjetos de 25 x 75 mm en un área no mayor de 1 cm², procurando hacer un extendido homogéneo y no muy delgado.
- 6.- Se dejó secar la preparación a temperatura ambiente y se fijó el extendido con metanol durante 30 segundos y se esperó hasta que la preparación secó al aire libre.
- 7.- El extendido fecal se cubrió completamente con el colorante fucsina fenicada (1g de fucsina+5g de fenol) por 5 minutos y se retiró el exceso bajo un flujo constante de agua
- 8.- Se decoloró con Etanol-HCl y se lavó con agua.
- 9.- Se cubrió el extendido con azul de metileno como colorante de contraste durante 3 minutos y se retiró el exceso con agua.
- 10.- Se observar con objetivo de 40x y con objetivo de inmersión toda la preparación.

7.4 Diagnóstico molecular de *Blastocystis*

7.4.1 Extracción de DNA fecal total

La extracción de DNA fecal total se llevó a cabo mediante la utilización del sistema comercial Puregene DNA purification system, Genomic DNA Purification kit (Gentra Systems; Alemania). Las extracciones se realizaron de acuerdo a las especificaciones del proveedor con las siguientes modificaciones, a cada 300 mg de muestra se le agregaron 500µl de solución de lisis (Tris [hidroximetil] aminometano, ácido etilenodiaminotetraacético y duodecil sulfato de sodio) y se incubó a 65°C en baño María por 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) conservando la muestra a 4°C por 40 minutos y se centrifugó

por 3 minutos a 13,000 xg, esto se hizo para que las proteínas precipitaran y que el DNA se quedase en el sobrenadante. Se retiró el sobrenadante y se le agregó nuevamente 200µl de la solución para precipitar proteínas y se trató como el paso anterior. Posteriormente, se agregó isopropanol frío al sobrenadante en una proporción 1:1 y se colocó a 4°C durante toda la noche, se centrifugó a 13,000 xg por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 400µl de etanol absoluto frío, se homogenizó y se centrifugó a 13,000 xg por 1 minutos. Se retiró el etanol y se dejó secar la pastilla con el DNA a temperatura ambiente. Una vez seco el DNA, se agregaron 50µl de solución hidratadora de DNA (DNA Hydration Solution Tris [hidroximetil] aminometano, ácido etilen-diamino-tetraacético) y se incubó por 30 min a 65°C.

7.4.2 Extracción Fenol/Cloroformo

Para incrementar la calidad y concentración del DNA total fecal, se realizó una segunda reextracción mediante la técnica convencional de Fenol/Cloroformo, para la cual:

1. Se adicionaron a cada muestra de DNA total fecal, 400µl de buffer TE (TRIS-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM pH 8.0) y se agregaron 450 µl de una mezcla fenol equilibrado con TRIS-HCl a pH8/cloroformo (v/v).
2. Se centrifugó la mezcla por 5 minutos a 13,000xg a 4 °C (Legend micro 21R centrifuge thermo scientific) y se conservó la fase acuosa, conteniendo el DNA y se eliminó la fase orgánica con las proteínas, se transfirió la fase superior a un tubo limpio a la que se le adicionó una porción equivalente de Cloroformo/Alcohol Isoamílico (24:1, v/v), se centrifugó por 5 minutos a 13,000xg a 4°C
3. La fase acuosa (fase superior) se transfirió a un tubo limpio, al que se le añadió, una porción 1:1 de isopropanol absoluto frío y acetato de potasio al 10% (v/v). La mezcla resultante se agitó suavemente y se dejó reposar durante toda la noche.
4. Se centrifugó a 13,000xg por 10 minutos a 4°C, se decanta el sobrenadante y se agrega 400µl de etanol frío al 70%, se agita con suavidad y se centrifuga nuevamente de la misma manera, se elimina nuevamente el sobrenadante y se deja secar a temperatura ambiente. Se adiciona 150µL de TE (Tris-HCl y EDTA) y se coloca a 65 °C durante toda la noche, para que se resuspenda el DNA.

Se midió la concentración de DNA y por último se conservaron las muestras a -20 °C, hasta su uso.

La concentración del DNA se determinó en un espectrofotómetro (WPA UV 1101 Biotech Photometer), leyendo la absorbancia 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 2% en tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA) 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) 1:10, depositados en el gel y sometidos a migración electroforética a un voltaje constante de 80V, durante una hora y media (Thermo EC1000-90). Tras lo cual, se procedió a su observación mediante luz ultravioleta y fotodocumentación (Fotodocumentador UVP BioImaging Systems Epichemi II Darkroom).

7.4.3 Diagnóstico molecular por PCR

El diagnóstico molecular de *Blastocystis* se llevó a cabo por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*). Para ello, se evaluaron distintos oligonucleótidos previamente documentados en la literatura (Cuadro 1), algunos diseñados para un PCR en punto final y otros para PCR en tiempo real, y que ofrecen la posibilidad de determinar el subtipo genético a través de su secuencia. Para las amplificaciones se utilizaron termocicladores comerciales marca Axygen, y se probaron diversas condiciones de amplificación tales como concentración de magnesio, temperaturas de alineamiento y extensión, tiempos de extensión, adición de *enhancer* y de albúmina sérica bovina. Al término de la estandarización, se estableció el siguiente programa de amplificación: un ciclo de activación de la enzima, a 94°C durante 5 minutos, 36 ciclos de amplificación con 94°C por 30 segundos (proceso de desnaturalización del DNA), 65°C por 30 segundos (proceso de alineamiento de oligonucleótidos) y 72°C por 30 segundos (extensión y síntesis del DNA). Se agregó un ciclo final a 72°C por 10 minutos (extensión final). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en tubos tipo ependorff de 0.2mL, conteniendo 1.5µL de DNA total fecal

(concentración mínima de 40ng/μL y una máxima de 800ng/μL), 1 unidad de *Taq DNA polymerase* (Altaenzymes), 1.8μL de MgCl₂ 50mM (Altaenzymes), 2.5μL de desoxinucleótidos (200mM c/u), 1μL *enhancer* (Epicenter 10X con betaina), 2μL Albumina Sérica Bovina (10μg/μL), *Taq* PCR Buffer (Epicentre, 10X), 25 picomoles de cada oligonucleótido por reacción y agua inyectable (cbp 25 μL).

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para el diagnóstico molecular de *Blastocystis*.

Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)	Su secuencia permite determinar el subtipo genético	Referencia
BLF 5'TTACTAAAATCCAAAGTGTTTCATCGGAC3' BLR 5'GGAATCTCTTAGAGGGACACTATACAT3'	~310	No	Stenvold <i>et al.</i> , 2006
BL18SPPF1 5'AGTAGTCATACGCTCGTCTCAA3' BL18SR2PP 5'TCTTCGTTACCCGTTACTGC3'	320-342	Si	Poirier <i>et al.</i> , 2010
Blast 505-532 5'GGAGGTAGTGACAATAAATC3' Blast 998-1017 5'TGCTTTCGCACTTGTTTCATC3'	479-500	Si	Santín <i>et al.</i> , 2012

Los productos amplificados fueron sometidos mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% con buffer de TAE1x, pH 7.7, y visualizados con bromuro de etidio. Las muestras y los marcadores moleculares (Amresco E687) fueron diluidos en buffer de carga (rojo de cresol y glicerol) 1:10, depositados en el gel y sometidos a migración electroforética a un voltaje constante de 80 V, durante una hora aproximadamente. Tras lo cual, se procedió a su observación mediante luz ultravioleta y fotodocumentación. Se utilizó como control positivo DNA de *Blastocystis* obtenido de un estudio coproparasitológico positivo a este parásito, y como control negativo se utilizó DNA de humano. Los amplicones obtenidos con los oligonucleótidos de Santin et al. (2011), se cortaron directamente de los geles y se purificaron a través del sistema comercial Pure Link-Gel Extraction Kit (Invitrogen), re-suspendiéndose el producto en agua inyectable estéril.

7.4.4 Identificación de los subtipos genéticos de *Blastocystis*

spp.

Para la identificación de los ST se utilizaron los oligonucleótidos desarrollados por Yoshikawa *et al* (2003), cuyas secuencias se resumen en el cuadro 2. 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, 10 minutos. Es importante señalar que aunque existen 9 ST capaces de infectar al hombre, en México al igual que en el resto del mundo, los ST más frecuentes son el 1 y 3, por lo que inicialmente se ensayaron los PCR para estos dos subtipos. Las reacciones de amplificación se realizaron en tubos ependorff de 0.2ml, conteniendo 5µl de DNA (concentración mínima de 80ng/mL y máxima de 250ng/mL), 3 unidades de *Taqpol* (Epicentre, MasterAmp), 3µL de MgCl₂ 25mM (Promega), 5µL de desoxinucleótidos (200mM c/u), 3µL de oligonucleótido F (20pm/µL), 3µL de oligonucleótido R (20pm/µL), 1µL de enhancer (betaina 10X), llevando la reacción a un volumen final de 50 µL 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.

Cuadro 2. Oligonucleótidos usados para la identificación de los ST 1 y 3 de *Blastocystis* spp.

Subtipo	Producto (pb)	Oligonucleótido
I	351	SB83F 5'GAAGGACTCTCTGACGATGA3' SB83R 5'GTCCAAATGAAAGGCAGC3'
III	704	SB227F 5'TAGGATTTGGTGTTTGGAGA3' SB227R 5'TTAGAAGTGAAGGAGATGGAAG3'

7.4.5 Secuenciación de amplicones

Debido a que obtuvieron excelentes resultados con los iniciadores documentados por Santín *et al.*, (2011), se purificaron los amplicones obtenidos con estos iniciadores por medio del sistema QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) (según las especificaciones del proveedor) y se enviaron a secuenciar con un proveedor comercial.

7.5 Análisis de las secuencias y estudio filogenético por el método Neighbor-joining

Las secuencias obtenidas se procesaron usando el programa Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) para verificar que no existieran errores en el proceso de la secuenciación y para obtener las secuencias consenso.

Estas secuencias (excluyendo los sitios de primers) fueron sometidos a búsquedas en BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) en la base de datos GenBank para confirmar que las secuencias corresponda con *Blastocystis* spp. Las secuencias de nucleótidos obtenidas en este estudio, así como las secuencias publicadas por Santin *et al.* (2011) en donde se encuentran 10 de los 17 subtipos reconocidos actualmente, fueron alineados utilizando el programa Clustal W (www.ebi.ac.uk). Los parámetros utilizados para este alineamiento fueron los predeterminados por el programa, además se revisó manualmente el alineamiento.

Los análisis evolutivos moleculares y filogenéticos fueron realizados utilizando la versión de software MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007). La Inferencia filogenética fue desarrollada por el método de neighbor-joining (NJ) que produce un único árbol final bajo el principio de la evolución mínima (Saitou y Nei 1987). En el que la distancia genética se calculó con el parámetro de Kimura 2 y el Poder de confiabilidad se evaluó a través de análisis bootstrap (1,000 repeticiones).

7.6 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis descriptivo con las frecuencias de los distintos microorganismos encontrados y se buscaron asociaciones entre las diferentes variables clínicas y de otros microorganismos con la presencia de *Blastocystis* y

de sus subtipos, usando las pruebas de X^2 ; 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 *Confidence Intervale*). El análisis estadístico de los datos obtenidos fue desarrollado con el programa Epi-Info versión 6.04.

7.7 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 “Subtipos genéticos de *Blastocystis hominis* en pacientes con VIH/SIDA: Estudio sobre la dinámica de Infección”, aprobado por los comités de Ética e Investigación del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, con el número de registro 12-10-2010, de acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud, en materia de investigación para la salud (Anexo 1).

8. RESULTADOS

8.1 Descripción del grupo de estudio

Previo consentimiento informado, se reclutaron 34 pacientes de la clínica de VIH/SIDA del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, los cuales cumplieron con los criterios de inclusión previamente establecidos en el presente protocolo y que además se sometieron al seguimiento clínico establecido. De todos los participantes, solamente 27 proporcionaron muestras fecales para este estudio, mientras que siete participantes fueron excluidos para el análisis del protocolo de acuerdo a los criterios de eliminación. Como se observa en la figura 6, se incluyeron más hombres que mujeres en una proporción cercana a 4:1, y su edad promedio fue de 39 años con una desviación estándar de ± 17 años.

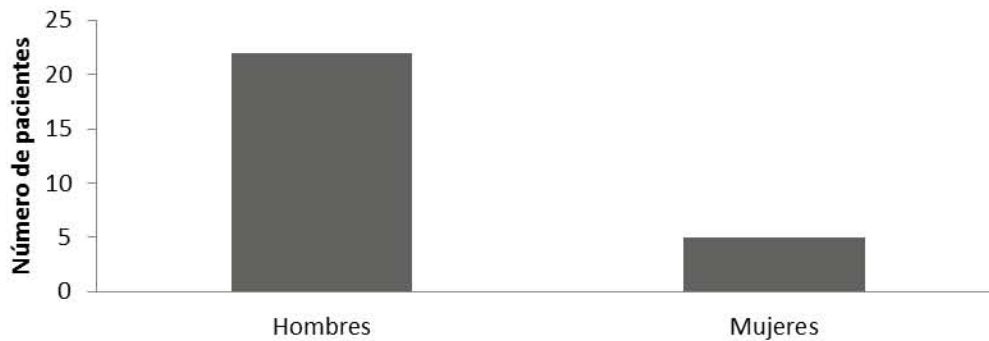


Figura 6. Género de los participantes del presente protocolo.

8.2 Diagnóstico morfológico de parásitos Intestinales

El diagnóstico morfológico de los parásitos intestinales se realizó mediante tres técnicas parasitológicas básicas: i) método directo o examen en fresco que permite visualizar a parásitos sin pared celular como *Blastocystis* spp. en su forma de cuerpo central; ii) método de concentración por flotación con la técnica de Faust para visualizar quistes, huevos y larvas de parásitos intestinales y iii) tinción de Kinyoun para una mejor identificación de coccidios intestinales, en especial a *Cryptosporidium* spp. que por microscopía en un aumento de 40X no es posible diferenciar su morfología. En el cuadro 3 se resumen los parásitos identificados y la técnica utilizada, puede observarse algunos pacientes se mantuvieron sin parásitos a lo largo de las 5 intervenciones (pacientes 1, 5, 10, 12, 13, 18, 19 y 21), mientras que el resto de los participantes se infectaron con algún microorganismo comensal (pacientes 6, 8, 15 y 16) o con algún parásito claramente patógeno (pacientes 2, 3, 4, 17, 22, 23, 26 y 27). La mayoría de los participantes que se infectaron fueron por una sola especie de parásitos, mientras que solo tres tuvieron infecciones mixtas (pacientes 17, 22 y 25). Respecto a *Blastocystis*, se identificó como parásito único en la mayoría de los casos, ya que solamente en el paciente 17 se presentó co-infectando con *Entamoeba coli*, *Gardia lamblia* y el paciente 25 con el comensal *Endolimax nana*.

Cuadro 3. Resumen de parásitos identificados a lo largo del estudio, en todos los participantes.

PACIENTE	Tiempo inicial (T1)		Primer mes (T2)		Tercer mes (T3)		Sexto mes (T4)		Noveno mes (T5)	
	MICROSCOPIA: FAUST Y KINYOUN	PCR diagnóstico <i>Blastocystis</i>	MICROSCOPIA: FAUST Y KINYOUN	PCR diagnóstico <i>Blastocystis</i>	MICROSCOPIA: FAUST Y KINYOUN	PCR diagnóstico <i>Blastocystis</i>	MICROSCOPIA: FAUST Y KINYOUN	PCR diagnóstico <i>Blastocystis</i>	MICROSCOPIA: FAUST Y KINYOUN	PCR diagnóstico <i>Blastocystis</i>
1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2	<i>Cyclospora</i> sp	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SM	SM	SM	SM	SM	SM
3	<i>Cyclospora</i> sp	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	<i>Giardia lamblia</i>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	<i>Cystoisospora</i> sp	NEGATIVO	<i>Endolimax nana</i>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
5	NEGATIVO	NEGATIVO	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM
6	NEGATIVO	NEGATIVO	<i>Entamoeba coli</i>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	<i>Entamoeba coli</i>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
7	<i>Blastocystis</i> spp.	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SM	SM
8	<i>Endolimax nana</i>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SM	SM	SM	SM	SM	SM
9	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
10	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
11	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	<i>Blastocystis</i> spp.	POSITIVO	<i>Blastocystis</i> spp.	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
12	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
13	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
14	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	<i>Blastocystis</i> spp.	POSITIVO	<i>Blastocystis</i> spp.	POSITIVO	<i>Blastocystis</i> spp.	POSITIVO
15	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	<i>Endolimax nana</i>	NEGATIVO	SM	SM	SM	SM
16	NEGATIVO	NEGATIVO	<i>Endolimax nana</i>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SM	SM	SM	SM
17	<i>Entamoeba coli</i>	NEGATIVO	<i>Entamoeba coli</i>	POSITIVO	<i>Giardia lamblia</i>	POSITIVO	<i>Entamoeba coli</i>	POSITIVO	<i>Entamoeba coli</i>	NEGATIVO
18	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SM	NEGATIVO	SM	SM	SM	SM
19	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SM	SM
20	<i>Blastocystis</i> spp.	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SM	SM	SM	SM
21	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
22	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	<i>Giardia lamblia</i> <i>Endolimax nana</i>	NEGATIVO	<i>Endolimax nana</i>	NEGATIVO	<i>Endolimax nana</i>	NEGATIVO
23	NEGATIVO	NEGATIVO	<i>Cryptosporidium</i>	NEGATIVO	<i>Cryptosporidium</i>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
24	NEGATIVO	NEGATIVO	<i>Blastocystis</i> spp.	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
25	NEGATIVO	NEGATIVO	<i>Endolimax nana</i> <i>Blastocystis</i> spp.	POSITIVO	<i>Endolimax nana</i> <i>Blastocystis</i> spp.	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	SM	SM
26	<i>Cyclospora</i> sp	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SM	SM	SM	SM
27	<i>Cryptosporidium</i>	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SM	SM	SM	SM

SM: Sin muestra, significa que el paciente no proporcionó su muestra fecal; NEGATIVO: no se encontró la presencia de ningún parásito intestinal; POSITIVO: se observa el amplicón diagnóstico de *Blastocystis* spp de ~500pb en el gel de agarosa al 1.5% revelado con Bromuro de etido.

Para el diagnóstico morfológico de los parásitos intestinales se realizaron en total 330 coproparasitoscópicos por la técnica de Faust, 330 exámenes directos y 330 tinciones de Kinyoun. Para el diagnóstico de infección por protozoos se consideraron las siguientes características: tamaño, núcleos, citoplasma y otras características particulares de cada especie (Figura 7); para el diagnóstico de las infecciones por helmintos se consideró el tamaño de los huevos, forma, cubierta, estadio en desarrollo y otras características particulares de cada especie.

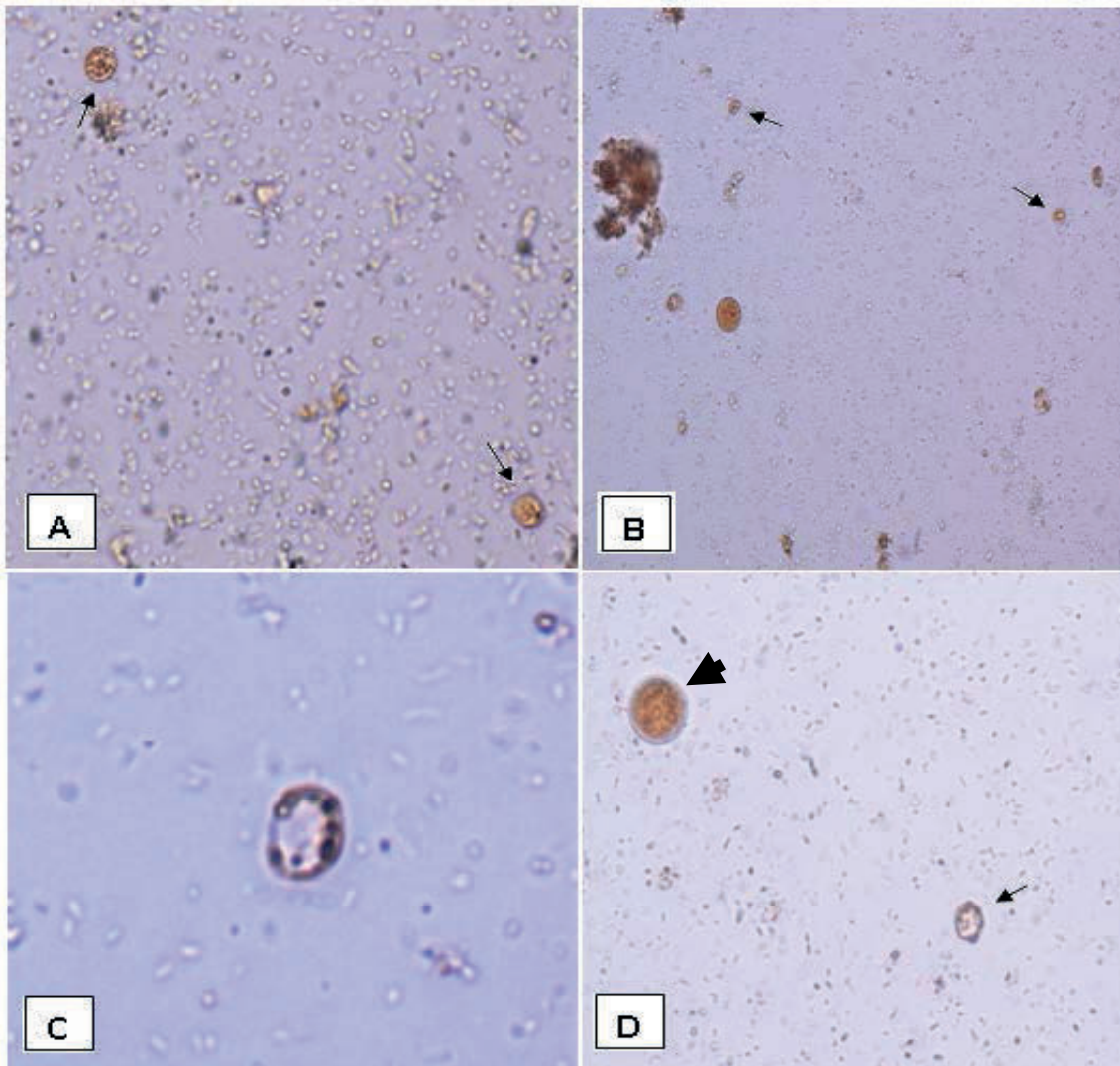


Figura 7. Fotografías de cuatro ejemplos de preparaciones en fresco con lugol durante el desarrollo de este protocolo. Las flechas señalan las estructuras parasitarias relevantes. (A) forma granular de *Blastocystis*; (B) forma quística de *Blastocystis*; (C) forma vacuolar o de cuerpo central de *Blastocystis*; (D) forma vacuolar (flecha negra) comparada con un quiste de *Entamoeba coli* (punta de flecha).

Durante los nueve meses en que se desarrollo el presente estudio se diagnosticaron 19 pacientes (70%) infectados por uno o más parásitos, y en los 8 restantes (30%) no se demostró la presencia de parásitos intestinales, tal como se muestra en la figura 8.

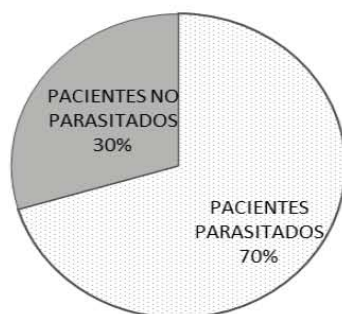


Figura 8. Frecuencia de infecciones parasitarias en los 27 participantes del estudio.

De los pacientes parasitados solo se encontró evidencia de protozoos y en ninguno de los pacientes se encontró infecciones por helmintos. Considerando a los 27 participantes, encontramos que *Blastocystis* spp. afectó al 30% de éstos pacientes y en segundo lugar con 22% lo ocupó *Endolimax nana*, en tercer lugar se identificaron las coccidias, que en su conjunto afectaron la misma proporción de pacientes 22% (Figura 9).

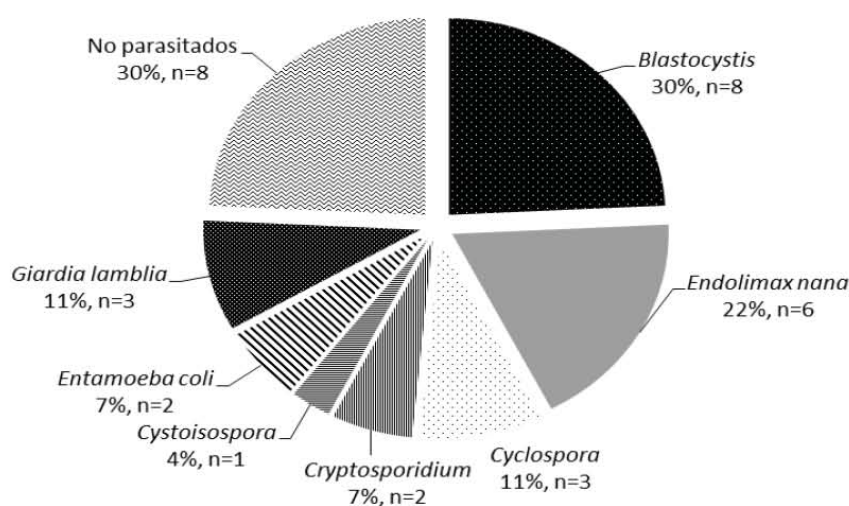


Figura 9. Frecuencia de los parásitos identificados en los 27 participantes del presente estudio.

Debe señalarse que hubo 4 pacientes (No. 3, 4, 22 y 25) que presentaron a lo largo del estudio infecciones por más de una especie de parásito, ya sea en distintos tiempos del análisis o en co-infección.

8.3 Parásitos, síntomas y cuadro clínico desarrollado

En el cuadro 4 se resumen los síntomas, cuadro clínico y la administración de tratamiento antiparasitario a lo largo del estudio, mientras que en el cuadro 5 se muestran algunos ejemplos de la búsqueda de asociaciones entre estos y la presencia de parásitos; como puede observarse solo se encontró una diferencia estadística entre ser o no portador de coccidias y síndrome diarreico (Sx diarreico).

Cuadro 4. Síntomas, cuadro clínico y tratamiento de los pacientes parasitados.

PACIENTE	PARÁSITO	SÍNTOMA S	CUADRO CLÍNICO	TX
RESULTADOS DE LOS PACIENTES PARASITADOS AL T1 (INICIO)				
2	<i>Cyclospora sp</i>	SI	SX DIARREICO	SI
3	<i>Cyclospora sp</i>	SI	SX DIARREICO	SI
26	<i>Cyclospora sp</i>	SI	SX DIARREICO	SI
27	<i>Cryptosporidium sp</i>	SI	DOLOR ABDOMINAL Y SX DIARREICO	SI
7	<i>Blastocystis spp</i>	SI	SCI	SI
9	<i>Blastocystis spp</i>	SI	SX DIARREICO	NO
20	<i>Blastocystis spp</i>	SI	DOLOR ABDOMINAL	NO
8	<i>Endolimax nana</i>	SI	SCI	NO
17	<i>Entamoeba coli</i>	NO		NO
RESULTADOS DE LOS PACIENTES PARASITADOS AL T2 (PRIMER MES)				
23	<i>Cryptosporidium sp</i>	SI	SX DIARREICO	SI
25	<i>Blastocystis spp,</i> <i>Endolimax nana</i>	SI	SCI	NO
17	<i>Blastocystis spp,</i> <i>Entamoeba coli</i>	NO		NO
9	<i>Blastocystis spp</i>	NO		NO
24	<i>Blastocystis spp</i>	NO		NO
6	<i>Entamoeba coli</i>	NO		NO
16	<i>Endolimax nana</i>	NO		NO
RESULTADOS DE LOS PACIENTES PARASITADOS AL T3 (TERCER MES)				
4	<i>Cystoisospora sp</i>	SI	SX DIARREICO	SI
23	<i>Cryptosporidium sp</i>	SI	SX DIARREICO	SI
3	<i>Giardia lamblia</i>	SI	SX DIARREICO Y DOLOR ABDOMINAL	SI

22	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Endolimax nana</i>	SI	SX DIARREICO	SI
17	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Blastocystis spp</i>	SI	SX DIARREICO	SI
9	<i>Blastocystis spp</i>	NO		NO
11	<i>Blastocystis spp</i>	NO		NO
14	<i>Blastocystis spp</i>	NO		NO
25	<i>Blastocystis spp</i> , <i>Endolimax nana</i>	NO		NO
15	<i>Endolimax nana</i>	NO		NO
RESULTADOS DE LOS PACIENTES PARASITADOS AL T4 (SEXTO MES)				
11	<i>Blastocystis spp</i>	NO		NO
14	<i>Blastocystis spp</i>	NO		NO
17	<i>Blastocystis spp</i> , <i>Entamoeba coli</i>	NO		NO
25	<i>Blastocystis spp</i>	NO		NO
4	<i>Endolimax nana</i>	NO		NO
22	<i>Endolimax nana</i>	NO		NO
6	<i>Entamoeba coli</i>	NO		NO
RESULTADOS DE LOS PACIENTES PARASITADOS AL T5 (NOVENO MES)				
11	<i>Blastocystis spp</i>	NO		NO
14	<i>Blastocystis spp</i>	NO		NO
17	<i>Blastocystis spp</i> , <i>Entamoeba coli</i>	NO		NO
22	<i>Endolimax nana</i>	NO		NO

Sx: Síndrome; SCI: Síndrome de Colon Irritable; TX: Tratamiento.

8.3.1 Análisis estadístico

Cuadro 5. Búsqueda de relaciones significativas entre la presencia de síntomas y cuadro clínico con las distintas parasitosis encontradas.

Asociación	X^{2*}	P	RM	IC
<i>Blastocystis</i> vs SCI	0.17	0.683	1.75	0-40.06
<i>Blastocystis</i> vs Sx. Diarreico	2.37	0.123	7.0	0.34-267.6
<i>Blastocystis</i> vs dolor abdominal	1.15	0.282	4.0	0.21-140.8
Coccidias vs Sx diarreico	8.17	0.004	Nd	Nd
Coccidias vs dolor abdominal	0.38	0.540	2.0	0.15-28.51

*X² de Mantel-Haenszel; RM= Razón de momios; IC= Intervalo de Confianza al 95%; Sx: Síndrome; SCI: Síndrome de Colon Irritable.

En la figura 10, puede observarse la proporción de portadores de *Blastocystis* sintomáticos y asintomáticos a lo largo del estudio; siendo la mayoría pacientes parasitados sin síntomas evidentes.

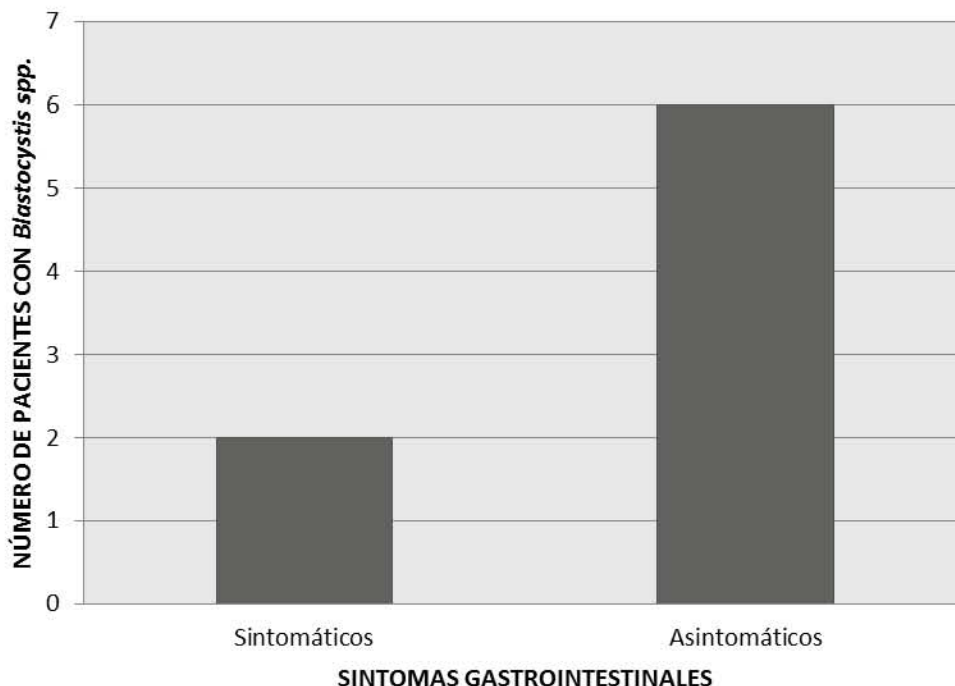


Figura 10. Relación de pacientes sintomáticos y asintomáticos infectados por *Blastocystis* spp.

8.4 Estandarización de PCR diagnóstico

Se estandarizó la técnica de PCR utilizando los iniciadores descritos por Santín *et al.* (2011), los cuales producen un amplicón de 479 a 500pb, dentro de la región del SSUrDNA que contiene una región variable lo que permite subtipificar a *Blastocystis*. Se realizaron gradientes de temperatura de alineamiento (Figura 11), modificación de tiempos de desnaturalización, alineamiento y extensión, curvas de concentración de MgCl₂, concentración de albumina sérica bovina y Enhancer (Epicenter 10X con betaina); posteriormente se estandarizaron PCR subtipo específico, utilizando los iniciadores documentados por Yoshikawa *et al.* (2003), para los subtipos 1 y 3, analizando los mismos parámetros.

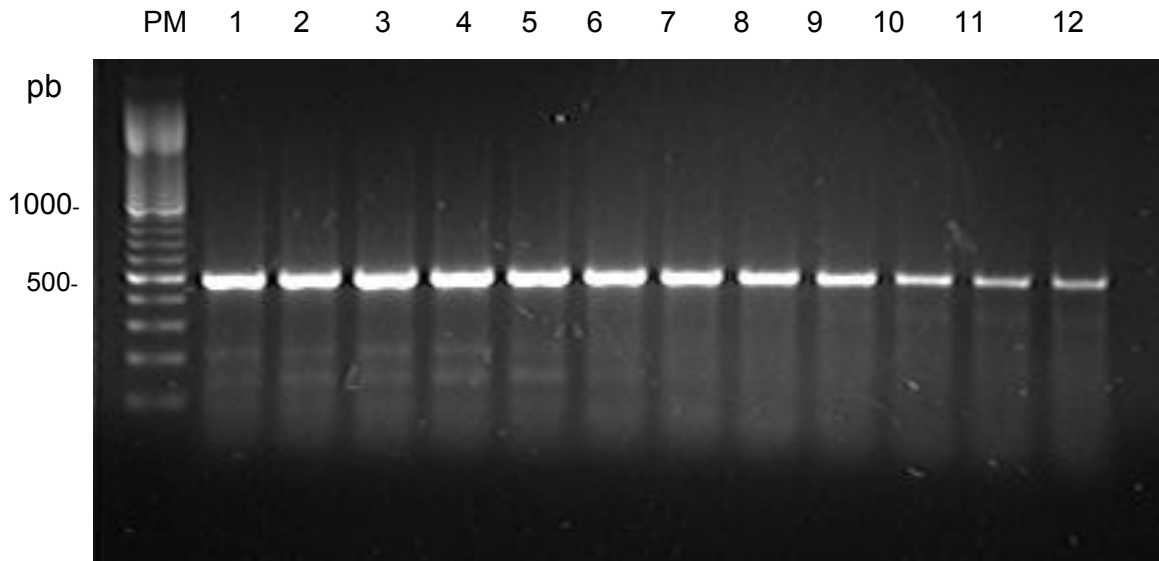


Figura 11. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV en el que se observan productos de PCR diagnóstico de ~500pb, en el que se realizó un gradiente de temperatura de alineamiento de los iniciadores (T_m por sus siglas en inglés) durante la estandarización de los PCR. La temperatura de elección fue la del carril 6 que corresponde a 54 °C, la T_m teórica para estos iniciadores fue de 56°C.

Carriles: PM corresponde a los pesos moleculares, 1: 50.5°C, 2: 51.0°C, 3: 51.6°C, 4: 52.3°C, 5: 53.0°C, 6: 54.0°C, 7: 55.1°C, 8: 56.2°C, 9: 57.3°C, 10: 58.2°C, 11: 59.0°C y 12: 59.8.

8.5 Estandarización del PCR subtipo específico de *Blastocystis* spp.

Se obtuvieron los subtipos de *Blastocystis* de las 17 muestras positivas por PCR, por lo que se identificaron productos de PCR cuyo peso molecular correspondían al valor teórico documentado utilizando oligonucleótidos subtipo específicos, de esta manera se obtuvo un producto de ~350pb para subtipo 1 (Figuras 12 y 13) y otro de ~520pb para el subtipo 3 (Figuras 14 y 15).

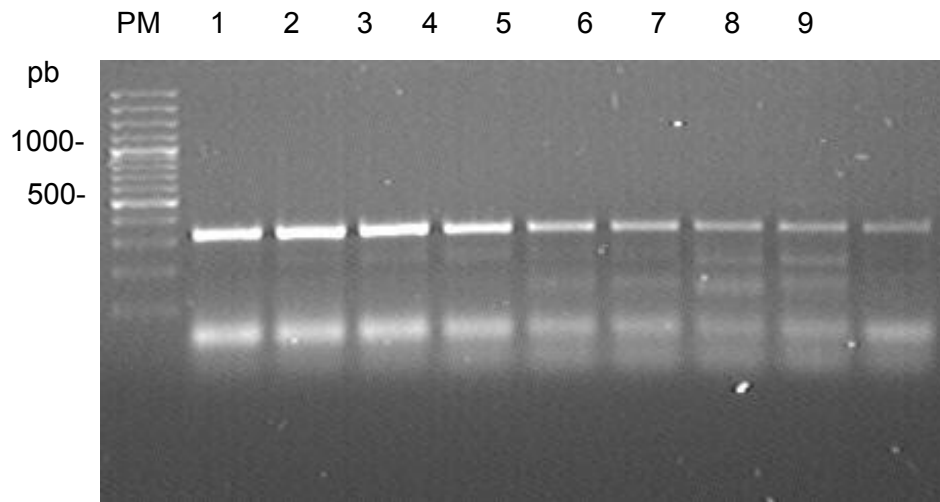


Figura 12. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV en el que se observa un producto de PCR de ~350pb para el subtipo 1. El experimento corresponde a un gradiente de temperatura de alineamiento de los iniciadores durante la estandarización del PCR. La temperatura de elección fue la del carril 2 que corresponde a 63°C, la T_m teórica para estos oligonucleótidos es de 55°C. El carril 1 corresponde a los pesos moleculares (PM).

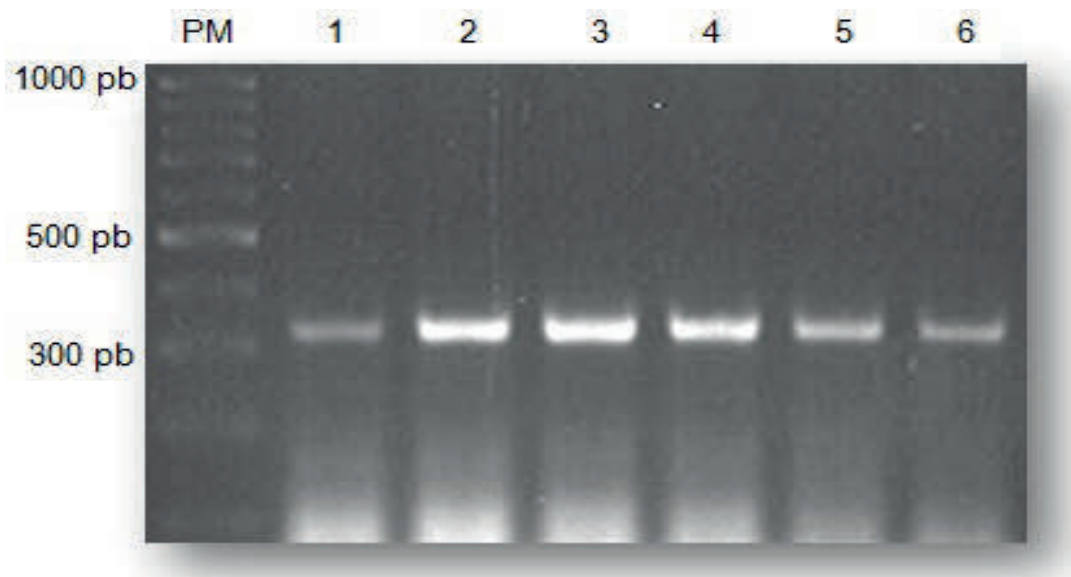


Figura 13. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV en el que se observan productos de amplificación de muestras del protocolo, donde el producto de ~350pb corresponde al subtipo 1 de *Blastocystis*. El carril 1 corresponde a los pesos moleculares (PM) Los carriles 2, 3, 4 y 5 son muestras repetidas.

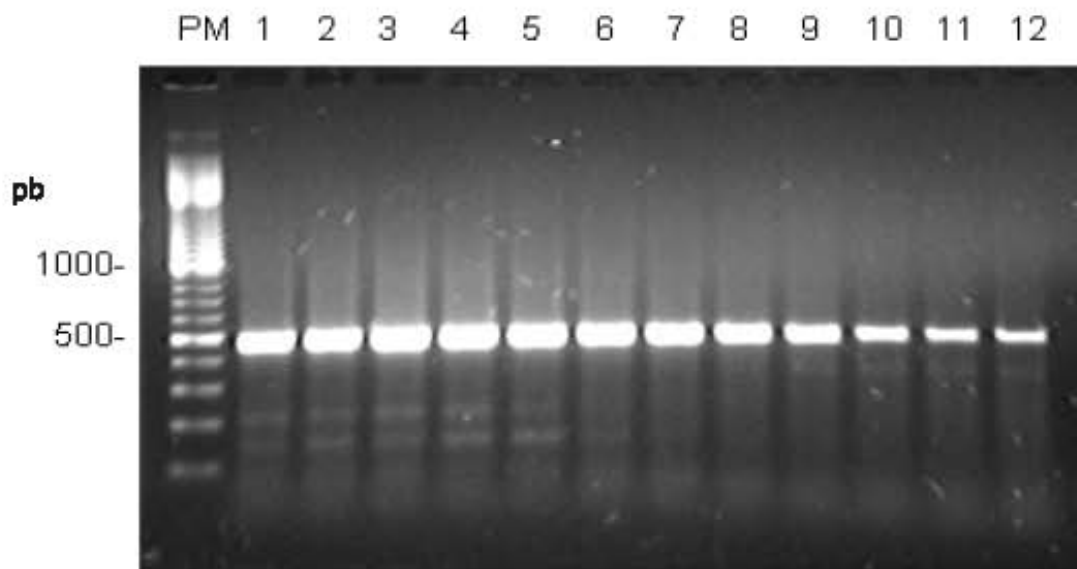


Figura 14. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV en el que se observa un producto de amplificación de ~520pb para el subtipo 3. El experimento corresponde a un gradiente de temperatura de alineamiento de los iniciadores. La temperatura de elección fue la del carril 6 que corresponde a 58°C; la T_m teórica para estos oligonucleótidos es de 60°C. El carril 1 corresponde a los pesos moleculares (PM).

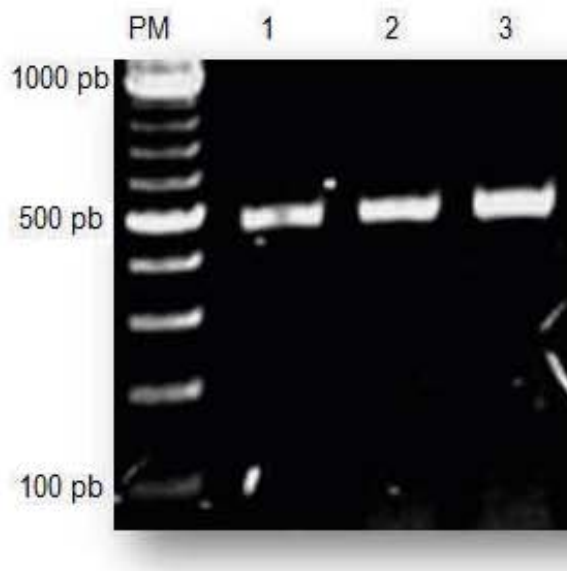


Figura 15. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV en el que se observan productos de PCR de ~520pb, pertenecientes al subtipo 3. El carril 1 corresponde a los pesos moleculares (PM).

8.6 Diagnóstico molecular de *Blastocystis* spp.

De las muestras de heces almacenadas a temperatura de -20°C , se obtuvo suficiente DNA total (>90 ng/ml) para su procesamiento por PCR. En total se procesaron 110 muestras de materia fecal de las cuales se obtuvo el DNA total y se sometieron a PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados por Santín et al. (2011), se obtuvieron 17 muestras positivas a *Blastocystis*, dos muestras con *Blastocystis* no fueron detectadas por estudios coproparasitológicos, pero sí por PCR, a las cuales se les realizó un segundo análisis por PCR utilizando las primers subtipo específico de Yoshikawa et al. (2003), para los subtipos 1 y 3 que son considerados los más frecuentes. Se extrajeron de un gel de agarosa al 1%, 5 muestras positivas por los primer diagnósticos, se purificaron y se enviaron al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM, para su secuenciación en ambas direcciones. En el análisis filogenéticos se evidencia la ubicación de los subtipos de *Blastocystis* de nuestra población con las de otras partes del mundo (Figura 16)

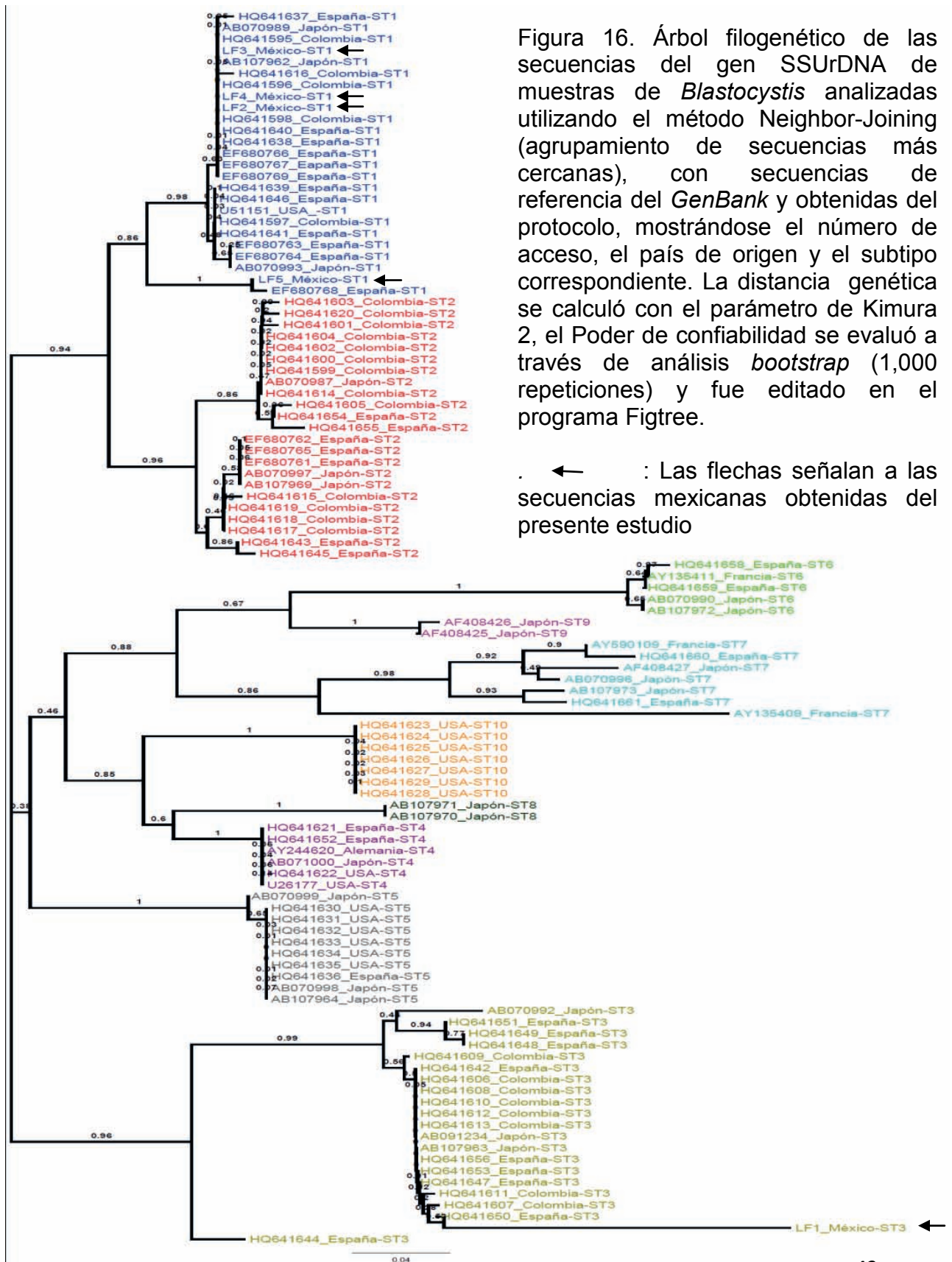
Una vez analizadas las muestras por iniciadores subtipo específico y en algunos casos por secuenciación, se corroboró que 8 pacientes presentaron *Blastocystis* en algún momento del seguimiento, siendo que cuatro pacientes mostraron el subtipo 1 y los otros 4 el subtipo 3 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Identificación de pacientes positivos a *Blastocystis* spp, subtipo genético y técnica de diagnóstico utilizada.

Paciente	Tiempos de intervención					Subtipo	Método de identificación del subtipo.
	T1	T2	T3	T4	T5		
7	CPS PCR-S Tx					SM	ST-3 <i>Primers</i> ST específico/ Secuenciación.
9	PCR	PCR	PCR				ST-3 <i>Primers</i> ST específico.
11			CPS PCR-S	CPS PCR-S	CPS PCR-S		ST-1 <i>Primers</i> ST específico.
14			CPS PCR	CPS PCR	CPS PCR		ST-3 <i>Primers</i> ST específico.
17		PCR-S	PCR-S Tx	PCR-S			ST-1 <i>Primers</i> ST específico/ Secuenciación.
20	CPS PCR			SM	SM		ST-1 <i>Primers</i> ST específico.
24		CPS PCR					ST-3 <i>Primers</i> ST específico.
25		CPS PCR-S	CPS PCR-S	CPS PCR-S		SM	ST-1 <i>Primers</i> ST específico/ Secuenciación.

CPS: Coproparasitoscópico; PCR-S: PCR y secuenciación, utilizando *primers* de Santin et al., (2011); *Primers* ST específico: PCR utilizando *primers* reportados por Yoshikawa et al., (2003) para los distintos subtipos genéticos; SM: sin muestra del paciente; Tx: Tratamiento antiparasitario.

Figura 16. Árbol filogenético por el método de Neighbor-Joining



9. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

9.1 Grupo de Estudio

Con base en los datos del Registro Nacional de Casos de VIH y de SIDA, se ha documentado que para México, al 30 de septiembre de 2011 se habían diagnosticado y registrado 151,614 casos acumulados de SIDA, de los cuales 123,706 (82%) eran hombres y 26,900 (18%) mujeres; mientras que para VIH, en la misma fecha se registraron 36,714 casos acumulados, de los cuales 26,697 (72.8%) eran hombres y 10,017 (27.2%) mujeres. La proporción hombre/mujer de casos de SIDA en el 2011 fue de 4.5 hombres por cada mujer (promedio global del país); mientras que para los casos de VIH la proporción es de 3.4 hombres por cada mujer. El Distrito Federal cuenta con la mayor razón hombre/mujer de casos registrados de SIDA, 8 hombres por cada mujer. (Datos obtenidos del Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA, Secretaría de Salud, 2012). Por ello, considerando estos registros nacionales, es fácil entender por qué en el presente estudio hubo mayor participación de hombres con un 81% (22 hombres) sobre la participación de mujeres con un 19% (5 mujeres).

9.2 Caracterización de los parásitos que infectan a pacientes con VIH-SIDA

Se ha documentado ampliamente que la frecuencia de las parasitosis intestinales varía según el lugar, el grupo de estudio, los factores de riesgo asociados y los métodos que se empleen para detectar a los parásitos (Waywa *et al.*, 2001; Mohandas *et al.*, 2002; Chinchá *et al.*, 2009; Cruz-Licea *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008; Kurniawan *et al.*, 2009, Tan *et al.*, 2009, Chinchá *et al.*, 2009; Poirier *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2012). Las parasitosis intestinales son infecciones comunes a nivel mundial, especialmente en países con problemas de contaminación del agua y pocas condiciones de salubridad (Maravilla *et al.*, 2007; Chinchá *et al.* 2009). En Brasil, un estudio mostró que el 27% de los pacientes seropositivos a VIH tuvieron parásitos intestinales, contrastando con el 17% de los pacientes seronegativos (Lewthwaite *et al.*, 2005), mientras que un estudio similar en Perú mostró que el 39.8% de pacientes seropositivos estuvieron parasitados (Chinchá *et al.*, 2009); en Etiopía, el 52% de pacientes con VIH tuvieron algún tipo

de infección parasitaria en comparación con el 42% del grupo control conformado por pacientes seronegativos (Lewthwaite *et al.*, 2005); en Indonesia, pacientes con VIH/SIDA y con diarrea persistente mostraron una frecuencia de parasitosis del 84.3% (Kurniawan *et al.*, 2009). En el presente estudio, se encontró que el 70% de los pacientes con VIH/SIDA estuvieron parasitados en algún momento del estudio, siendo esta frecuencia mayor que la documentada en Brasil, Perú y Etiopía, pero más baja que la reportada en Indonesia. Esto se debe primordialmente al diseño de estudio que nosotros realizamos, ya que se trató de un estudio de cohorte con cinco análisis transversales a lo largo de nueve meses de seguimiento al mismo paciente, lo que eleva la oportunidad de diagnosticar una parasitosis, aún y cuando no existan datos clínicos que la indiquen; esto mismo podría explicar los hallazgos en pacientes de Indonesia, donde se tuvo una frecuencia tan alta, pues su población estaba seleccionada a pacientes con diarrea persistente, síntoma que puede estar relacionado a un trastorno gastrointestinal de origen infeccioso. Si bien la frecuencia de las parasitosis depende de la zona geográfica donde se realice el estudio, cada vez son más los reportes epidemiológicos que colocan a *Blastocystis* spp. como el agente parasitario intestinal más frecuente en diferentes tipos de pacientes, tanto en nuestro país (Cruz *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2008; Jiménez *et al.*, 2012.), como en pacientes con VIH/SIDA de otras partes del mundo (Chincha *et al.*, 2009; Kurniawan *et al.*, 2009); este hecho aunado a que cada vez hay más pruebas que sugieren que los individuos inmunocomprometidos, en particular los pacientes con SIDA, son más propensos a sufrir enfermedades diarreicas relacionadas con *Blastocystis* spp. (Tan *et al.*, 2009) no es de extrañarnos que este parásito sea el de mayor frecuencia (30%) en el presente protocolo. Si comparamos los resultados con un estudio previo realizado en la misma institución, en donde también se utilizaron técnicas moleculares similares para el diagnóstico de *Blastocystis* spp. donde se obtuvo que este parásito era también el más abundante con una frecuencia global del 23.5% (Jimenez *et al.*, 2012), podemos percatarnos de que no existe una gran diferencia en cuanto a la frecuencia de *Blastocystis* spp. en pacientes con

VIH/SIDA y tratamiento anti-retroviral (Truvada/Efavirez) y pacientes seronegativos.

La disminución progresiva de las células del sistema inmunitario, específicamente los linfocitos CD4+, hace al portador de la infección por VIH susceptible a infecciones por parásitos oportunistas (Chincha *et al.* 2009), esta es una posible explicación del porque en algunas publicaciones se ha encontrado que las coccidias (*Cystoisospora belli*, *C. cayetanensis* y *Cryptosporidium* sp) son los parásitos más frecuentes que afectan a este tipo de pacientes, siendo la diarrea crónica una de sus principales síntomas (Waywa *et al.*, 2001; Mohandas *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2008). En el presente protocolo se encontró que en su conjunto las coccidias intestinales afectaron al 22% de los pacientes, teniendo en primer lugar a *Cyclospora* sp (11%) seguido de *Cryptosporidium* sp (7%) y por último a *Cystoisospora belli* (4%), lo que ubicó a este grupo de parásitos en segundo lugar global por debajo de *Blastocystis* spp. (30%) y con la misma frecuencia que el comensal *Endolimax nana* (22%). Los criterios de inclusión a este protocolo (carga viral indetectable, cuenta de CD4+ \geq 200 células/mm³ y apego mayor al 90% al tratamiento anti-retroviral), hacen la diferencia entre los participantes de este estudio de los de otras publicaciones, donde se ha mencionado que los pacientes VIH/SIDA son infectados más frecuentemente con parásitos oportunistas (coccidias) causando diarreas crónicas. Es importante resaltar que dentro del subgrupo de pacientes sintomáticos, la frecuencia de coccidias intestinales fue muy alta (45%), lo cual está acorde a estudios previos que demuestran la alta frecuencia de coccidias intestinales en pacientes inmunocomprometidos con trastornos gastrointestinales.

La ausencia de helmintos en este protocolo están en concordancia con un estudio previo realizado en la misma institución, en el cual a 100 participantes se les realizaron exámenes coproparasitológicos y solamente uno de ellos estuvo infectado por *Hymenolepis nana* (Jiménez *et al.*, 2012). En las campañas nacionales de vacunación se da tratamiento masivo antiparasitario con albendazol, por eso la tasa de geohelmintiasis principalmente ha disminuido (Flisser, *et al.*, 2008). Otras posibles explicaciones son la zona de influencia y la edad de los

individuos estudiados, ya que era un zona urbana y se trataba de una población de adultos donde se presentan muchos menos casos de helmintiasis que en las zonas rurales y en niños (Kurniawan, *et al.*, 2009).

En general, en el presente estudio los participantes estuvieron parasitados por una sola especie de parásito, mientras que sólo en tres casos (11.1%), se presentaron coinfecciones (pacientes 17, 22 y 25). Las asociaciones se dieron de la siguiente manera: *Blastocystis* spp./*Entamoeba coli*, *Blastocystis* spp./*Gardia lamblia* (paciente 17), *Gardia lamblia*/*Endolimax nana* (paciente 22) y *Blastocystis* spp./*Endolimax nana* (paciente 25). En un estudio realizado a pacientes VIH/SIDA con diarrea persistente en Jakarta, Indonesia, se menciona que el poliparasitismo (co-infección) se presentó con mayor frecuencia entre los pacientes con VIH/SIDA y en sus resultados este fenómeno ocurrió con mayor frecuencia (sin asociación estadísticamente significativa) en pacientes con recuentos de Linfocitos TCD4+ \leq 200 células/mm³ (Kurniawan *et al.*, 2009). Cabe resaltar que en esa misma publicación, en 40 de las 41 co-infecciones que se presentaron, siempre estuvo presente *Blastocystis* spp. con alguno de los siguientes parásitos: *Cryptosporidium* sp, *Gardia duodenalis* (sinonimia *Gardia lamblia*), *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli* (sinonimia *Cystoisospora belli*) y *Entamoeba coli*; estos resultados parecen indicar que *Blastocystis* spp. puede coexistir con otros parásitos y esto sucede en hospederos inmunosuprimidos e inmunocompetentes. Un fenómeno similar se observó en un estudio realizado en niños de la zona centro del estado de Guerrero, México, donde de las 262 infecciones provocadas por *Blastocystis* spp., 27 (10.3%) fueron co-infecciones con alguno de los siguientes parásitos: *G. lamblia*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *A. lumbricoides* e *H.nana*.

9.3 Dinámica de la parasitosis y su asociación con los síntomas gastrointestinales

A lo largo del estudio, los pacientes que fueron positivos a parásitos patógenos se les trató de manera convencional con trimetoprima-sulfametoxazol para coccidia intestinales y con nitazoxanida para los protozoos, 15 días después se analizaron muestras seriadas para corroborar la eficacia del tratamiento; los pacientes asintomáticos con *Blastocystis* spp. no recibieron terapia anti-parasitaria.

Todos los pacientes infectados con coccidias o con *Giardia lamblia* presentaron alteraciones intestinales como diarrea, dolor abdominal e hinchazón. Se logró obtener una asociación estadística entre la parasitosis por coccidias y sx diarreico ($P=0.004$). Las coccidias son un grupo de parásitos que pueden tener alta morbi-mortalidad en pacientes seropositivos si es que los afectados no reciben un tratamiento apropiado, el uso de sulfas ayuda a disminuir la incidencia de infecciones por *Pneumocystis jiroveci*, *Toxoplasma gondii*, *C. belli*, *C. cayetanensis* y *Microsporidium* sp, por lo que su utilización disminuye el riesgo de infecciones por coccidias y otros patógenos (Chincha *et. al.* 2009).

Sólo dos pacientes (7 y 25) de los ocho infectados con *Blastocystis* spp. mostraron síndrome del intestino irritable de acuerdo con los criterios de Roma III (Longstreth *et. al.* 2006), el malestar se eliminó cuando la terapia anti-parasitaria erradicó al parásito como lo han descrito otros autores (Doyle *et al.*, 1990; Zierdtet *al et.*, 1991; Stenzel y Boreham 1996; Cimerman *et al.*, 1999; Rendon *et al.*, 2003; Rossignol *et al.*, 2005; Moghaddam *et al.*, 2005; Boorom *et al.*, 2007; Kaya *et al.*, 2007). Dos pacientes más (9 y 20) presentaron síndrome diarreico y dolor abdominal respectivamente, ningún de ellos recibió tratamiento, esto debido a que el primero de los pacientes se diagnosticó por medio de una PCR meses después de la consulta médica; en este paciente la infección por *Blastocystis* spp. continuó por seis meses más, pero los síntomas se auto-limitaron en menos de un mes de presentados los síntomas, este comportamiento ya ha sido descrito por otros autores (Tan, 2004). En el caso del segundo paciente sintomático no recibió tratamiento debido a que presentó dolor abdominal, el cual no fue relacionado con la presencia del parásito y al paso de un mes no sólo los síntomas se auto-limitaron, sino que también la infección fue eliminada.

En el paciente 17 se identificó un fenómeno interesante, este paciente presentó *Entamoeba coli* desde el inicio del estudio; posteriormente, para el segundo punto de cohorte (un mes después) se comprobó por técnicas de biología molecular una co-infección de *E. coli* con *Blastocystis* spp., para el tercer punto de corte, *E. coli* fue desplazada por *Giardia lamblia*, cabe hacer la aclaración de que el paciente en este periodo de tres meses no recibió tratamiento anti-parasitario que pudiera

justificar la consecuencia de un nicho vacante que posteriormente ocupará *Giardia lamblia*; cuando se presentó la co-infección entre *G. lamblia* y *Blastocystis* spp., el hospedero fue sintomático por lo que se proporcionó tratamiento anti-parasitario y los síntomas desaparecieron; 15 días más tarde se le realizaron nuevamente los estudios en los que el paciente resultó negativo a todos los parásitos. Para el cuarto punto de corte (al sexto mes de iniciado el protocolo), el nicho vacante ya había sido ocupado nuevamente por *Entamoeba coli* y *Blastocystis* spp., probablemente debido a deficientes hábitos higiénicos del huésped, aún bajo esta condición el paciente permaneció asintomático hasta el último punto del corte, por lo que no se le proporcionó nuevamente tratamiento antiparasitario. Está bien documentado que *Giardia lamblia* es capaz de causar daño a su hospedero por diferentes mecanismos como el traumático, enzimático y tóxico, formando una barrera mecánica, ruptura de uniones celulares, apoptosis y competencia con el huésped de: sales biliares, nucleótidos, aminoácidos y micronutrientes como hierro y zinc (Becerril *et. al.* 2011). Estos mecanismo patogénicos y de competencia por los nutrientes pueden ser la explicación del desplazamiento de *Entamoeba coli*; sin embargo, este mismo punto abre una nueva interrogante sobre la eliminación de *Entamoeba coli* por *Giardia lamblia* pero no el de *Blastocystis* spp., por ello es necesario profundizar en estos aspectos de la relación hospedero-parásito.

A lo largo de todo el estudio se presentaron cinco reinfecciones después de haber recibido el tratamiento, ya sea por el mismo parásito (participantes 17, 22 y 23) o por otro diferente (participante 3 y 4). Está claramente documentado que los pacientes inmunocomprometidos presentan predisposición a enfermedades oportunistas, por lo que es necesario incrementar la concientización sobre factores de riesgo y malos hábitos higiénicos para tratar de disminuir las reinfecciones en pacientes con VIH/SIDA.

Para el caso de los microorganismos comensales como *Entamoeba coli* y *Endolimax nana* se observó una marcada autolimitación de la colonización en el intestino y de la reinfección frecuente que se dio a lo largo del muestreo en pacientes con y sin tratamiento.

9.4 Estandarización del PCR y secuenciación

El diagnóstico de *Blastocystis* spp., basándose exclusivamente en la microscopía de luz de muestras fecales es difícil debido al polimorfismo que presenta este microorganismo, además de tener baja sensibilidad (Tan, 2008; Stensvold *et al.*, 2009); por otra parte, otras técnicas diagnósticas como el cultivo de heces han mostrado una mayor sensibilidad para la identificación de *Blastocystis*, sin embargo para su realización se lleva mucho tiempo y no están disponible en la mayoría de los laboratorios, además de que se limita al diagnóstico por lo que es imposible determinar el subtipo genético infectante (Tan, 2008). En contraste, el PCR se ha utilizado como una herramienta rápida y altamente sensible para la identificación de muchos parásitos, esencial para la detección de la variación genética entre los organismos que son morfológicamente indistinguibles, como es el caso de este chromista (Santin *et al.*, 2011), aunque también presenta algunos inconvenientes tales como su costo elevado y la poca accesibilidad del equipo en los laboratorios clínicos. Para la estandarización de un PCR en heces, deben tomarse en cuenta distintos pasos de la técnica que son trascendentales para el éxito del proceso; en primera instancia la calidad del DNA, su concentración y la eliminación de contaminantes inhibidores de la DNA polimerasa, son fundamentales para este ensayo.

Para el trabajo experimental de este estudio, la extracción del DNA total fecal se llevó a cabo utilizando un kit comercial (Puregene DNA Purification System, Gentra); para ello, la etapa que se desarrolló fue la de lisis, en la cual, a través de una solución con detergentes y caotropos se destruyen las membranas celulares que confinan el citoplasma y liberan al medio su contenido, además de inhibir a las nucleasas celulares; posteriormente se realizó una purificación en la que se retiran la mayoría de elementos que pueden interferir en el PCR, ya que en la materia fecal se encuentran inhibidores como las sales biliares, polisacáridos complejos, ácidos orgánicos como el ácido fítico (este último presente en los vegetales, sobre todo en semillas), entre otros (Herraez y Luque 2012). De acuerdo con lo anterior,

el éxito en el proceso de purificación de ácidos nucleicos son el uso oportuno de enzimas que degradan específicamente un solo tipo de molécula, tales como proteasas, DNAsas, RNAsas, o bien de inhibidores para evitar su acción, el uso de detergentes para la desnaturalización de las proteínas, lo que facilita su posterior insolubilización y retirada, sin afectar a la estructura de los ácidos nucleicos, el ajuste de fuerza iónica (concentración de sales) lo que permite controlar la solubilidad diferencial de DNA y proteínas, en particular si estas se han desnaturalizado previamente (Herraez y Luque 2012).

Además, para la purificación del DNA se utilizó un método ampliamente utilizado de extracción fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, con algunas modificaciones; este método se basa en la extracción y purificación mediante fases inmiscibles, donde en la fase acuosa se concentra el DNA y a la que se le añadió una mezcla de fenol/cloroformo, en la cual se disolvieron los lípidos y se desnaturalizaron las proteínas, posteriormente se agregó una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico, para eliminar restos de fenol y favorecer la separación nítida de las fases; al final del proceso se tiene la fase orgánica en el fondo del tubo donde quedan los lípidos de membrana, en la interfase quedan las proteínas desnaturalizadas y en la fase acuosa (fase superior) se encuentra el DNA. Para la obtención del DNA se utilizó una solución de isopropanol absoluto, ya que tanto DNA como el RNA son insolubles en este y precipitan fácilmente mediante centrifugación. La precipitación alcohólica es la etapa final en la que se cumple la purificación y además, se concentra el DNA. Durante el transcurso del experimento se hicieron algunas modificaciones al protocolo de extracción establecido por el proveedor, con la finalidad de obtener una mayor concentración de DNA. En primera instancia el tiempo de lisado era indicado por solo 40 minutos a 65°C, lo aumentamos a 12 horas con la finalidad incrementar la lisis de la mayor cantidad microorganismos y desnaturalización de proteínas presentes en las heces que pudieran afectar la posterior amplificación por PCR (Abu Al-Soud y Rådström, 2000). De la misma forma se observó que al llevar a cabo solo un lavado para precipitar proteínas en baño de hielo, el DNA aislado de una gran parte de las extracciones se encontraba con cantidades elevadas de proteína (lo reflejaba la relación de A_{260}/A_{280}), razón

por la cual se duplicaron los lavados con solución para precipitar proteínas (a 4° C y 40 minutos cada lavado) y así obtener sobrenadantes más limpios para su posterior precipitación de DNA. Esto debido a que el acetato de amonio (componente principal de la solución de precipitación de proteínas) alcanza su máximo grado de solubilidad en agua a 4°C (1.480g/L), de esta forma aumenta su afinidad de unión a proteínas y precipita una mayor cantidad de ellas.

Para cuantificar el ADN utilizamos una técnica basada en las propiedades de las bases púricas y pirimídicas, debido a su carácter aromático. En los espectros de absorción se observa una fuerte absorción de la luz en el ultravioleta (UV), con un máximo de 260nm para todas ellas. Para ello, se debe medir el valor de absorbancia a 260nm en una disolución diluida de DNA para poder calcular su concentración, sin embargo es conveniente la realización de algunos controles teniendo en cuenta sobre todo la posible contaminación con proteínas, cuya presencia contribuye a la absorción y por tanto, interfiere en esta determinación. Aunque los máximos de absorción son característicos de cada uno de estos compuestos (260 nm para ácidos nucleicos y 280 nm para proteínas), ambos absorben en cierta medida a las dos longitudes de onda. Por ejemplo, la absorbancia de proteínas a 260nm es, para igual concentración, unas 20 o 30 veces inferior a la de los ácidos nucleicos. En la práctica teniendo en cuenta esa situación, se debe emplear ambos valores de absorbancia (A₂₆₀ y A₂₈₀) para poder corregir la interferencia mutua y así determinar de forma correcta las concentraciones de ácidos nucleicos y proteínas (Herraez y Luque 2012).

En un estudio enfocado a comparar la sensibilidad de un PCR para el diagnóstico molecular de *Blastocystis* spp., se evaluaron cinco kits comerciales disponibles en el mercado para la extracción de DNA fecal: (MAGNA Pure LC DNA Isolation Kit I, Roche; QuickGene SP Kit DNA, FujiFilm; NucleoSpin Plant II, Macherey-Nagel; QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen; ZR Fecal DNA Kit, Zymo Research), dos kits (FujiFilm y Macherey-Nagel) no permitieron la amplificación por PCR, mientras que la positividad de los tres kits restantes (Roche, Qiagen, and Zymo Research) fue del 10, 48 y 94%, respectivamente. La conclusión del estudio indicó que hay diferencias relevantes entre los kits comerciales para la obtención de DNA de

calidad que se emplea en el diagnóstico molecular de *Blastocystis* (Yoshikawa *et al.*, 2011).

En otro estudio realizado en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” se compararon también 3 kits comerciales de extracción de DNA (Puregene DNA Purification System, Gentra; MagaZorb® DNA Mini-Prep Kit, Promega y QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen;), utilizando aspirados de material colónico, también se observaron diferencias en el rendimiento, calidad y en la intensidad de los amplicones en los geles después del PCR, y se encontró que la mejor calidad del DNA extraído fue con el empleo del kit de Gentra (Martinez, 2009).

Los iniciadores que se utilizaron en este estudio fueron los descritos por Santin *et al* (2011), los cuales amplifican un fragmento de ~500 pb del gen SSUrDNA que contiene regiones altamente variables. Estos oligonucleóticos se han utilizado para detectar y subtipificar a *Blastocystis* spp. en muestras procedentes de heces de humanos y animales. Asimismo, durante los ensayos de PCR utilizando los iniciadores de Santin *et al.*, se debe resaltar que durante su estandarización se tuvieron que probar diferentes variables, tales como las concentraciones de Mg^{2+} , Taq polimerasa, dNTP's, distintos termocicladores, tubos, etc, las cuales fueron diferentes a las descritas por Santin *et al* (2011). Durante la estandarización de los PCR, también fue particularmente notable el empleo de albumina sérica bobina (BSA por sus siglas en inglés *Bovine Serum Albumin*), ya que esta proteína actúa secuestrando inhibidores presentes en las heces, incrementando la sensibilidad del PCR (Abu Al-Soud y Rådström, 2000). De igual forma se realizaron curvas de Mg^{2+} para establecer la concentración final óptima, pues al ser un cofactor de la polimerasa, su concentración puede afectar de manera directa la reacción de amplificación, ya que si su concentración es baja puede ser inactiva la enzima, o aumentar el nivel de amplificación no específica en los casos de una concentración mayor. En los PCR, la temperatura de alineamiento es quizás el factor más importante a determinar, mediante ensayos de gradientes de temperatura se logró establecer una temperatura óptima de 54°C, con la cual se observó DNA con menos cantidad de subproductos y una mayor concentración del

producto de interés, lo cual es un aspecto relevante si se desea purificar el producto para su posterior secuenciación.

Para evaluar la sensibilidad del PCR, se llevaron a cabo diluciones seriadas de DNA de *Blastocystis* spp., y se logró obtener amplificadores con 0.0001ng de DNA, de manera similar a lo reportado por Santin *et al.* (2011); por otra parte, la especificidad del ensayo fue probada al poner DNA de diferentes parásitos (*Tetratrichomonas*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma* y amibas), los cuales no fueron amplificados. Estos resultados contrastan con los PCR descritos por Stensvold *et al.*, en 2006 y en 2009, los cuales fueron capaces de detectar 0,01 ng y 0,001 ng de DNA de *Blastocystis*, respectivamente. EL PCR descrito por Parkar *et al.*, (2007), tiene la misma sensibilidad que el PCR que utilizamos en el presente trabajo, pero nuestro PCR es de un solo paso, mientras que la PCR utilizado por Parkar *et al.*, es un PCR anidado, que conlleva un gasto más elevado de reactivos y utilización de equipos.

Para este trabajo, no se secuenciaron la totalidad de las muestras positivas a *Blastocystis* spp., debido principalmente a que la integridad del DNA, para nosotros fue el punto más crítico, pues en las heces hay cantidades elevadas de DNAsas que afectan su integridad y *Blastocystis* spp., es un microorganismo que no posee pared celular lo que lo hace más susceptible a choques osmóticos y por consiguiente a la ruptura de su membrana celular, por lo que podemos sugerir que para ensayos futuros se fijen las muestras de materia fecal antes de almacenarlas para su posterior extracción del DNA; acorde a esto, en ensayos recientes hemos tenido un buen resultado al adicionarles etanol al 70%, con lo que se logra mantener la integridad del DNA; por ello, en las muestras procesadas en el presente estudio no en todas se pudo obtener la concentración y calidad requeridas para su secuenciación. Asimismo, en otros casos fue imposible secuenciar los amplicones diagnósticos, ya que la cantidad de DNA extraída del gel de agarosa fue menor al requerido para fines de secuenciación (>20ng/μl).

El PCR para la identificación de *Blastocystis* spp., por su sensibilidad y especificidad, es una excelente herramienta diagnóstica que desafortunadamente pocos laboratorios pueden llevarla a cabo, sin embargo, es necesario realizar

variantes de estas técnicas moleculares que puedan ser accesibles y económicas para ser aplicadas en cualquier laboratorio, como puede ser el LAMP (del inglés *Loop-mediated isothermal amplification*), la cual no requiere un termociclador y se ha usado con éxito en el diagnóstico de distintos parásitos, con alta sensibilidad y especificidad (Lin *et al.*, 2012; Rivera y Ong, 2013).

9.5 Análisis filogenético y subtipos de *Blastocystis*

La inferencia filogenética reveló la presencia de diez clados diferentes bien soportados (alto porcentaje de similitud) que correspondieron a los diez subtipos ST1 al ST10 de *Blastocystis*, de acuerdo a lo publicado por Santin *et al.* (2011). Nuestras secuencias se agruparon únicamente en los clados ST1 y ST3. Por ello, identificar los subtipos genéticos mediante análisis filogenéticos nos permite no solo determinar la frecuencia o presencia de una infección de alguno de los subtipos genéticos ya publicados, sino también demostrar la existencia de nuevos subtipos y variantes genéticas entre el mismo subtipo.

Yoshikawa *et al.* (2003), publicaron siete pares de iniciadores para cada uno de los subtipos genéticos de *Blastocystis* conocidos hasta esa fecha.; estos ensayos fueron de gran utilidad para realizar estudios epidemiológicos debido a su alta sensibilidad, especificidad y facilidad para diagnosticar subtipos de este microorganismo, así como identificar posibles co-infecciones entre subtipos, sin la necesidad de secuenciar y clonar los productos de PCR (Li *et al.*, 2007a; 2007b); sin embargo, esta metodología presenta algunas limitaciones como el de estandarizar PCR con siete pares de iniciadores, se requiere una mayor cantidad de reactivos y DNA molde y no es posible determinar todos los subtipos de *Blastocystis* reportados hasta el 2013 (Stensvold, 2013). Tan *et al.* (2009) utilizaron los oligonucleótidos descritos por Yoshikawa *et al.* (2003) y pudieron determinar el subtipo de 38 muestra de un total de 40, reportando dos muestras positivas a cultivo como una probabilidad de pertenecer a otros subtipos diferentes. Revisando las ventajas que nos presentan estos iniciadores, se decidió utilizarlos como método de identificación de los subtipos en las muestras del presente estudio, por lo menos para los subtipos más frecuentes (1 y 3), así como

para determinar posibles co-infecciones entre estos subtipos, aunque no se descartaron posibles co-infecciones entre subtipos diferentes.

Los estudios de epidemiología molecular han demostrado un extenso polimorfismo genético en *Blastocystis* spp. (Yoshikawa *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 2009; Santín *et al.*, 2011; Stensvold *et al.*, 2012). Estudios de epidemiología molecular en varios países tales como Japón, Filipinas, China, Pakistán, Tailandia, Alemania, Bangladesh, Reino Unido, Turquía, Francia, España, Dinamarca, Grecia, Singapur, Colombia y México mostraron que los subtipos de *Blastocystis* más frecuente en el mundo son el 3, 1, 2 y 4 (en ese orden respectivamente) (Tan *et al.*, 2009; Santín *et al.*, 2011; Jimenez *et al.*, 2012). En nuestro país, el único estudio de subtipos de *Blastocystis* que se ha publicado hasta la fecha, fue elaborado en la misma institución donde se realizó el presente trabajo, con una población urbana de adultos residentes del Distrito Federal (Jimenez *et al.*, 2012). En este estudio encontraron a portadores sintomáticos y asintomáticos infectados por los subtipos 3, 1 y 2 (en ese orden de frecuencia, respectivamente), además de co-infecciones entre los subtipos ST1/ST3 y ST2/ST3; no se encontraron evidencia de infección con los subtipos ST4 al ST9 u otros subtipos.

A lo largo del presente estudio, se encontró que la mitad de los portadores de *Blastocystis* estaban infectados con el subtipo 1 y la otra mitad con el 3, no se encontró evidencia de co-infecciones de subtipos, aunque estas no pueden ser descartadas ya que la metodología empleada en este estudio no es la recomendada para demostrar asociaciones entre subtipos; tampoco se encontró la presencia de otros subtipos genéticos (ST2, ST4-ST10), pero por el diseño del estudio y por el tamaño de muestra, no fue posible establecer una asociación estadística entre estar infectado con el VIH/SIDA y ser portador en particular de algún subtipo de *Blastocystis*; sin embargo, el hecho de que los subtipos de este microorganismo en los pacientes seropositivos coincidan con los más frecuentes en muchas partes del mundo, nos hace plantear la hipótesis de que el comportamiento de las infecciones por los subtipos de *Blastocystis* podría deberse a la frecuencia intrínseca o carga parasitaria de los subtipos en cada región geográfica. Dicho de otro modo, si en una población el subtipo predominante es el

4, entonces este mismo subtipo será el más frecuente en un muestreo realizado en pacientes VIH/SIDA de esa misma región.

En los nueve meses que duro el presente estudio, se identificaron 8 pacientes infectados con *Blastocystis* spp. y en cuatro de ellos la infección duró al menos 5 meses (pacientes 9, 11, 14 y 25), en estos pacientes no se demostró el desplazamiento de ninguno de los subtipos por otro, pero sí se demostró que los pacientes podían auto-limitar la infección provocada por *Blastocystis* tanto del subtipo 1 (paciente 20) como del subtipo 3 (pacientes 9 y 24) sin administrar ningún tratamiento anti-parasitario.

Se determinó la capacidad del subtipo 1 para re-infectar a un paciente en menos de dos meses y medio después de suministrar el tratamiento anti-parasitario (paciente 17), probablemente debido a deficientes hábitos higiénicos del hospedero, sumándose a un probable efecto de inmunidad no protectora en las infecciones de este parásito.

Actualmente se ha puesto mucha atención en aclarar si subtipos particulares de *Blastocystis* spp. pueden ser potencialmente patógenos. Se ha postulado al subtipo 3 como el predominante en los pacientes con enfermedad gastrointestinal crónica en estudios llevados a cabo en Malasia (Tan *et al.*, 2008) y las formas ameboides de este mismo subtipo se han asociado con urticaria aguda (Katsarou-Katsari *et al.*, 2008). Los subtipos 1 y 4 también se han sugerido como responsables de enfermedades gastrointestinales y se ha mencionado que el subtipo 2 Aumenta en pacientes asintomáticos (Tan *et al.*, 2008).

10. CONCLUSIÓN

En el presente estudio se demostró que *Blastocystis spp.*, es el principal microorganismo que infecta a pacientes con VIH/SIDA con cuentas de linfocitos CD4+ \geq 200 células/mm³, seguido de las coccidias intestinales y del protozoario comensal *Endolimax nana*. Asimismo, los subtipos de *Blastocystis* más frecuentes fueron el 1 y el 3 en la misma proporción. La única asociación estadística que se encontró fue la presencia de coccidias y trastornos gastrointestinales; no se encontró asociación entre los subtipos de *Blastocystis* y las manifestaciones clínicas, favoreciendo el debate respecto al papel patógeno de este microorganismo.

Finalmente, se determinó la capacidad re-infectante del subtipo 1 de *Blastocystis* en menos de dos meses y medio después de administrar el tratamiento anti-parasitario, promoviendo el desarrollo de investigaciones enfocadas a la patogenicidad de este microorganismo y a la relación hospedero-parásito.

ANEXOS

Anexo 1.

Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Subtipos genéticos de *Blastocystis hominis* en pacientes con VIH/SIDA: estudio sobre su dinámica de infección.

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. Este estudio lo está realizando el grupo de investigadores con el objeto de caracterizar los tipos del *Blastocystis* en personas con diagnóstico de VIH/SIDA y también estudiar cuál de los diferentes tipos pueden ser los que inicialmente afectan a este grupo de personas. Los investigadores me han explicado que el *Blastocystis* (microbio clasificado como parásito) puede afectar a personas que tienen defensas deficientes (es decir su sistema inmune no es suficientemente bueno para evitar enfermedades infecciosas principalmente) También me explicaron que este tipo de parásito puede ocasionar alternaciones en la piel o producir daño intestinal como es diarrea, vómito, dolor de cabeza que en conjunto puede ocasionar una enfermedad conocida como Síndrome de Intestino Irritable (SCI). Los investigadores me han señalado que este estudio puede ser útil para conocer más de este parásito y su posible relación con los aspectos de la enfermedad que produce, en piel o en el sistema digestivo.

II. Debido a que presento el diagnóstico conocido como VIH/SIDA y por lo tanto puedo tener también el riesgo de que se altere mi sistema de defensas y esto pudiera facilitar que se presente dicho parásito en mi aparato digestivo. Por lo tanto me han explicado que si decido aceptar en esta investigación mi participación consistirá inicialmente en la entrega de tres muestras de heces (excremento) al inicio del estudio. También me ha explicado que el complemento de mi participación será entregar muestras de heces (tres muestras) al mes, a los tres meses, a los 6 meses, a los 9 meses y a los 12 meses posterior al inicio del protocolo y que durante estas visitas se me realizará mi seguimiento

clínico para la búsqueda entre otras cosas, de posibles alteraciones gastrointestinales y en la piel (problemas de tipo dermatológicos).

Me han explicado que todas las muestras servirán para hacer estudios específicos para la búsqueda del parásito (*Blastocystis*) y otros microbios que pudieran estar presentes (*Giardia*, *Entamoeba*, *Cryptosporidium*, *Cyclopora* e *Cystoisospora*)

III. En esta investigación el medicamento antiparasitario que me administraran es seguro, sin embargo estaré bajo vigilancia médica durante la toma del mismo y en caso de que se presente algún efecto como mareo, vómito, dolor de cabeza o algún tipo de alergia, estos serán atendidos y resueltos por el grupo de médicos responsables de la investigación. Por otra parte, me han explicado que la toma y manejo de las muestras son seguras y no representan algún riesgo para mi salud.

IV. Me indican especialmente que por el momento no se conoce claramente como este tipo de parásitos afecta directamente a las personas con el diagnóstico de VIH/SIDA y sobre todo si se pueden presentar diferentes tipos del parásito en una sola persona y en diferentes momentos.

V. Los investigadores me han indicado que en este estudio por el momento no es necesario tener un procedimiento o tratamiento que pueda ser alternativo, sin embargo y en caso de presentarse alguna opción durante el tiempo de este estudio, los investigadores me lo indicaran para estar en libertad de tomar una opción.

VI. Durante esta explicación he realizado todas las preguntas que considero necesarias acerca del estudio y mi participación y todas me han sido resueltas. Además me han indicado que si se presentó alguna pregunta relacionada con mi participación en este estudio puedo ponerme en contacto con el Dr. Pablo Maravilla, responsable del estudio ante el Hospital Gea González al teléfono: 55 28 42 28 en horario de 9:00 a 17:00.

VII. Mi participación es voluntaria y no estoy obligado(a) a participar. Además, puedo abandonarlo sin dar explicaciones. Si decido no participar no hay ninguna penalización y no perderé los beneficios que me correspondan.

VIII. 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

IX. En caso de se presenten eventos negativos o suficiente evidencia de efectos positivos que no justifiquen continuar con el estudio, se me informará oportunamente aunque esto represente el retiro prematuro de la investigación.

XI. Todos los estudios coproparasitoscópicos y el tratamiento antiparasitario, serán proporcionados sin costo alguno para mí por parte del grupo de investigadores.

He leído este formulario de consentimiento y se me ha permitido hacer preguntas sobre el mismo y todas mis preguntas han sido respondidas a mi entera satisfacción. Doy mi consentimiento voluntario para participar en el estudio de investigación y para la divulgación de la información conforme a lo descrito en este formulario.

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, acepto participar en este estudio

Nombre y firma del paciente o responsable legal

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. Octavio Sierra Martínez. Presidente de las Comisiones de Ética y de Investigación al (01 55) 4000 3050.

ANEXO 2. Artículos derivados de la presente tesis

Parasitic infections in a Mexican HIV/AIDS cohort

Fabiola Sanchez-Aguillon¹, Eduardo Lopez-Escamilla¹, Francisco Velez-Perez², Williams Arony Martinez-Flores³, Patricia Rodriguez-Zulueta², Joel Martinez-Ocaña³, Fernando Martinez-Hernandez³, Mirza Romero-Valdovinos³, Pablo Maravilla³

¹Laboratorio Clínico, ²Subdirección de Epidemiología y Registros Médicos, ³Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, 14080, Mexico DF, Mexico.

Key words: HIV/AIDS; *Blastocystis* spp; *Cryptosporidium* spp

J Infect Dev Ctries 2013; 7(10):763-766. doi:10.3855/jidc.3512

(Received 07 March 2013 – Accepted 12 June 2013)

Copyright © 2013 Sanchez-Aguillon *et al.* This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

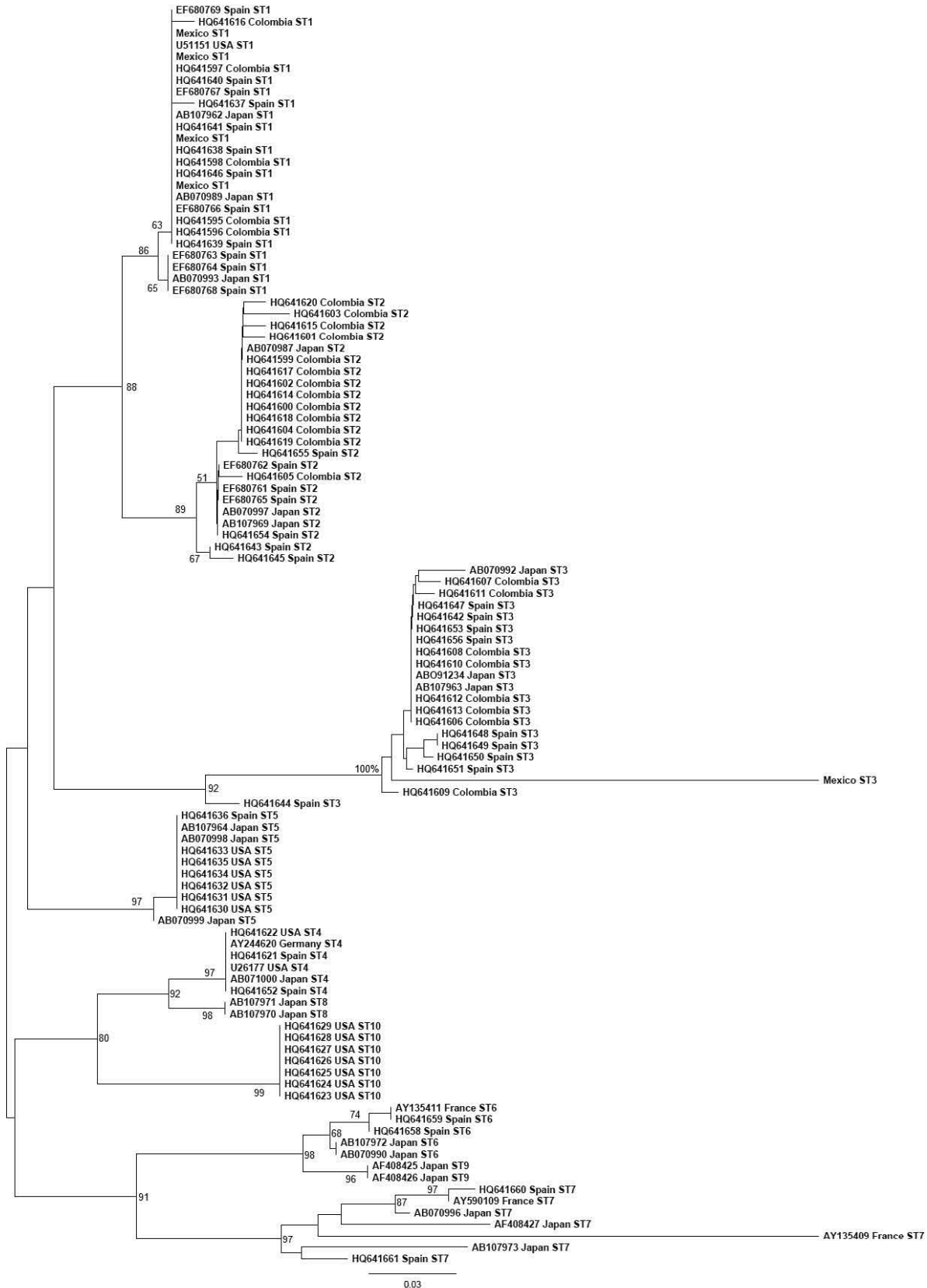
Opportunistic infections usually aggravate the clinical condition of HIV-infected patients; of these, parasites play an important role as most common causes of morbidity and mortality, especially in those who are severely immunosuppressed [1]. On the other hand, *Blastocystis* is a ubiquitous emerging parasite with unresolved controversy over its pathogenicity; besides, it remains one of the most frequent human intestinal parasites with zoonotic potential. This microorganism has been divided into numerous subtypes (ST), nine of which have been identified in immunocompromised and non immunocompromised human carriers with or without intestinal disorders [2,3].

Twenty-seven asymptomatic adult patients confirmed with HIV/AIDS one or two years ago, who have CD4+ T-lymphocyte count >200 cells/mm³, under highly active antiretroviral therapy (HAART), and are being attended in the HIV/AIDS Clinic of the Hospital General “Dr. Manuel Gea González” for their periodic check-up, were recruited for search of opportunistic intestinal parasites and *Blastocystis* ST infection; a descriptive cohort study over a 9-month period (June 2011 to March 2012) was used. The Ethics and Research Committee of our hospital approved the study and informed consent was obtained from each patient before recruitment. For baseline, three faecal specimens were requested to each participant, and four cross-sectional analyses with serial stool samples at one, three, six and nine months were performed. Coproparasitoscopic analysis was performed using Faust’s technique and microscopic observation for search of protozoa cysts and helminth

ova was done. Non-concentrated smears were air-dried; methanol fixed and stained using Kinyoun acid-fast to detect *Cryptosporidium* spp., *Cystoisospora belli* and *Cyclospora cayetanensis* according to Kurniawan *et al* [1]. Aliquots were processed by PCR for *Blastocystis* diagnosis and identification of ST. For this, stool DNA was extracted and PCR performed according to Jimenez-Gonzalez *et al.* [4] and Santin *et al.* [5]; some amplicons were purified and submitted to sequence with a commercial supplier. All sequences were subjected to BLAST search in the GenBank database; multiple alignments were executed and a phylogenetic inference by the neighbor-joining method was performed. Finally, to investigate the association between some variables, a χ^2 test was used. *P*-value <0.05 was considered significant (Epi-Info version 6). Along the study patients who were positive to pathogen parasites were treated conventionally with trimethoprim-sulfamethoxazole for intestinal coccidia and nitazoxanide for protozoa; 15 days after treatment serial samples were analysed to corroborate the efficiency to therapy; asymptomatic patients to *Blastocystis* did not receive therapy.

A total of 21 male and 6 female with a mean age and standard deviation of 39±17 years, were recruited. Table 1 shows the positive coproparasitoscopic and PCR results along the study for all participants; eight patients (30%) were negative at the follow-up measurement, while the rest harboured commensal protozoa or by some parasites. In general, participants exhibited one type of infection, while only two presented co-infections (patients 22 and 25). *Blastocystis* was present in 30%, *Endolimax nana* and

Figure 1. Phylogenetic tree of *Blastocystis* sequences inferred using the neighbor-joining method. GenBank accession numbers and country of origin are shown. Bootstrap proportions (%) are presented in the node branches and those values of less than 50% are not shown.



intestinal coccidia in 22%; other protozoa were less frequent and no helminths were observed. The only statistical association found was between diarrhoea and presence of intestinal coccidia ($P=0.004$). Half of *Blastocystis* carriers were infected with ST1 and ST3 respectively. All patients infected with coccidia or with *Giardia lamblia* presented intestinal alterations as diarrhoea, abdominal pain and bloating; only two patients (7 and 25) infected with *Blastocystis* showed irritable bowel syndrome according to the Rome III criteria [6]; symptoms declined when anti-parasitic therapy was applied. Interestingly, during the second cross-sectional analysis, patient 17 was symptomatic and presented co-infection with *G. lamblia*, *E. coli* and *Blastocystis*, last only identified by PCR; treatment was supplied and 15 days later no parasites were identified and symptoms disappeared, but in the next cross-sectional analysis, *Blastocystis* of the similar ST (ST1) was present together with *E. coli*, probably due to deficient hygienic habits, as suggested by the persistence of *Entamoeba coli*; the patient was asymptomatic. The phylogenetic tree (Figure 1) revealed the presence of ten different clades that corresponded exactly to ST1 to 10 according to Santin *et al.* [5] and our sequences were grouped in the ST1 and ST3 clades. Although, in present work, controversy remains over the pathogenic potential of *Blastocystis* ST; according to Stensvold *et al.* [3], it is possible that differences in clinical outcome of *Blastocystis* infection are related to genetic differences on the subtype- or strain-level.

We can conclude that i) *Blastocystis* ST1 and ST3 were the most frequent parasites identified; ii) *Blastocystis* ST1 is potentially capable of reinfecting the same carrier in at least a three-month period; iii) symptomatic cases should be submitted to PCR in order to increase sensitivity in the detection of *Blastocystis*, especially in immunocompromised patients; intestinal coccidia were the most frequent parasites after *Blastocystis*; iv) other molecular

markers for *Blastocystis* ST should be studied to elucidate the complexity of this heterogeneous genus and its role in human disease.

Acknowledgements

To Sara Arroyo, David Moncada, and clinical laboratory staff of Hospital General “Dr. Manuel Gea González” for their assistance. This work was partially sponsored by Grant Conacyt 182089

References

1. Kurniawan A, Karyadi T, Dwintasari SW, Sari IP, Yuniastuti E, Djauzi S, Smith HV (2009) Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 892-898.
2. Tan TC, Ong SC, Suresh KG (2009) Genetic variability of *Blastocystis sp.* isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. *Parasitol Res* 105: 1283-1286.
3. Stensvold CR, Alfellani M, Clark CG (2012) Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect Genet Evol* 12: 263-273.
4. Jimenez-Gonzalez DE, Martinez-Flores WA, Reyes-Gordillo J, Ramirez-Miranda ME, Arroyo-Escalante S, Romero-Valdovinos M, Stark D, Souza-Saldivar V, Martinez-Hernandez F, Flisser A, Olivo-Diaz A, Maravilla P (2012) *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitol Res* 110: 1269-1275.
5. Santin M, Gómez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R (2011) Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis spp.* from humans and animals. *Parasitol Res* 109: 205-212.
6. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC (2006) Functional bowel disorders. *Gastroenterol* 130: 1480-1491.

Corresponding author

Pablo Maravilla, PhD.

Departamento de Ecología de Agentes Patógenos,
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, 14080, Mexico DF,
Mexico.

Tel/Fax: +5255-55284228

Email: maravillap@yahoo.com

Conflict of interests: No conflict of interests is declared.

New *Tetratrichomonas* Species in Two Patients with Pleural Empyema

AQ: au Eduardo Lopez-Escamilla,^a Fabiola Sanchez-Aguillon,^a Cynthia Pamela Alatorre-Fernandez,^b Daniel Aguilar-Zapata,^b Sara Arroyo-Escalante,^a Teresa Arellano,^a David Moncada-Barron,^a Mirza Romero-Valdovinos,^c Fernando Martinez-Hernandez,^c Patricia Rodriguez-Zulueta,^b Pablo Maravilla^c

Laboratorio Clínico,^a Subdirección de Epidemiología y Registros Médicos,^b and Departamento de Ecología de Agentes Patógenos,^c Hospital General Dr. Manuel Gea González, México DF, México

AQ: B **Two unusual occurrences of pleural trichomonosis due to a new *Tetratrichomonas* species previously reported but not named were confirmed. In one patient, *Trichomonas tenax* and a *Tetratrichomonas* species were also detected in the oral cavity by molecular methods. We suggest that this new *Tetratrichomonas* species be named *Tetratrichomonas empyemagenae*.**

CASE REPORTS

AQ: C **C**ase 1 is that of a 54-year-old male from Mexico City with uncontrolled type 2 diabetes who was admitted to the hospital with a history of 1 week of malaise, poor food intake, chills, and fever after developing right thoracic pain, dyspnea, and fatigue; he denied any history of choking or trauma in recent days. Dullness on percussion and decreased breathing sounds were noted over his right chest. His blood pressure was 120/50 mmHg, his heart rate was 120 beats/min, his respiratory rate was 30 breaths/min, his white blood cell count was 45,000/mm³, his platelet count was 565,000/mm³, his glucose level was 503 mg/dl, his albumin level was 1.6 g/dl, and his arterial HCO₃ level was 5.6 meq/liter. An initial chest X-ray and computed tomography (CT) scan showed a right pleural effusion that was drained (700 ml), and the pleural fluid was sent for microbiological analysis. Its macroscopic appearance was that of a brownish purulent fluid. Microscopic examination revealed Gram-positive cocci and Gram-negative bacilli, as well as numerous motile and flagellated protozoa that were initially identified as trichomonads because of their morphological characteristics (form, size, and motility). These flagellates were not cultured, and their identification was confirmed by microscopic examination of an empyema fluid smear. Samples were mixed with whole blood at 1:3, spread onto glass slides, air dried, methanol fixed, and stained with Giemsa stain (Fig. 1A and B). Some aliquots of empyema fluid were stored at -20°C for molecular analysis. Bacteriological cultures of the fluid were performed for aerobic and anaerobic microorganisms, yielding *Staphylococcus auricularis*, but no bacilli were identified until after PCR sequencing of an empyema fluid sample. A *Prevotella* species was demonstrated by using universal primers for the 16S rRNA gene (1). Antibiotic therapy with metronidazole and piperacillin-tazobactam was administered.

FI **C**ase 2 is that of a 33-year-old man from Mexico City with a history of smoking and alcohol consumption who was admitted to the hospital with a 2-week nonproductive cough and chills, dyspnea, and left pleural chest pain. His blood pressure was 70/40 mmHg, his heart rate was 150 beats/min, and his respiratory rate was 40 breaths/min. During subsequent days, fever and diaphoresis were added to the clinical course, as well as worsening of dyspnea until he developed acute respiratory failure and septic shock. Thorax auscultation revealed bilateral crackles and diminished breath sounds on the left side; he was placed on mechanical ventilation. A chest X-ray and a thorax CT scan showed a right pneu-

mothorax and left pleural effusion. He underwent bilateral chest tube insertion, and a purulent, brownish, and fetid fluid containing a large number of cells, Gram-positive cocci and bacilli, and Gram-negative rods was drained from the left side. In addition, numerous motile flagellates with the typical appearance of trichomonads were visible in fresh preparations. Culture yielded only *Streptococcus sanguinis*. A *Prevotella* species was demonstrated by PCR sequencing as described above. As in case 1, empyema fluid smears were stained with Giemsa stain and some fluid samples were stored at -20°C for molecular analysis. In addition, an oral sample was taken by brushing the teeth and gums with a cytology brush and saline solution. Fresh preparations showed trichomonads with high motility, and remnant samples were frozen for molecular analysis. Treatment with metronidazole and piperacillin-tazobactam was given. In both cases, the trichomonads in fixed samples had an average size of 14.1 ± 2.1 μm long and 9.4 ± 1.1 μm wide.

Molecular analysis. In order to identify the trichomonad species involved in both cases, DNA was extracted from empyema fluid and from oral lavage saline solution with the Puregene DNA Purification System (Gentra Systems) according to the manufacturer's protocol. The internal transcribed spacer 1 (ITS1)-5.8S rRNA-ITS2 region was amplified with primers described previously (2-4). Negative (human DNA) and positive (vaginal specimen with *Trichomonas vaginalis*) controls were included. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis (Fig. 1C). Unexpectedly, single amplicons of ~400 bp were observed in both empyema fluids, and two bands of ~370 and ~400 bp were seen in the oral sample. The *T. vaginalis* sample has a size of ~370 bp. All amplicons were purified with the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany), and both strands were sequenced by a commercial supplier. These sequences were compared with 181 trichomonad ITS1-5.8S rRNA-ITS2 sequences available in the National Center for Biotechnology Information database. Multiple alignments were performed with the CLUSTAL W program

Received 19 April 2013 Returned for modification 29 May 2013

Accepted 16 June 2013

Published ahead of print 19 June 2013

Address correspondence to Pablo Maravilla, maravillap@yahoo.com.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.01056-13

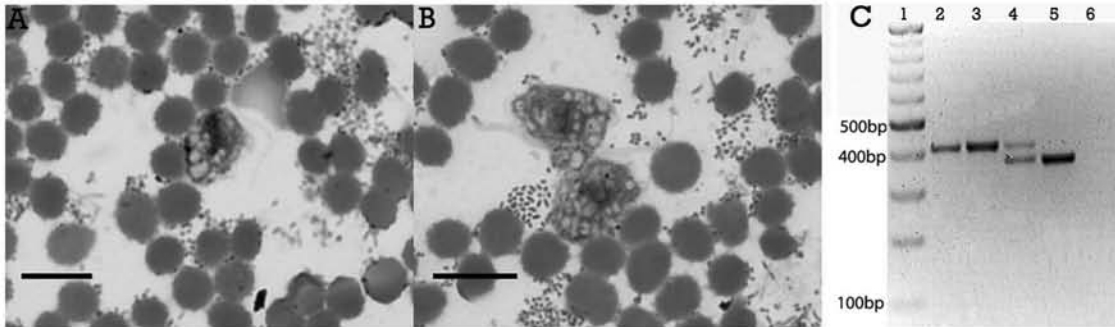


FIG 1 Giemsa-stained smears of empyema fluid. (A) Trichomonads showing piriform and ellipsoidal shapes. (B) Amoeboid forms with some pseudopods. Internal structures such as the axostyle-pelta complex and flagella are not clearly visible; only food vacuoles are evident. In both cases, several bacteria are present. Bars, 14 μ m. (C) Ethidium bromide-stained agarose gel showing PCR amplicons of the ITS1-5.8S-rRNA-ITS2 gene of Trichomonadinae. Lanes: 1, 100-bp DNA molecular size marker; 2 and 3, total DNA obtained from empyema fluid samples from cases 1 and 2, respectively; 4, DNA from an oral sample from case 2; 5, DNA from a vaginal specimen with *T. vaginalis* as a positive control; 6, negative control.

v1.8 (5) and manually adjusted with the MEGA program v4 (6, 7), while the ModelTest 3.7 program (8) was used to determine the appropriate model of molecular evolution. The sequences were analyzed with the general time-reversible model with gamma distribution. A phylogenetic reconstruction using Bayesian inference was performed with the program Mr. Bayes 3.1.2 (9–11). The analysis was executed for 1 million generations. Sampling trees were built every 100 generations, and those with scores lower than the stationary phase were discarded, while those that reached the stationary phase were collected and used to build a consensus tree. The phylogenetic inference (Fig. 2) showed that both of the trichomonads found in the lungs of our patients were grouped in a separate clade with high levels of statistical support (a posterior probability of 0.96) with sequences of the new *Tetratrichomonas* species previously reported by Mantini et al. (4). They were 99% identical, and they were distant from *Tetratrichomonas gallinarum* and other species of the *Tetratrichomonas* genus. The sequence of one of the amplicons obtained from the oral sample of case 2 (~370 bp) clustered with a sequence of *Trichomonas tenax*, while the other (~400 bp) was identical to the empyema fluid isolate sequence.

Pulmonary trichomonosis is a rare event; however, some studies published over the last few years indicate that its occurrence is underestimated (12, 13). Indeed, although precise morphological identification guidelines for this parasite are available and generally the typical flagellate form is easily recognized by microbiologists, trichomonads may not be identified even by expert biologists because the parasite is able to present amoeboid forms during adhesion to host cells (14) and sometimes its internal structures are not visible (14, 15).

According to Mallat et al. (3) and Letierrier et al. (13), *T. tenax* is often suspected to be responsible for pulmonary trichomonosis even though it is a commensal of the human oral cavity, particularly in people with poor oral hygiene and advanced periodontal disease. It has been proposed that trichomonad parasites probably enter the respiratory tract by aspiration from the oropharynx. In addition, the parasite is known to feed on the aspirated bacteria and therefore it does not cause pulmonary disease by itself (3, 16). In case 2, we confirmed the simultaneous presence of *T. tenax* and a new *Tetratrichomonas* species in the mouth of the patient and

only the presence of the latter in the empyema fluid. Besides, as reported in other cases (2–4, 13), coinfection with trichomonads and bacteria from the oropharyngeal microbiota supports the hypothesis that the source of this parasite was most likely the oral cavity. However, it is not clear why only the new *Tetratrichomonas* species was identified in the lung; we suggest that *T. tenax* did not develop in the lungs because of a competitive phenomenon and/or an adverse microenvironment during pleural invasion. Two other interesting features in both cases were the seasonality and the presence of some risk factors in the patients. Our hospital is the only public general concentration hospital in the south of Mexico City, pulmonary trichomonosis was never before identified, and the presence of two similar cases in the same winter season may be a relevant finding about the biology of Trichomonadinae; therefore, epidemiological studies should be undertaken. Proliferation of trichomonads seems to depend on the presence of bacteria such as oral streptococci or anaerobes. Here we confirmed a *Prevotella* species and cocci in both patients, similar to a previously reported empyema case due to a new *Tetratrichomonas* species (4); thus, it is probably that these bacteria promote a microenvironment adequate for the establishment and growth of *Tetratrichomonas*. In addition, both patients had underlying diseases (uncontrolled type 2 diabetes and alcohol abuse, respectively), as generally reported in other cases of pulmonary trichomonosis (13).

The genus *Tetratrichomonas* can be recognized because it has four anterior flagella, a long posterior flagellum with a free distal end, and a typically discoidal parabasal body, i.e., the Golgi complex with adjacent striated fibrils (17, 18), that can parasitize birds, reptiles, and livestock. On the other hand, ITS1-5.8S rRNA-ITS2 is a good marker for genetic diversity research (19, 20). Molecular analysis performed by Kleina et al. (21) and Cepicka et al. (17) with this molecular marker showed that the genus *Tetratrichomonas* is more diverse than previously known, with numerous robust host-specific and monophyletic groups that probably represent new species, and because of its wide host range and high level of species specificity, this makes the genus *Tetratrichomonas* a valuable model for studying parasite evolution. In addition, a DNA sequencing study of the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region from a collection of axenic trichomonad strains isolated from the oral cavities and bronchi of Estonian patients with pulmonary diseases revealed the presence of another novel trichomonad species that



FIG 2 Bayesian phylogenetic tree of several members of the family Trichomonadinae based on ITS1-5.8S-rRNA-ITS2 sequences. The values at the nodes are posterior percentage probabilities obtained by using 10^6 generations. GenBank accession numbers are shown in parentheses. The arrows in the center of the tree indicate the new species, placed as an independent clade. *T. tenax* from the oral sample and *T. vaginalis*, used as the positive control, were grouped in their respective species clades.

belongs to the genus *Tetratrichomonas* with high similarity to the avian species *Tetratrichomonas gallinarum* (22).

According to Duboucher et al. (12), it is relevant to alert parasitologists to the potential occurrence of trichomonads, alone or as coinfecting agents, in pulmonary disease milieus and to underline the importance of direct microscopic examination of fresh samples, as well as the usefulness of molecular methods for species identification, because we are certain that new cases of pulmonary trichomonosis caused by this new species will appear. Thus, considering the fact that a new *Tetratrichomonas* species was identified in two human pleural empyema patients in the present study and previously in another patient but was not named then, we suggest that this new *Tetratrichomonas* species be named *T. empyemagenae* on the basis of the pathological sign empyema and the Greek suffix gena, meaning origin or production.

Nucleotide sequence accession numbers. The nucleotide sequences of *T. empyemagenae*, *T. tenax*, and *T. vaginalis* obtained in this study have been submitted to GenBank under accession numbers [KF164606](#) to [KF164609](#).

REFERENCES

- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p 115–175. In Stackebrandt E, Goodfellow M (ed), *Nucleic acids techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, United Kingdom.
- Jongwutiwes S, Silachamroon U, Putaporntip C. 2000. *Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94:185–186.
- Mallat H, Podglajen I, Lavarde V, Mainardi J-L, Frappier J, Cornet M. 2004. Molecular characterization of *Trichomonas tenax* causing pulmonary infection. *J. Clin. Microbiol.* 42:3886–3887.
- Mantini C, Souppart L, Noel C, Duong TH, Mornet M, Carroger G, Dupont P, Masseret E, Goustille J, Capron M, Duboucher C, Dei-Cas E, Viscogliosi E. 2009. Molecular characterization of a new *Tetratrichomonas* species in a patient with empyema. *J. Clin. Microbiol.* 47:2336–2339.
- Templeton AR, Sing CF. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134:659–669.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111–120.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5:150–163.
- Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818.
- Holder M, Lewis PO. 2003. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nat. Rev. Genet.* 4:275–284.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294:2310–2314.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574.
- Duboucher C, Pierce RJ, Capron M, Dei-Cas E, Viscogliosi E. 2008. Recent advances in pulmonary trichomonosis. *Trends Parasitol.* 24:201–202.
- Leterrier M, Morio F, Renard BT, Poirier AS, Miegville M, Chambreuil G. 2012. Trichomonads in pleural effusion: case report, literature review and utility of PCR for species identification. *New Microbiol.* 35:83–87.
- Gilroy S, Simcaski E, Rawling R, Granato P. 2007. Trichomonas species empyema coinfection in an alcoholic female. *Clin. Microbiol. News.* 29:69–71.
- Bellanger AP, Cabaret O, Costa JM, Foulet F, Bretagne S, Botterel F. 2008. Two unusual occurrences of trichomoniasis: rapid species identification by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46:3159–3161.
- Lewis KL, Doherty DE, Ribes J, Seabolt JP, Bensadoun ES. 2003. Empyema caused by *Trichomonas*. *Chest* 123:291–292.
- Cepicka I, Hampl V, Kulda J, Flegr J. 2006. New evolutionary lineages, unexpected diversity, and host specificity in the parabasalid genus *Tetratrichomonas*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39:542–551.
- Honigberg BM. 1963. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *J. Protozool.* 10:20–63.
- Martinez-Hernandez F, Jimenez-Gonzalez DE, Chenillo P, Alonso-Fernandez C, Maravilla P, Flisser A. 2009. Geographical widespread of two lineages of *Taenia solium* due to human migrations: can population genetic analysis strengthen this hypothesis? *Infect. Genet. Evol.* 9:1108–1114.
- Pomajbíková K, Oborník M, Horák A, Petrželková KJ, Grim JN, Levecké B, Todd A, Mulama M, Kiyang J, Modrý D. 2013. Novel insights into the genetic diversity of *Balantidium* and *Balantidium*-like cyst-forming ciliates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2140. doi:10.1371/journal.pntd.0002140.
- Kleina P, Bettim-Bandinelli J, Bonatto SL, Benchimol M, Bogo MR. 2004. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. *Int. J. Parasitol.* 34:963–970.
- Kutisova K, Kulda J, Cepicka I, Flegr J, Koudela B, Teras J, Tachezy J. 2005. Tetratrichomonads from the oral cavity and respiratory tract of humans. *Parasitology* 131:309–319.

Anexo 3 Secuencias de referencia para cada subtipo de Blastocystis incluidas en este estudio con su número de acceso del GenBank, hospedero, País de origen y referencia, datos utilizada para recrear el árbol filogenético (Santín et al 2011).

Hospedero	Localización	Subtipo (ST)	Número de acceso GenBank
Humano	Colombia	ST-1	HQ641595
Humano	Colombia	ST-1	HQ641596
Humano	Colombia	ST-1	HQ641597
Humano	Colombia	ST-1	HQ641598
Humano	Colombia	ST-2 (4 secuencias de nucleótidos)	HQ641599- HQ641602
Humano	Colombia	ST-2 (2 secuencias de nucleótidos)	HQ641603- HQ641604
Humano	Colombia	ST-2	HQ641605
Humano	Colombia	ST-3 (5 secuencias de nucleótidos)	HQ641606- HQ641610
Humano	Colombia	ST-3	HQ641611
Humano	Colombia	ST-3	HQ641612
Humano	Colombia	ST-3	HQ641612
Humano	Colombia	ST-3	HQ641613
Humano	Colombia	ST-1 (1 secuencia de nucleótidos)	HQ641614-
		ST-2 (6 secuencias de nucleótidos)	HQ641620
Humano	España	ST-4	HQ641621
Humano	USA	ST-4	HQ641622
Vaca	USA	ST-10	HQ641623
Vaca	USA	ST-10	HQ641624
Vaca	USA	ST-10	HQ641625
Vaca	USA	ST-10	HQ641626
Vaca	USA	ST-10	HQ641627
Vaca	USA	ST-10	HQ641628
Vaca	USA	ST-10	HQ641629
Cerdo	USA	ST-5	HQ641630
Cerdo	USA	ST-5	HQ641631
Cerdo	USA	ST-5	HQ641632
Cerdo	USA	ST-5	HQ641633
Cerdo	USA	ST-5	HQ641634
Cerdo	USA	ST-5	HQ641635
Cerdo	España	ST-5	HQ641636
Primate (Hapalemuraureus)	España	ST-1 (5 Secuencias de nucleótidos)	HQ641637- HQ641641
Primate (Cercopithecushamlyni)	España	ST-1 (2 Secuencias de nucleótidos)	HQ641642-
Primate (Lémur catta)	España	ST-3 (7 secuencias de nucleótidos)	HQ641651
Primate (Mandrillusleucophaeus)	España	ST-4	HQ641652
Primate (Gorillagorilla)	España	ST-3	HQ641653
Primate (cercocebusatys)	España	ST-2(2 secuencias de nucleótidos)	HQ641654- HQ641655
Primate (Cerrocebusneglectus)	España	ST-3	HQ641656
Pollo	España	ST-3	HQ641657
		ST-6(2 Secuencias de nucleótidos)	HQ641658-
		ST-7(2 Secuencias de nucleótidos)	HQ641661

Secuencias de referencia por cada subtipo de *Blastocystis* incluidas en este estudio con su número de acceso del GenBank, hospedero, país de origen y referencia, datos utilizada para recrear el árbol filogenético (Santín et al 2011).

Hospedero	Localizacion	Subtipos	Número de acceso GenBank
Humano	USA	ST-1	U51151
Humano	Japón		AB107962
Pollo	Japón		AB070993
Humano	Japón		AB070989
Primate	Japón	ST-2	AB070997
Primate	Japón		AB107969
Humano	Japón		AB070987
Humano	Japón	ST-3	AB091234
Cerdo	Japón		AB107963
Humano	Japón		AB070992
Guinea Cerdo	USA	ST-4	U26177
Rata	Japon		AB071000
Humano	Alemania		AY244620
Cerdo	Japon	ST-5	AB070998
Cerdo	Japon		AB107964
Cerdo	Japon		AB070999
Pavo	Francia	ST-6	AY135411
Ave	Japón		AB107972
Humano	Japón		AB070990
Humano	Francia	ST-7	AY590109
Humano	Japón		AF408427
Codorniz	Japón		AB070996
Pollo	Francia		AY135409
Ave	Japón		AB107973
Ave	Japón	ST-8	AB107971
Primate	Japón		AB107970
Humano	Japón	ST-9	AF408425
Humano	Japón		AF408426
Vaca	Dinamarca	ST-10	FM164412
Vaca	Dinamanrca		FM164413

11. BIBLIOGRAFÍA

Abu Al-Soud W, Rådström P. 2000. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J. Clin. Microbiol.* 38(12):4463-70.

Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, Clark CG. 2013. Genetic Diversity of *Blastocystis* in Livestock and Zoo Animals. *Protist*, 164 (4): 497-509.

Amin OM. 2002. Seasonal prevalence of intestinal parasites in the United States during 2000. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66(6):799-803.

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

Becerril Flores MA. 2011. *Parasitología médica*. Tercera edición. Editorial McGRAW-HILL interamericana. México. 55-57.

Boorom KF. 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 1990 Med. Hypotheses. 69 (3):652-9.

Boreham PF, D. J. Stenzel. 1993. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv. Parasitol.* 32:1-70.

Brumpt, E. 1912. *Blastocystis hominis*. formes voisines. *Bull. Soc, de Pathol Exotique* 5: 725–30.

Cavalier-Smith T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 73: 203-66.

Chincha O, Bernabé-Ortiz A, Samalvides F, Soto L, Gotuzzo E, Terashima A. 2009. Infecciones parasitarias intestinales y factores asociados a la infección por coccidias en pacientes adultos de un hospital público de Lima, Perú. *Rev. Chilena de Infectol.* 26 (5):440-4.

Cimerman S, Cimerman B, Lewi DS. 1999. Prevalence of intestinal parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *Int J. Infect.* 3 (4):203-6.

Cirioni O, A. Giacometti, D. Drenaggi, F. Ancarani, G. Scalise. 1999. Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. *Eur. J. Epidemiol.* 15:389-93.

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, pag. 75.

Diaz E, Mondragon J, Ramirez E, Bernal R. 2003. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. Am. J. Trop. Med. Hyg. 68(4):384-5.

Dogruman-Al F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt O, Demirel M. 2008. A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. Parasitol Res.103:685-9.

Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM. 1990. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. J. Clin. Microbiol. 28(1):116-21.

Dunn LA, Boreham PF, Stenzel DJ. 1989. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. Int. J. Parasitol. 19(1):43-56.

Flisser A, Valdespino JL, Garcia-Garcia L, Guzman C, Aguirre MT, Manon ML, González-González G, Gyorkos TW. 2008. Using national health weeks to deliver deworming to children: lessons from Mexico. J. Epidemiol Community Health. 62 (4): 314-7.

Garavelli PL, Scaglione L, Biccocchi R, Libanore M. 1991. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. Infection.19: 185.

García Lynne Shore. 2001. Diagnostic medical parasitology. 4th ed. - Washington, D.C: Am Soc for Microbiol. 28-35.

Giacometti A, Cirioni O, Antonicelli L, D'Amato G, Silvestri C, Del Prete MS, Scalise G. 2003. Prevalence of intestinal parasites among individuals with allergic diseases. J. Parasitol. 89: 490-2.

Gupta S, Narang S, Nunavath V, Singh S. 2008. Chronic diarrhea in HIV patients: prevalence of coccidian parasites. Indian J. Med. Microbiol; 26:172-175.

Herráez A, Luque J. 2012. Biología molecular e Ingeniería genética. Segunda edición. Editorial ELSEVIER. España. 32-33, 135-142, 201-209.

Jimenez-Gonzalez DE, Martinez-Flores WA, Reyes-Gordillo J, Ramirez-Miranda ME, Arroyo-Escalante S, Romero-Valdovinos M, Stark D, Souza-Saldivar V, Martinez-Hernandez F, Flisser A, Olivo-Diaz A, Maravilla P. 2012. *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. Parasitol Res. 110(3):1269-75.

Johnson AM, Thanou A, Boreham PF, Baverstock PR. 1989. *Blastocystis hominis*: phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison. Parasitol. Res 68(3): 283-8.

Jones MS, Whipps CM, Ganac RD, Hudson NR, Boorom K. 2009. Association of *Blastocystis* subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. Parasitol Res. 104:341-5.

Junod C. 1995. *Blastocystis hominis*: a common commensal in the colon. Study of prevalence in different populations of Paris. Presse Med. 24(36):1684-8.

Kain KC, MA. Noble, HJ. Freeman and RL. Barteluk. 1987. Epidemiology and clinical features associated with *Blastocystis hominis* infection. Diagn. Microbiol. Infect. 8:235-244.

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

Kaya S, Cetin ES, Aridoğan BC, Arikan S, Demirci M. 2007. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. Turkiye Parazitoloj Derg. 31(3):184-7.

Kurniawan A, Karyadi T, Dwintasari SW, Sari IP, Yuniastuti E, Djauzi S, Smith HV. 2009. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhea in Jakarta, Indonesia. R. Soc. Trop. Med and Hy 103, 892-8.

Leder K, Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Wolfe R. 2005. No correlation between clinical symptoms and *Blastocystis hominis* in immunocompetent individuals. J. Gastroenterol. Hepatol. 20(9):1390-4.

Leelayoova S, Taamasri P, Rangsin R, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M. 2002. *In-vitro* cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 96(8):803-7.

Leelayoova S, Rangsin R, Taamasri P, Naaglor T, Thathaisong U, Mungthin M. 2004. Evidence of waterborne transmission of *Blastocystis hominis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 70(6):658-62.

Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, Mungthin M. 2008. Drinking water: a possible source of *Blastocystis* spp. subtypes 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. 79(3):401-6.

Lewthwaite P, Gill G, Hart A, Beeching N. 2005. Gastrointestinal parasites in the immunocompromised. Curr. Opin. Infect. 18: 427-35.

- Li LH, XN. Zhou, ZW. Du, XZ. Wang, LB. Wang, JY. Jiang, H. Yoshikawa, P. Steinmann, J. Utzinger, Z. Wu, J. X. Chen, SH. Chen, and L. Zhang. 2007a. Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitol. Int.* 56:281-86.
- 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(1):83-90.
- Lin Z, Zhang Y, Zhang H, Zhou Y, Cao J, Zhou J. 2012. Comparison of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time PCR method targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis. *Parasitol.* 185(2-4):296-300.
- Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. 2006. Functional bowel disorders. *Gastroenterol* 130: 1480-91.
- Maravilla P, González-Gúzman R, Zuñiga G, Peniche A, Dominguez-Alpizar JL, Reyes-Montes R, Flisser A. 2007. Genetic polymorphism in *Taenia solium* cysticerci recovered from experimental infections in pigs. *Infection Genetics. Res* 8: 2013-216.
- Martínez Flores W. A. 2009. Prevalencia de *Dientamoeba fragilis* en pacientes con alteraciones gastrointestinales. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad Simón Bolívar. Pág. 40-43.
- Matsumoto Y, Yamada M, Yoshida Y. 1987. Light-microscopical appearance and ultrastructure of *Blastocystis hominis*, an intestinal parasite of man. *Zentra lbl Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. A.* 264(3-4):379-85.
- McClure HM, Strobert EA, Healy GR. 1980. *Blastocystis hominis* in a pig-tailed macaque: a potential enteric pathogen for non human primates. *Lab. Anim. Sci.* 30(5):890-4.
- Mehlhorn H. 1988. *Blastocystis hominis*, Brumpt, 1912: are there different stages or species?. *Parasitol Res.* 74: 393-395.
- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Ng GC, Chen XQ, Yap EH. 1996. Observations on the ultra structure and viability of the stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitol Res.* 82: 439-444.
- Moe, KT, M. Singh, J. Howe, LC. Ho, SW. Tan, XQ. Chen, GC. Ng, and EH. Yap. 1997. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitol. Res.* 83:319-325.

Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, Yap EH. 1999. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. Parasitol Res 85: 103-108.

Moghaddam DD, E. G hadirian, and M. Azami. 2005. *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. Parasitol. Res. 96:273-275

Mohandas, Sengal R, Sud A. Malla N. 2002. "Prevalence of intestinal parasitic pathogens in HIV-seropositive individuals in Northern India". Jpn. J. Infect. 55 (3): 83-4.

Nasirudeen AM, Singh M, Yap EH, Tan KS. 2001a. *Blastocystis hominis*: evidence for caspase-3-like activity in cell sunder going programmed cell death. Parasitol Res. 2001a 87(7):559-65.

Nasirudeen AM, Tan KS, Singh M, Yap EH. 2001b. Programmed cell death in a human intestinal parasite, *Blastocystis hominis*. Parasitology 123 (Pt 3):235-46.

Pakandl M. 1999. *Blastocystis* sp. from pigs: ultrastructural changes occurring during cultivation in Iscove's modified Dulbecco's medium. Parasitol Res. 85(8-9):743-8.

Parkar U, RJ. Traub, S. Kumar, M. Mungthin, S. Vitali, S. Leelayoova, K. Morris, and RC. Thompson. 2007. Direct characterization of *Blastocystis* from faeces by PCR and evidence of zoonotic potential. Parasitology 134:359-367.

Parkar U, Traub RJ, Vitali S, Elliot A, Levecke B, Robertson I, Geurden T, Steele J, Drake B, Thompson RC. 2010. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. Vet. Parasitol. 19:169 (1-2):8-17.

Pegelow K, R. Gross, K. Pietrzik, W. Lukito, AL. Richards, DJ. Fryauff. 1997. Parasitological and nutritional situation of school children in the Sukaraja district, West Java, Indonesia. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health 28:173-90.

Pinel C, Réjasse C, Picot S, Brenier-Pinchart MP, Grillot R, Ambroise-Thomas P. 1999. *Blastocystis hominis*: epidemiological and clinical remarks from more than 3,500 stool examinations. Ann. Biol. Clin. 57(5):601-4.

Poirier P, Wawrzyniak I, Albert A, El Alaoui H, Delbac F and Livrelli V. 2011. Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of *Blastocystis* Parasites in Human Stool Samples: Prospective Study of Patients with Hematological Malignancies. J. Clin. Microb. 975-983.

- Prasad KN, Nag VL, Dhole TN, Ayyagari A. 2000. Identification of enteric pathogens in HIV-positive patients with diarrhoea in northern India. *J. Health. Popul. Nutr.* 18(1):23-6.
- Puthia MK, A. Vaithilingam, J. Lu, KS. Tan. 2005. Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol. Res.* 97:386-9.
- Puthia MK, SW. Sio, J. Lu, KS. Tan. 2006. *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infect. Immun.* 74:4114-123.
- Puthia MK, J. Lu, KS. Tan. 2008. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-B-dependent manner. *Eukaryot. Cell.* 7:435-43.
- Rene BA, Stensvold CR, Badsberg JH, Nielsen HV. 2009. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80(4):588-92.
- Rivera WL, Ong VA. 2013. Development of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Entamoeba histolytica*. *Pac. J. Trop. Med.* 6(6):457-61.
- Rodríguez E, Brenda M, González JC, Aguilar YM, Alarcón E, Mendoza A, Mier M, Mora MA, Bernal R. 2008. Transición parasitaria a *Blastocystis hominis* en niños de la zona centro del estado de Guerrero, México. *Parasitol. Latinoam.* 63: 20 - 8.
- Rossignol JF, SM. Kabil, M. Said, H. Samir, AM. Younis. 2005. Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with *Blastocystis hominis*. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 3:987-91.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–25.
- Sambrook J, Fitsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santín M, Gómez-Muñoz MT, Solano-Aguilar G, Fayer R. 2011. Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitol Res.* 109(1):205-12.
- Scicluna SM, Tawari B, Clark CG. 2006. DNA Barcoding of *Blastocystis*. *Protist.* 157 : 77-85.

Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. 1996. Human parasite finds taxonomic home. *Nature*. 380: 398.

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. *Parasitol Res*. 105(2):413-21.

Stensvold CR, A. Brillowska-Dabrowska, HV. Nielsen, MC. Arendrup. 2006. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J. Parasitol*. 92:1081-87.

Stensvold CR, GK Suresh, KS Tan, RC Thompson, RJ Traub, E Viscogliosi, H Yoshikawa, and CG Clark. 2007a. Terminology for *Blastocystis* subtypes-a consensus. *Trends Parasitol*. 23:93-6.

Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Molbak K, Nielsen HV. 2007b. Detecting *Blastocystis* using parasitological and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn. Microbiol. Infect*. 59, 303-7.

Stensvold CR, Alfellani MA, Norskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, Nielsen HV, Clark CG. 2009a. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int. J. Parasitol*. 39:473-9.

Stensvold CR, Nielsen HV, Mølbak K, Smith HV. 2009b. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* - diagnostic limitations. *Trends Parasitol*. 25: 23-9.

Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, Porsbo LJ, Nielsen SS, Olsen KE, Arendrup MC, Nielsen HV, Molbak K. 2009c. *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol. Infect*. 137(11):1655-63.

Stensvold CR, Alfellani M, Clark G. 2011. Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infect. Genet. Evol*. 12(2):263-73.

Stensvold CR. 2013. *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Trop. Parasitol*. 3(1):26-34.

Stenzel DJ, Boreham PF, McDougall R. 1991. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. *Int. J. Parasitol*. 21(7):807-12.

Stenzel DJ, Boreham PF. 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin. Microbiol. Rev*. 9:563-84.

Suresh K, Howe J, Chong SY, Ng GC, Ho LC, Loh AK, Ramachandran NP, Yap EH, Singh M. 1994. Ultrastructural changes during in vitro encystment of *Blastocystis hominis*. Parasitol. Res. 80:327-335.

Suresh K, Smith H. 2004. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. 23: 509-11.

Suresh K, Smith HV, Tan TC. 2005. Viable *Blastocystis* cysts in Scottish and Malaysian sewage samples. Appl. Environ. Microbiol. 71(9):5619-20.

Tan KSW, Singh M, Yap EH, Ho LC, Moe KT, Howe J, Ng GC. 1996. Colony formation of *Blastocystis hominis* in soft agar. Parasitol Res. 82: 375-377.

Tan KS, Howe J, Yap EH, Singh M. 2001. Do *Blastocystis hominis* colony forms undergo programmed cell death? Parasitol Res; 87(5):362-7.

Tan, KSW. 2004. *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. Vet. Parasitol. 126:121-144.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol and Evol. 24:1596-9.

Tan, KSW. 2008. New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. Clin. Microbiol. Rev. 21: 639-665.

Tan TC, Suresh KG, Smith HV. 2008. Phenotypic and genotypic characterisation of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential. Parasitol Res. 104(1):85-93.

Tan TC, Ong SC, Suresh KG. 2009. Genetic variability of *Blastocystis* sp. Isolates obtained from cancer and HIV/AIDS patients. Parasitol Res. 105(5):1283-6. doi: 10.1007/s00436-009-1551-5.

Waywa D, Kongkriengdaj S, Chaidatch, Tiengrim S, Kowadisaiburana B, Chaikachonpat S, Suwanagool S, Chaiprasert A, Curry A, Bailey W, Suputtamongkol Y, Beeching NJ. 2001. Protozoan enteric infection in AIDS related diarrhea in Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health; 32 (Suppl 2):151-5.

William S, Michael R, Charlotte A. 2006. Conceptos de Genética. 8° Edición en Español. Pearson Educación, S.A. Madrid España.

Windsor JJ. 2007. *D. fragilis* and *B. hominis*: neglected human protozoa. The Biomedical Scientist. 524-27.

- Wong KH, Ng GC, Lin RT, Yoshikawa H, Taylor MB, Tan KS. 2008. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitol. Res.* 102(4):663-70.
- 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, Nagono I, Yap EH, 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. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43(2):127-30.
- Yoshikawa H, Z. Wu, I. Nagano, and Y. Takahashi. 2003. Molecular comparative studies among *Blastocystis* olates obtained from humans and animals. *J. Parasitol.* 89:585-594.
- Yoshikawa H, Yoshida K, Nakajima A, Yamanari K, Iwatani S, Kimata I. 2004. Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitol. Res.* 94(6):391-6.
- Yoshikawa H, Wu Z, Howe J, Hashimoto T, Geok-Choo N, Tan KS. 2007. Ultrastructural and phylogenetic studies on *Blastocystis* isolates from cockroaches. *J. Eukaryot. Microbiol.* 54(1):33-7.
- Yoshikawa H, Dogruman-AI F, Turk S, Kustimur S, Balaban N, Sultan N. 2011. Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human *Blastocystis* subtypes from fecal samples. *Parasitol Res.* 109(4):1045-50.
- Zaman V, Khan KZ. 1994 .A concentration technique for obtaining viable cysts of *Blastocystis hominis* from faeces. *J. Pak. Med.* 44(9):220-1.
- Zaman V, Howe J, Ng M. 1995. A comparative morphology of *Blastocystis hominis* cysts with and without the "fibrillar layer". *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public. Health.* 26(4):801-2.
- Zaman V, Howe J, Ng ML. 1997. Variation in the cyst morphology of *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Res.* 83: 731-73.
- Zaman V. 1998. The differential identification of *Blastocystis hominis* cysts. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92(2):233-5.
- Zierdt, CH, Rude WS, Bull BS. 1967. Protozoan characteristics of *Blasrocystis hominis*. *Am. J. C. Pathol. Rev.* 48(5):495-501.
- Zierdt CH. 1973. Studies of *Blastocystis hominis*. *J. Protozool.* 20(1):114-21.

Zierdt CH. 1991. *Blastocystis hominis* past and future. Clin. Microbiol. Rev. 4:61-79.

Páginas Web

http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/2011/NUMERALIA_SIDA_2011.pdf

<http://www.ebi.ac.uk>.

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

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>