



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Estandarización de un sistema *in vitro* para evaluación de
sensibilidad a antiparasitarios de *Blastocystis* spp.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A:

VILLAFAÑA BECERRA DANIEL MARTÍN

ASESORA: Q F B. Laura Gricelda Martínez Méndez

COASESOR: M. en C. Israel Parra Ortega

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estandarización de un sistema *in vitro* para evaluación de sensibilidad a antiparasitarios de *Blastocystis spp.*

Que presenta el pasante: Daniel Martín Villafaña Becerra

Con número de cuenta: 310649584 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 31 de Octubre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes	
SECRETARIO	Q.F.B. Laura Gricelda Martínez Méndez	
1er. SUPLENTE	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	

A mis padres

Martín Villafaña Cabrera y Ruth Becerra Sánchez

Por todo el apoyo que me han brindado todos
estos años y por ayudarme a salir adelante.

A mi hermana

Carolina Sayuri Villafaña Becerra

Por toda la paciencia y el apoyo
brindado todo este tiempo.

A mi asesora

QFB. Laura Gricelda Martínez Méndez

Por la paciencia, tiempo y ayuda que me ha
brindado para la realización de este trabajo.

A mi coasesor

M. en C. Israel Parra Ortega

Por brindarme su asesoría y la oportunidad
de desarrollar este trabajo.

A mis sinodales

Por el tiempo dedicado a corregirme y
dar forma al trabajo.

A Erika Carolina Echeverría Toledo

Por todo su apoyo, motivación y cariño
que me ha brindado todos estos años.

A mis amigos y compañeros que me aportaron su
ayuda y apoyo para la realización de este trabajo.

Índice

Contenido

Índice de abreviaturas	6
Índice de figuras	10
Índice de tablas	10
Introducción	14
Marco teórico.....	15
Generalidades del parásito.....	15
Historia	15
Epidemiología.....	20
Características (estructura, morfología, bioquímica y genética)	24
Genética	38
Ciclo de vida	41
Patogenia.....	46
Signos y síntomas	67
Diagnóstico.....	70
Tratamiento.....	80
La falla en la erradicación del parásito	84
Objetivo General	87
Objetivos Particulares	87
Justificación	87
Hipótesis.....	88
Procedimiento Experimental.....	88
Material y Métodos.....	88
Diseño de Investigación.....	88
Procedimiento	90
Resultados:.....	94
Estandarización del medio de cultivo xénico Suero-Salino de Barret	94
Estructuras parasitarias observadas en los cultivos.....	100

Estandarización del sistema <i>in vitro</i> para evaluación de sensibilidad a metronidazol.....	110
Discusión	118
Conclusiones	126
Perspectivas	126
Referencias:.....	127

Índice de abreviaturas

ADH: Anemia por déficit de Hierro.

ADH3: Alcohol deshidrogenasa

ATP-Sintasa: Sintasa de Adenosín Trifosfato.

B. hominis: Blastocystis hominis.

B. ratti: Blastocystis ratti.

CCR: Cáncer colorrectal (Colorectal Cancer).

CDC: Centro de control y Prevención de enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention).

CIM: Concentración Mínima Inhibitoria.

ConA: *Canavalia ensiformis*

CPS: Examen coproparasitoscópico .

CU: Urticaria crónica (Chronic Urticaria).

Cyt C: Citocromo C.

DNA: Ácido Desoxirribonucléico.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Et al: Y otros.

FECT: Técnica de concentración de formol-acetato de etilo (Formalin ether concentration Technique)

GALT: Tejido linfoide asociado al intestino (Gut associated lymphoid tissue)

GI: Gastrointestinal.

GldA: Glicerol deshidrogenasa,

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (granulocyte/macrophage colony stimulating factor)

HPA: *Helix pomatia*.

IBD: Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Inflammatory Bowel Disease).

IBS: Síndrome del intestino irritable.

IEC-6: Células normales de epitelio de intestino delgado de *Rattus norvegicus*.

IFA: Ensayo de inmunofluorescencia Immunofluorescence assay ().

IFI: Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (Indirect Immunofluorescence assay).

IgA: Inmunoglobulina A.

IgE: Inmunoglobulina E.

IgG: Inmunoglobulina G.

IL-3: Interleucina 3.

IL-4: Interleucina 4.

IL-5: Interleucina 5.

IL_8: Interleucina 8.

IL-10: Interleucina 10.

IL-12: Interleucina 12.

IL-13: Interleucina 13.

In vitro: Experimento realizado dentro de un ambiente controlado o fuera de un organismo vivo.

In vivo: Experimento realizado dentro de un organismo vivo o en uno de sus tejidos.

Insertae sedis: Incapacidad para ubicar con exactitud un taxón.

LGT: Genes de transferencia lateral (Lateral Gene Transfer)

LPS: Lipopolisacárido.

µm: Micrómetro.

mg: Miligramo.

mL: Mililitro.

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B cells).

NK: Natural Killer (Linfocitos asesinos naturales).

NRPS: Péptido Sintasa no Ribosomal (Non Ribosomal Peptide Synthase).

PAR: Familia de Proteasas.

PAR-2: Proteasas tipo 2.

PCR: Reacción en Cadena de Polimerasa (Polymerase Chain Reaction).

PCR-RFLP: Reacción en cadena de polimerasa-polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism)

PCR-SSCP: Secuenciación por reacción en cadena polimerasa-polimorfismo de conformación de cadena simple (Polymerase Chain Reaction-Single-Strand Conformation Polymorphism).

pH: Potencial de Hidrógeno, medida para medir acidez o alcalinidad en una sustancia

PKS: Policétido Sintasa (Polyketyde Synthase)

RAPD: Amplificación Aleatoria de DNA Polimórfico (Random amplified polymorphic DNA).

RFLP: Polimorfismo de longitud del rfragmento de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism).

RNA: Ácido Ribonucléico.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute médium (Medio del Instituto Rosewall Park Memorial).

SCFA: Cadena corta de acidos grasos (Short-chain fatty acids)

SFB: Suero Fetal Bovino.

spp: Especies.

SSF: Solución Salina Fisiológica.

SS-rRNA: Small Subunit of ribosomal Ribonucleic Acid (Subunidad Pequeña del Ácido Ribonucléico ribosomal).

ST: Subtipos.

Th2: T-helper 2 (Linfocito T cooperador 2).

TMP-SMX: Trimetoprim-Sulfametoxasol.

TJ: Uniones estrechas (Tight junctions).

TNF-a: Factor de necrosis tumoral alfa.

TLR: Toll-Like Receptor (Receptor tipo toll).

Txndc12: Proteína contenedora de dominio tioredoxina 12 (thioredoxin-domain-containing protein 12)

VA: Formas Viables Apoptóticas.

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana.

v/v: Volumen / Volumen.

Índice de figuras

Figura 1.- Distintas fases en las que <i>Blastocystis</i> spp puede ser observado.....	20
Figura 2.- Formas Vacuolares de <i>Blastocystis</i> spp.....	23
Figura 3.- Forma granular de <i>Blastocystis</i> spp.....	24
Figura 4.- Formas ameboides de <i>Blastocystis</i> spp.....	25
Figura 5.- Tinción tricrómica y en lugol de <i>Blastocystis</i> spp en una muestra fecal.....	26
Figura 6.- Formas multivacuolares de <i>Blastocystis</i> spp.....	27
Figura 7.- Cultivo xénico de <i>Blastocystis</i> spp.....	28
Figura 8.- Tejido de hámster infectado de <i>Blastocystis</i> spp.....	28
Figura 9.- Formas vacuolares de <i>Blastocystis</i> spp en tinción tricrómica de Gomori.....	29
Figura 10.- Sedimento del medio de cultivo BDMM alternativo.....	29
Figura 11.- Quiste de <i>Blastocystis</i> spp, evidenciado con tinción tricrómica de Gomori.....	30
Figura 12.- Micrografías de <i>Blastocystis</i> spp de cultivo de laboratorio de Netsky stock.....	30
Figura 13.- Escaneo con microscopía electrónica de <i>Blastocystis</i> spp de cultivo de laboratorio Netsky stock.....	30
Figura 14.- Micrografía de transmisión electrónica de <i>Blastocystis</i> spp de muestras fecales frescas.....	31
Figura 15.- Micrografías de <i>Blastocystis</i> spp mostrando las estructuras internas del parásito.....	31
Figura 16.- Micrografía de transmisión electrónica de la forma vacuolar de <i>Blastocystis</i> spp de un cultivo de laboratorio	32
Figura 17.- Micrografía de transmisión electrónica de la forma ameboidea de <i>Blastocystis</i> spp stock BRIS/87/HEPU/1 de un cultivo de laboratorio.....	32
Figura 18.- Micrografía electrónica de barrido de la forma ameboidea de <i>Blastocystis</i> spp en un aislado sintomático.....	33
Figura 19.- Transmisión zoonótica de <i>Blastocystis</i> spp por ST.....	36
Figura 20.- Ciclo de vida de <i>Blastocystis</i> spp, propuesto por Alexeieff.....	39
Figura 21.- Ciclo de vida de <i>Blastocystis</i> spp, propuesto por Zierdt.....	40

Figura 22.- Esquematación modificada del ciclo de vida de <i>Blastocystis</i> spp	41
Figura 23.- Rash cutáneo de un paciente masculino de 36 años, diagnosticado con Blastocistosis crónica, adquirida domésticamente.....	54
Figura 24.- Modelo hipotético de mecanismos de patogenicidad de <i>Blastocystis</i> spp.....	58
Figura 25.- Mecanismos de patogenicidad de <i>Blastocystis</i> spp.....	59
Figura 26.- Efectos de estrés en infección por <i>Blastocystis</i> spp.....	60
Figura 27.- Comparación entre ooquistes de <i>Cyclospora cayetanensis</i> y formas vacuolares de <i>Blastocystis</i> spp.....	69
Figura 28.- Estructura del Metronidazol.....	77
Figura 29.- Gráfica del desarrollo de <i>Blastocystis</i> spp en medio de cultivo vs concentración de SFB.....	93
Figura 30.- Gráfica del desarrollo de <i>Blastocystis</i> spp en medio de cultivo vs concentración de SFB en escala logarítmica.....	93
Figura 31.- Gráfica de valores estadísticos del desarrollo de <i>Blastocystis</i> spp a diferentes concentraciones de SFB.....	94
Figura 32.- Gráfica de valores estadísticos del desarrollo de <i>Blastocystis</i> spp a diferentes concentraciones de SFB en escala logarítmica.....	95
Figura 33.- <i>Blastocystis</i> spp obtenidos a partir del medio de cultivo propuesto.....	96
Figura 34.- <i>Blastocystis</i> spp con tinción de eosina y lugol.....	96
Figura 35.- Formas vacuolares de <i>Blastocystis</i> spp en asociación.....	97
Figura 36.- Formas reproductivas de <i>Blastocystis</i> spp.....	97
Figura 37.- Formas de <i>Blastocystis</i> spp en la última etapa de reproducción por fisión binaria.....	98
Figura 38.- Conteo en hemocitómetro de formas vacuolares de <i>Blastocystis</i> spp.....	98
Figura 39.- Evaluación microscópica cualitativa del desarrollo de formas de <i>Blastocystis</i> spp entre 10 y 20 células por campo.....	98
Figura 40.- Formas vacuolares de <i>Blastocystis</i> spp con tinciones de lugol y eosina.....	99

Figura 41.- Formas de <i>Blastocystis</i> spp de gran tamaño.....	99
Figura 42.- Formas vacuolares de <i>Blastocystis</i> spp observadas con tinción de lugol y eosina.....	100
Figura 43.- Formas multivacuolares de <i>Blastocystis</i> spp.....	100
Figura 44.- Vacuolas de diversos tamaños, señaladas con una flecha.....	101
Figura 45.- Formas vacuolares de <i>Blastocystis</i> spp a diferentes aumentos.....	101
Figura 46.- Formas multivacuolares de <i>Blastocystis</i> spp obtenidas de cultivo.....	102
Figura 47.- Formas multivacuolares de <i>Blastocystis</i> spp con diferentes vacuolas.....	102
Figura 48.- Formas multivacuolares.....	103
Figura 49.- Comparación entre dos formas multivacuolares.....	103
Figura 50.- Formas de granulares de <i>Blastocystis</i> spp.....	104
Figura 51.- Formas granulares.....	104
Figura 52.- Formas granulares de <i>Blastocystis</i> spp a 100x.....	105
Figura 53.- Formas ameboides de <i>Blastocystis</i> spp.....	105
Figura 54.- Diversas formas ameboides de <i>Blatocystis</i> spp.....	106
Figura 55.- Gráfica del desarrollo de organismos parasitarios contra concentración de Metronidazol.....	111
Figura 56.- Gráfica del desarrollo de organismos parasitarios contra concentración de Metronidazol en escala logarítmica.....	112
Figura 57.- Gráfica de los datos estadísticos del desarrollo de organismos parasitarios contra concentración de Metronidazol.....	113
Figura 58.- Gráfica de los datos estadísticos del desarrollo de organismos parasitarios contra concentración de Metronidazol en escala logarítmica.....	113

Índice de tablas

Tabla 1.- Características comparativas de <i>Blastocystis</i> spp con levaduras.....	12
Tabla 2.- ST de <i>Blastocystis</i> spp de origen humano según el país de aislamiento.....	17
Tabla 3.- Características morfológicas de <i>Blastocystis</i> spp.....	33
Tabla 4.- ST de <i>Blastocystis</i> spp en animales.....	35
Tabla 5.- Concentración de suero fetal bovino para medio de cultivo de <i>Blastocystis</i> spp.....	86
Tabla 6.- Matriz de reactivos para cultivo de prueba de susceptibilidad de <i>Blastocystis</i> spp.....	88
Tabla 7.- Resultados de la evolución cuantitativa del desarrollo de <i>Blastocystis</i> spp en el medio de cultivo a diferentes concentraciones de SFB.....	91
Tabla 8.- Datos estadísticos de los resultados de la evaluación cuantitativa de desarrollo de <i>Blastocystis</i> spp en el medio de cultivo a diferentes concentraciones de SFB.....	94
Tabla 9.- Evaluación cuantitativa del desarrollo de cultivos de <i>Blastocystis</i> spp en diferentes concentraciones de Metronidazol.....	106
Tabla 10.- Datos estadísticos de la Evaluación cuantitativa del desarrollo de cultivos de <i>Blastocystis</i> en diferentes concentraciones de Metronidazol.....	111
Tabla 11.- Datos estadísticos del desarrollo de organismos parasitarios contra concentración de Metronidazol.....	112
Tabla 12.- Estadística descriptiva del desarrollo de <i>Blastocystis</i> spp a diferentes concentraciones de SFB.....	116
Tabla 13.- Estadística descriptiva del desarrollo de organismos parasitarios contra concentración de Metronidazol.....	119

Introducción

Las parasitosis intestinales son un problema de salud pública que se ha mantenido vigente hasta el día de hoy, debido a las condiciones económicas y sociales que prevalecen en el país y que facilitan su transmisión por mecanismos como el fecalismo o la falta de aseo personal. En México y en otros países, uno de los parásitos que con más frecuencia se identifica es *Blastocystis hominis*, el cual ha despertado una gran controversia sobre su carácter patógeno; actualmente se le reconoce como causante de cuadros gastrointestinales, aunque el ciclo biológico, los mecanismos de patogenicidad y su sensibilidad a los antiparasitarios aún se siguen discutiendo ampliamente. Es entonces de suma importancia su correcto diagnóstico por el laboratorio, así como el estudio de este parásito que contribuya al conocimiento de su biología.

Es importante mencionar que, durante muchos años, *Blastocystis* se consideró como parte de la microbiota normal del colon; aunque recientemente se ha visto relacionado con diferentes entidades que afectan al tracto gastrointestinal (GI) tales como diarrea crónica, dolor abdominal crónico, síndrome de intestino irritable, intolerancia a la lactosa y alteraciones del estado nutricional en niños. Además, también se ha relacionado con enfermedades alérgicas tales como urticaria, rinitis alérgica, angioedema y asma.¹

Marco teórico

Generalidades del parásito

Historia

Blastocystis hominis, actualmente conocido como *Blastocystis* spp, es un parásito anaerobio, cosmopolita, eucarionte, pleomórfico que habita el tracto gastrointestinal de los humanos y otras especies, con alto grado de transmisión zoonótica.^{2,3,4} Se encuentra distribuido a nivel global, infectando a más de 1000 millones de personas en el mundo. Es considerado uno de los organismos reportados con mayor frecuencia en los exámenes coproparasitológicos (0.8 a 61.8%), siendo el agente infeccioso de más alta prevalencia en zonas tropicales y subtropicales, principalmente en países en vías de desarrollo.^{5, 6, 7}

Este parásito, agente etiológico de la blastocistosis o enfermedad de Zierdt-Garavelli (como también se le conoce en honor a dos de los investigadores que más han estudiado al parásito), es un organismo unicelular anaerobio estricto que fue descrito por primera vez en 1849 por Brittain y Swayne, ambos de manera independiente uno del otro; esto ocurrió mientras estudiaban una epidemia de cólera en Londres, identificándolo erróneamente como un agente causal del cólera.⁸

Este microorganismo eucarionte simple anaerobio fue descrito y clasificado por primera vez a comienzos del siglo XX por Alexeieff (1911), dándole el nombre de *Blastocystis enterocola* (considerando que no era un quiste de “*Trichomona intestinalis*” como previamente se le había denominado), y lo catalogó como una levadura (*Ascomycete*) al observar estructuras que se asemejaban a este grupo de hongos.⁹

La especie “*hominis*” fue sugerida por Emile Brumpt en ese mismo año, aunque igualmente lo consideró “una levadura intestinal inocua” en heces humanas.² Con el paso de los años, ha pasado de ser considerado hongo imperfecto, levadura, flagelado, vegetal o protista intracelular, siendo modificada su clasificación constantemente.⁵

Tabla 1.- Características comparativas de *Blastocystis* spp con levaduras.¹⁰

<i>Blastocystis</i> spp.	LEVADURA TÍPICA
No presenta pared celular: el organismo está rodeado solo por una membrana delgada, capaz de formar vesículas micropinocíticas.	Presenta pared celular, los nutrientes son transferidos por difusión.
Crece <i>in vitro</i> solo en cultivo mixto con bacterias.	Crece <i>in vitro</i> en ausencia de bacterias.
No crece en medios de cultivo para hongos.	Crece en medio de cultivo para hongos.
Tiene preferencia por pH neutro o ligeramente alcalino.	Prefiere pH ácido y es muy resistente a pH bajo.
No hay evidencia de formaciones miceliales o de gemación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	Forma brotes <i>in vivo</i> y produce micelio <i>in vitro</i> .
Se reproduce por fisión binaria, múltiple, plasmotomía, esquizogonia y endodiogenia	Se reproduce por gemación, fragmentación y esporulación o ambas
Presenta extensión y retracción de pseudópodos no móviles.	No forma pseudópodos.
Ingiere bacterias y otros materiales particulados.	No ingiere materiales particulados.
Temperatura óptima de crecimiento, 37°C. No crece a temperatura ambiente	Temperatura óptima de crecimiento menor a 37°C. Crece bien a temperatura ambiente
Puede morir a 4°C en medio ligeramente hipotónico e hipertónico.	Resiste la temperatura de 4°C y los medios ligeramente hipotónicos e hipertónicos.

Tomado de Vargas-Sánchez, G.; Romero Valdovinos, M.; Ramírez-Guerrero, C.; Vargas-Hernández, I.; Ramírez-Miranda, M.; Martínez-Ocaña, J.; Valadez, A.; Ximénez, C. López-Escamilla, E.; Hernández-Campos, M.; Villalobos, G.; Martínez-Hernández, F.; Maravilla, P. (2015). *Blastocystis* Isolates from Patients with Irritable Bowel Syndrome and from Asymptomatic Carriers Exhibit Similar Parasitological Loads, but Significantly Different Generation Times and Genetic Variability across Multiple Subtypes. PLoS ONE 10(4): e0124006.

Desde su descubrimiento, fueron apareciendo reportes esporádicos acerca de su implicación en infecciones gastrointestinales, siendo identificado solamente bajo el microscopio para un diagnóstico diferencial y evitar confundirlo con *Entamoeba histolytica/dispar*. A finales de la década de los años 60, se produjo un nuevo interés por su estudio, especialmente a nivel biomédico; basándose en características morfológicas, fisiológicas y de cultivo, se describió a *Blastocystis* como un protozooario con potencial

patógeno. Dada su aparente naturaleza de protozoo, se le clasificó como esporozoario; pero al descubrirse que poseía pseudópodos y podía dividirse por fisión binaria, se le reclasificó en el subphylum *Sarcodina* (amibas), creándose el suborden *Blastocystina* dentro del orden *Amoebida*. Posteriormente, la identificación de endodiogenia y fisión múltiple como formas de reproducción, permitió su inclusión en el Phylum *Apicomplexa*, y la creación del subphylum *Blastocysta*.⁹

Un debate en 1990 entre médicos estadounidenses puso en evidencia una falta de información a nivel histórico al identificar a *Blastocystis* como agente patógeno; se sugirió que la mejora de los síntomas en pacientes enfermos se debía al uso de antiparasitarios, que atacaban a un agente patógeno no identificado, desacreditando a *Blastocystis* como agente causal. A pesar de estas objeciones, la comunidad clínica ha seguido diagnosticando y tratando la infección, incluso sabiendo que la patogenicidad de *Blastocystis* sigue siendo controversial.¹¹ En 1991, Zierdt y colaboradores reclasificaron al parásito en el reino protista a partir de sus características morfológicas.⁶

Al analizar datos de endoscopia y biopsia, *Garavelli et al (1991)* indicaron que *Blastocystis* spp no invade la mucosa del colon en humanos y sugirieron que la infección por este microorganismo depende de la interacción entre el sistema inmune. Propusieron una acción tóxico-alérgica, que daría lugar a una inflamación inespecífica y edema de la mucosa colónica. En contraste con estos resultados, ha habido varios casos clínicos que reportan ulceraciones colónicas determinadas por colonoscopia y biopsia, en donde sólo se encuentra a *Blastocystis* spp en las úlceras superficiales y en el infiltrado de la superficie de la lámina propia y en los espacios glandulares, lo que podría desmentir la afirmación que hizo *Garavelli et al*.¹²

En 1993, Boreham y Stenzel resaltaron la necesidad de complementar los estudios taxonómicos y sistemáticos basados en la morfología de *Blastocystis* spp con los de tipo molecular. Estos estudios comenzaron a realizarse en los años 90 con el advenimiento y auge de las herramientas moleculares basadas en la tecnología de ácidos nucleicos. Utilizando el gen de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (18SS-rRNA) se evidenció, en primer lugar que "*B. hominis*" era ciertamente un *Insertae sedis* (incapacidad para

ubicar aun taxón), al no detectarse relaciones monofiléticas con ninguno de los parásitos intestinales del grupo de eucariotas simples, considerados tradicionalmente como protozoarios; además se comprobó que no se trataba de un hongo y que se encuentra más relacionado filogenéticamente con el grupo de los *Stramenopila* o *Heterokonta* (Reino Chromista) pese a que no posee mitocondrias (*B. hominis* es un anaerobio estricto) ni presenta flagelos; por lo que se trata de un taxón heterogéneo y complejo de organismos heterótrofos y fotosintéticos, unicelulares y multicelulares que incluyen, entre otros, a las algas pardas, diatomeas, crisofitas, etc. Hasta ahora se ha reportado que *Blastocystis* spp, junto con *Pythium insidiosum* y *Phytium aphanidermatum*, serían los únicos microorganismos chromistas o estramenopilas patógenos en humanos; siendo que *P.insidiosum* es el agente de la pitiosis o cáncer de los pantanos, así como *P.aphanidermatum* ha registrado infección en heridas.^{9, 13} Más recientemente los estudios de *Arisue et al. (2002)* y *Noël et al. (2003)* confirman la inclusión de *B. hominis* en este grupo. Cavalier-Smith sugiere en 1998 la siguiente clasificación taxonómica: Reino *Chromista*, Subreino *Chromotopia*, Infrareino *Heterokonta* o *Stramenopila*, Subphylum *Obalinata*, Clase *Blastocystea*, Género *Blastocystis*.¹²

Chen et al. (2003), a través de un análisis multivariado, revelaron que la infección crónica con hepatitis B, fue una condición predisponente a la adquisición de *Blastocystis* spp. También se constató que en pacientes con diabetes, carcinoma, lupus eritematoso o con cirrosis alcohólica infectados con *Blastocystis* spp., los síntomas fueron más severos.¹⁴

En 2009, *Irikov et al* también propusieron clasificar a este organismo en un sexto reino aparte, llamado *Chromista*, (también denominado *Stramenopila*) al cual pertenece el súper grupo *Chromalveolata*, organismos que como característica tienen la ausencia de flagelos, ser anaeróbicos, poseer estructuras tipo mitocondria que carecen de las enzimas que llevan a cabo la respiración aeróbica y presentar dos o más núcleos.¹⁴ Hasta hace poco, la taxonomía para las especies de *Blastocystis* se había basado en el hospedero del que se aislaba (*B. hominis* de humanos, *B. ratti* de ratas, entre otros.); pero gracias a la contribución de estudios filogenéticos, se ha logrado identificar la ausencia de especificidad del hospedero para *B. hominis*, *B. ratti* y otros; además de que otras

especies de *Blastocystis* son morfológicamente iguales a *B. hominis*; por lo tanto, propusieron resumir el nombre como *Blastocystis* spp.^{2, 3, 15}

Así, se uniforma la información de los subtipos previamente descritos, concluyendo en la existencia de 9 subtipos (ST) que infectan a humanos y proponiendo la eliminación del término "*Blastocystis hominis*", dando paso al uso del término *Blastocystis* spp, seguido del número de subtipo que se está reportando en toda muestra aislada de aves y mamíferos. El término "subtipo" reemplaza a otros términos aparecidos en literatura en lengua Inglesa tales como Clade, ribodeme, subgroup y cluster.¹⁶ La clasificación taxonómica de *Blastocystis* aceptada actualmente, basada en el análisis del gen de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSU-rRNA) es: Clase: *Blastocystiea*; Phylum: *Heterokondophyta*; Subphylum: *Obalinata*; infrareino: *Heterkonda*, subreino: *Chromotopia*; y reino: *Chromista* (sinónimo de *Estramenopila*).^{3, 17}

Epidemiología

Blastocystis spp es un parásito ubicuo y su prevalencia varía entre regiones y países, así como en diferentes grupos sociales de la población mundial. La infección por este parásito está determinada por condiciones climáticas, socioeconómicas e incluso por el área geográfica.¹⁶ La población de países en vías de desarrollo presenta una mayor prevalencia del parásito debido a condiciones deficientes de higiene, así como el consumo de agua y alimentos contaminados. Esto es notorio principalmente en áreas tropicales y subtropicales. A pesar de esto, debido a la amplia distribución geográfica que tiene este parásito, puede ser encontrado en países desarrollados.²

Las frecuencias de infección notificadas en la literatura varían de país a país, dependiendo de las condiciones socioeconómicas de los grupos en los cuales se realiza el estudio. Se han reportado prevalencias de 6.9% en el Reino Unido; 6.7% en Libia; 53.8% en Zambia; en Hamilton, Canadá, 8%; Estados Unidos (en pacientes con VIH), 2.4%; Arabia Saudita, 13.9%; Irán, 23.6%; Tailandia, 4-60%; Chipre del Norte, 10.5-27.8%; Irlanda, 3%; Italia (en pacientes con VIH), 10.77%; Jordania, 20.3%; Brasil, 34-38%; Chile, 36-64%; Argentina, 15.7-44%; Hamburgo (en pacientes con VIH), 38%; Japón (en residentes y en ciudadanos no japoneses) 0.5% y 7.5%, respectivamente; Indonesia, 34.4%; España, 7.03%; Turquía, 0.5-15.24%; y en soldados que retornan de misiones de paz en Irán y Afganistán, 15.3%; en México, se han reportado frecuencias que van de 2.0% a 41.7%.²⁰

En pacientes inmunodeficientes, se ha reportado con relativa frecuencia, tanto en los que presentan VIH, como en los pacientes que sufren de enfermedades crónico-degenerativas. Hay que destacar que también se le señala como la parasitosis de mayor distribución en Latinoamérica.^{3, 14}

Tabla 2. ST de *Blastocystis* spp de origen humano según país de aislamiento.^{5,19}

País	ST
<i>América</i>	
Brasil	ST1, ST2, ST3
Colombia	ST1, ST2, ST3
Estados Unidos	ST1, ST3
<i>Europa</i>	
Alemania	ST1, ST2, ST3, ST4
Dinamarca	ST1, ST2, ST3, ST4, ST6, ST7, ST8, ST9
España	ST1, ST2, ST4
Francia	ST1, ST2, ST3, ST4, ST6, ST7
Grecia	ST1, ST2, ST3, ST4, ST6, ST7
Irlanda	ST1, ST2, ST3, ST4
Italia	ST1, ST2, ST3, ST4, ST7, ST8
Reino Unido	ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6, ST7, ST8
Suecia	ST1, ST2, ST3, ST4, ST7
<i>África</i>	
Egipto	ST1, ST2, ST3, ST6, ST7
Liberia	ST1, ST2, ST3, ST4
Nigeria	ST1, ST3, ST4
Tanzania	ST1, ST2, ST3
<i>Asia</i>	
Bangladesh	ST1, ST3
China	ST1, ST2, ST3, ST4, ST6, ST7
Japón	ST1, ST2, ST3, ST4, ST6, ST7, ST9
Irán	ST1, ST2, ST3, ST7
Libia	ST1, ST2, ST3, ST7
Malasia	ST1, ST2, ST3, ST6, ST7, ST9
Nepal	ST1, ST2, ST3, ST6, ST7
Pakistán	ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6, ST7
Turquía	ST1, ST2, ST3, ST4
<i>Oceanía</i>	
Australia	ST1, ST2, ST3, ST4, ST6, ST7, ST8

Se ha reportado una mayor prevalencia en adultos comparada con niños en una serie de estudios, especialmente en adultos jóvenes. Entre los factores asociados a la infección, se ha reportado que *Blastocystis* spp predomina más en mujeres, aunque también se ha encontrado que *Blastocystis* spp se encuentra asociado al género masculino, por lo que puede que no exista una diferencia significativa en este aspecto.²⁰ Otro factor estudiado es la asociación de *Blastocystis* spp con otras especies comensales (*Endolimax nana* y *Entamoeba coli*); el historial de un paciente con infecciones parasitarias previas parece ser un buen indicativo para detectar la infección por *Blastocystis* spp.²¹

Actualmente, *Blastocystis* spp es considerado como un parásito emergente a pesar de que, desde 1899, Perroncito lo asoció con enfermedad intestinal. En niños mexicanos la mayor frecuencia de infección por parásitos intestinales está encabezada por *Blastocystis* spp, y su capacidad para producir enfermedad es controvertida; ya que se ha encontrado tanto en niños sanos como en pacientes con manifestaciones gastrointestinales como diarrea, dolor y distensión abdominal.²² No hay suficientes estudios epidemiológicos dirigidos para *Blastocystis*, por lo que falta información sobre esta parasitosis. Entre los estudios que se han hecho, se sabe que predominan los ST 1, 2 y 3.²³

De acuerdo a algunos investigadores, *Blastocystis* spp es actualmente el parásito predominante en heces de humanos; desplazando a otros parásitos protozoarios debido a la falta de tratamiento, ya que los síntomas de su infección son auto-limitantes. Asimismo, se han reportado algunos casos de resistencia a antiparasitarios, en donde después de un tratamiento convencional, los nichos intestinales pueden ser fácilmente colonizados por *Blastocystis* spp, al no tener competencia con la microbiota. Similar a otros parásitos protozoarios intestinales, la presencia de una deficiencia en la higiene y la falta de programas de educación sanitaria aumentan la prevalencia de este parásito.²⁴

Las condiciones socioeconómicas, el compromiso inmunológico, la inmigración, la calidad del agua potable y para beber, la exposición a alimentos contaminados y la higiene personal deficiente son los principales factores de riesgo asociados a la infección.

Igualmente, los individuos en contacto cercano con animales también son una población de riesgo, debido a la zoonosis que presenta este organismo.⁵

Se ha visto una relación entre las estaciones del año y la prevalencia de infección en *Blastocystis*. Un estudio realizado en Estados Unidos mostró un aumento en el número de casos reportados de Blastocistosis en el periodo entre julio y octubre, en un lapso de 4 años.²⁵ En Malasia, se hizo el aislamiento de ST1-4, siendo el ST3 el más predominante en temporadas cálidas y secas.²⁶ Otro estudio del mismo país demostró que, en aislamientos del parásito de diferentes cuerpos de agua, hay mayor supervivencia en temporadas húmedas, por lo que concluyen que las temporadas tienen un rol importante en la ocurrencia y supervivencia del parásito.²⁷ Asimismo, un estudio publicado por Mohamed et al en 2010 concluyó que la blastocistosis está posiblemente relacionada con las condiciones climatológicas, siendo esta más común en climas cálidos o en temporada de verano.²⁸

Características (estructura, morfología, bioquímica y genética)

Estructura

Como ya se mencionó anteriormente, *Blastocystis* spp es un parásito anaerobio estricto. Cuando se expone a bajas concentraciones de oxígeno y aun a la desecación, la membrana celular de la forma vacuolar se colapsa y forma apéndices filamentosos dando una forma dendrítica.²¹ Está recubierto por una cápsula de espesor variable, que cumple con funciones de adherencia y de nutrición celular. Puede mostrar una variación en el número de núcleos que presenta, llegando a tener de 2 a 7 núcleos, dependiendo de la forma parasitaria que se estudie.⁵

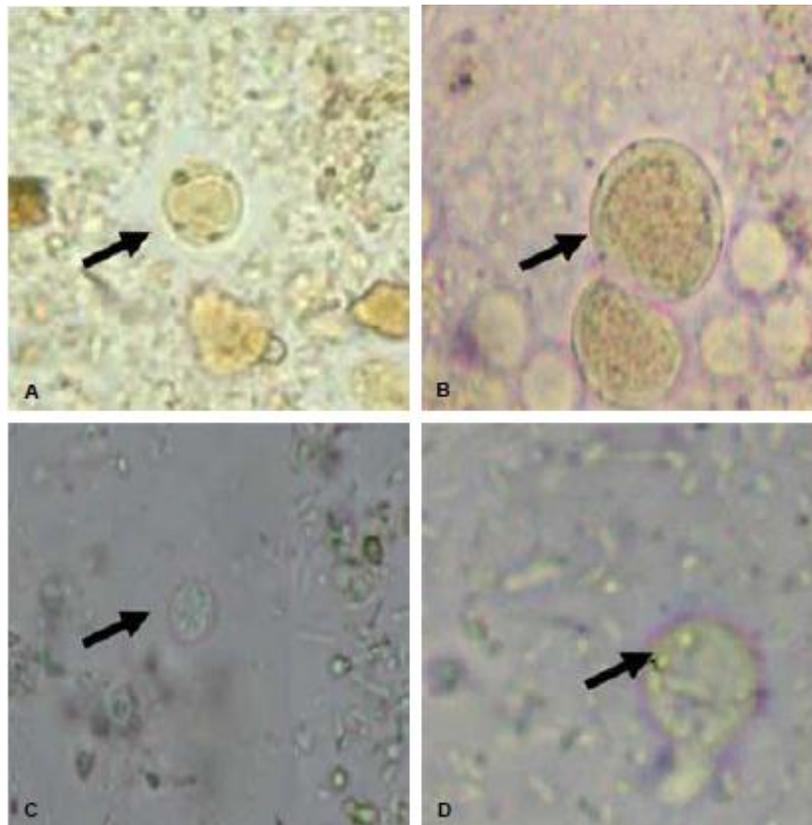


Figura 1.- Distintas fases en las que *Blastocystis* spp puede ser observado. A) Vacuolar, hallado más frecuentemente en heces; b) Granular; C) Quiste: la fase infectante; D) Ameboide: no móvil. Tomado de Vichido-Luna, M.; Toro-Monrajaz, E.; Montijo-Barrios, E.; Huante-Anaya, A.; Cervantes-Bustamante, R.; Ramírez-Mayans, J. (2016). *Blastocystis hominis*, un agente patógeno controversial en la génesis de enfermedades gastrointestinales y alérgicas. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 25 (3), pp 78-83

Blastocystis spp presenta variaciones en tamaño, estructura y morfología: vacuolar, multivacuolar, avacuolar, granular, ameboide y quística.¹⁷ Puede desarrollarse en medios de cultivo *in vitro*, requiriendo la presencia de bacterias para su desarrollo, a menos que se realicen cultivos axénicos cuidadosamente controlados, en donde haya suficientes nutrientes para su subsistencia. No se desarrolla en medios de cultivo comunes para hongos o bacterias; y generalmente no hay crecimiento en la superficie de medios sólidos convencionales. Crece a pH neutro y temperatura óptima de 24°C a 37°C, no hay desarrollo. Resiste elevadas concentraciones de anfotericina B y puede ingerir bacterias y material particulado.³⁰

Sus organelos intracelulares se encuentran involucrados en diferentes rutas metabólicas (Metabolismo de aminoácidos, biogénesis de hierro y azufre, y el ciclo del ácido tricarboxílico). Este organismo es capaz de sintetizar fosfolípidos celulares esenciales y los acumula generalmente en vacuolas.² Las enzimas reportadas en *Blastocystis* spp son la diaforasa, lactato deshidrogenasa, aldolasa y fosfatasa alcalina.²⁹

Presenta organelos tipo mitocondria y el aparato de Golgi, los cuales se encuentran distribuidos periféricamente en el citoplasma. Los organelos tipo mitocondria tienen una morfología semejante a rosetas, encontrándose alrededor del núcleo. La vacuola central puede contener carbohidratos, lípidos y proteínas básicas con funciones de reserva o de multiplicación celular. Estas son almacenadas por acción del aparato de Golgi y por endocitosis mediada por la proteína clatrina, receptora de lipoproteínas. Se ha mostrado que posee una cubierta fibrilar de espesor variable que contiene proteínas y carbohidratos como manosa, glucosa, fucosa, N-acetilglucosamina, quitina y ácido siálico.^{14, 29, 31}

Los organelos tipo mitocondria (Mithocondria-like organelles) tienen una importancia elevada en este parásito, a la vez que son fuente de controversia entre investigadores. Han llegado a ser considerados mitocondrias, a pesar de que no se han detectado citocromos importantes. Aún así, el consenso general dicta que estas estructuras no son mitocondrias como tal. En un artículo de *Nasedureen et al*, sugieren que estos organelos son en realidad hidrogenosomas, un tipo de organelos generadores de energía en

microorganismos anaerobios, que no contienen citocromos pero que producen hidrógeno molecular.³² En otro estudio de Wawrzyniak et al se observó la ausencia de genes que codifican para los complejos ubiquinol:citocromo c oxidasa (complejo III), el complejo citocromo c oxidasa (complejo IV) o el complejo ATP sintasa (complejo V), encontraron un módulo de deshidrogenada responsable de la oxidación de NADH, un módulo de hidrogenasa para guiar electrones liberados, un traslocador de protones o módulo de transporte, así como las cuatro unidades del complejo succinato deshidrogenada. En ese trabajo llegaron a la conclusión de que los organelos tipo mitocondria se trataban de mitocondria a pesar de carecer de citocromos y citocromo oxidasa.⁴⁵

Morfológicamente muestra una elevada tasa de polimorfismos y variaciones diversas tanto *in vivo* como *in vitro*.⁴ Su genoma está compuesto por una molécula de DNA circular, altamente conservado entre los distintos ST. Este codifica para varias proteínas mitocondriales, que servirán para sus procesos de respiración y metabolismo, pero no contiene los genes de las enzimas mitocondriales citocromo-oxidasa y ATP-sintasa, por lo cual no se consideran propiamente mitocondrias. Estas estructuras de doble membrana son conocidas como tipo-mitocondrias.⁵

El tiempo promedio de vida de *Blastocystis* spp es de 17-22 h, aunque esto depende mucho del medio en el que se encuentre. Se sugiere que el tiempo de generación también puede diferir, dependiendo del tipo de ST del que se trate. Este microorganismo puede entrar en apoptosis al ser expuesto a condiciones extremas (ej. Cambios de temperatura, exposición a antiparasitarios, entre otros.); este fenómeno podría servir también como un mecanismo de respuesta dirigido a incrementar el número de células viables en estas condiciones (esquizogonia).¹⁷

Morfología

Las diferentes formas que puede tomar *Blastocystis* son las siguientes:

-Forma vacuolar. Esta forma de *Blastocystis* spp ha sido considerada como la forma clásica de este parásito y es la más frecuentemente encontrada en heces de pacientes infectados. En esta fase, la estructura del parásito es esférica y contiene un cuerpo central, que es una vacuola grande que ocupa aproximadamente un 90% de la célula; así como una pared delgada de citoplasma periférico situada inmediatamente debajo de la membrana celular. El núcleo puede encontrarse distribuido en la periferia del citoplasma. Puede haber hasta siete núcleos en el citoplasma, pero generalmente solo se encuentran dos, distribuidos en polos opuestos de la célula. Las formas vacuolares pueden presentarse en diferentes tamaños de 3 a 120 μm , aunque generalmente su promedio es de 5-15 μm , llegando a alcanzar 200 μm de diámetro.^{14, 29}



Figura 2.- Formas vacuolares de *Blastocystis* spp. Tomado de .- Barua, P.; Khanum, H.; Haque, R.; Najib, F.; Kabir M. (2015). Establishment of *Blastocystis hominis* in-vitro Culture Using Fecal Samples from Infants in Slum Area of Mirpur, Dhaka, Bangladesh. *Acta Medica International*, 2 (1), pp: 40-46; y Zerpa-Larrauri, R.; Náquira-Velarde, C.; Escobar-Chuquiray, J. (2014). Innumerables formas de *Blastocystis hominis* en heces y cultivo en imágenes bi y tridimensionales. *Peruvian journal of Parasitology*, 22(1-2), pp: 29-32.

Forma granular. Tiene una ultraestructura similar a la forma vacuolar, pero con variantes morfológicas y citoquímicas a manera de gránulos, los cuales están contenidos dentro del citoplasma, en la vacuola central y usualmente situados al centro. Estas granulaciones presentan varias actividades y se pueden clasificar en tres grupos: metabólicos, reproductivos y lipídicos. Los gránulos reproductivos están contenidos en la vacuola central; los gránulos metabólicos se encuentran situados en el citoplasma; y los gránulos lipídicos también se encuentran situados en la vacuola central. Se especula que los gránulos reproductivos tienen un papel importante en la reproducción por esquizogonia.²¹

La forma granular presenta generalmente dos núcleos en el citoplasma; estos tienen un diámetro más pequeño a comparación de las formas vacuolares, pudiendo llegar a medir entre 6 y 8 μm , hasta llegar a los 28.3 μm , encontrándose con mayor frecuencia en cultivos más viejos o que presentan alguna alteración en su composición, y en cultivos tratados con antiparasitarios. Debido a esto, algunos autores han formulado la hipótesis de que su existencia es un indicativo de muerte celular.^{16, 18}

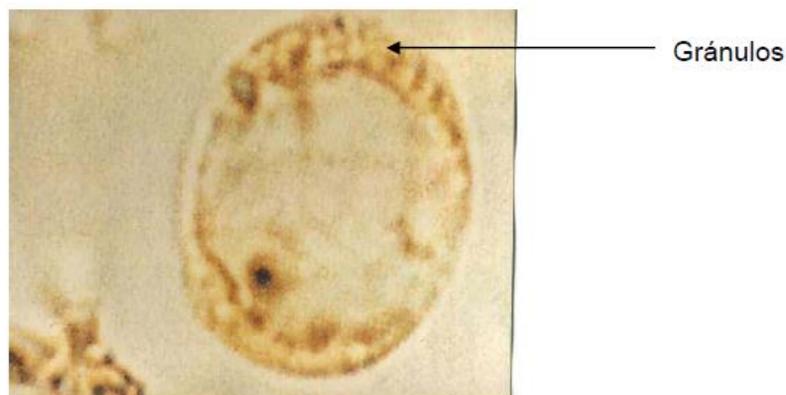


Figura 3.- Forma granular de *Blastocystis* spp. Tomado de Aguirre, A. (2003). Aportaciones sobre la ultraestructura de *Blastocystis hominis*. Ensayo Bibliográfico. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.

Forma ameboide. Esta estructura es la más difícil de observar. Se encuentra como una forma irregular, generalmente con 1 a 2 pseudópodos (siendo inmóvil a pesar de esto), con habilidades de adhesión considerables que le permiten adherirse a la mucosa intestinal. Su tamaño puede variar de 2.6-7.8 μm de diámetro. Los pseudópodos que presenta le permiten fagocitar bacterias. Contiene una vacuola grande en su citoplasma; esta forma puede pasar a la fase de quiste. La presencia de partículas ingeridas sugiere que tiene un papel relevante en la nutrición del parásito (bacterias, detritus, entre otros). Debido a la gran semejanza que tiene con neutrófilos y macrófagos, esta forma puede pasar desapercibida en una revisión rutinaria en heces. Se encuentra comúnmente en individuos con problemas del tracto digestivo (infecciones) y en cultivos, indicando el potencial patogénico de esta fase de *Blastocystis* spp. Ha sido detectada en cultivos viejos o tratados con antibióticos, ocasionalmente en muestras fecales. La forma ameboide es el fenotipo más virulento del parásito.^{14, 29,34}



Figura 4.- Formas ameboides de *Blastocystis* spp. Tomado de Casero, R.; Mongi, F.; Sánchez, A.; Ramírez, J. (2015) *Blastocystis* and urticaria: Examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. *J. Acta Tropica*, 148, pp156-161; y Zerpa-Larrauri, R.; Náquira-Velarde, C.; Escobar-Chuquiray, J. (2014). Innumerables formas de *Blastocystis hominis* en heces y cultivo en imágenes bi y tridimensionales. *Peruvian journal of parasitology*, 22(1-2), pp: 29-32.

Forma quística. En esta fase los parásitos son redondos u ovals y con dimensiones pequeñas (3-6 μm hasta 10 μm). Estas formas tienen una pared de multicapas delgada, con o sin una envoltura superficial. Su citoplasma condensado tiene varios organelos tipo mitocondria y vacuolas de almacenamiento. El número de núcleos que presenta va de uno a cuatro, aunque frecuentemente solo presentan dos. Se dice que esta forma es la fase de resistencia del parásito y es una de las formas que se identifican en muestras de heces. Un quiste puede sobrevivir alrededor de un mes expuesto al aire y a una temperatura de 25°C, permitiendo la diseminación de la infección, lo que representa la fase infectante para el humano. Generalmente, una elevada cantidad de quistes es un indicativo de una gran cantidad de trofozoitos (que se han revertido para convertirse en quistes) en el tracto intestinal, multiplicándose continuamente a través de fisión binaria. Además de esto, un aumento en el recuento de quistes se ha asociado con la capacidad de proliferación de un parásito, escapando de la respuesta inmune del hospedero. Algunos muestran correlación entre el número de quistes con el grado de virulencia.^{14, 35, 36}

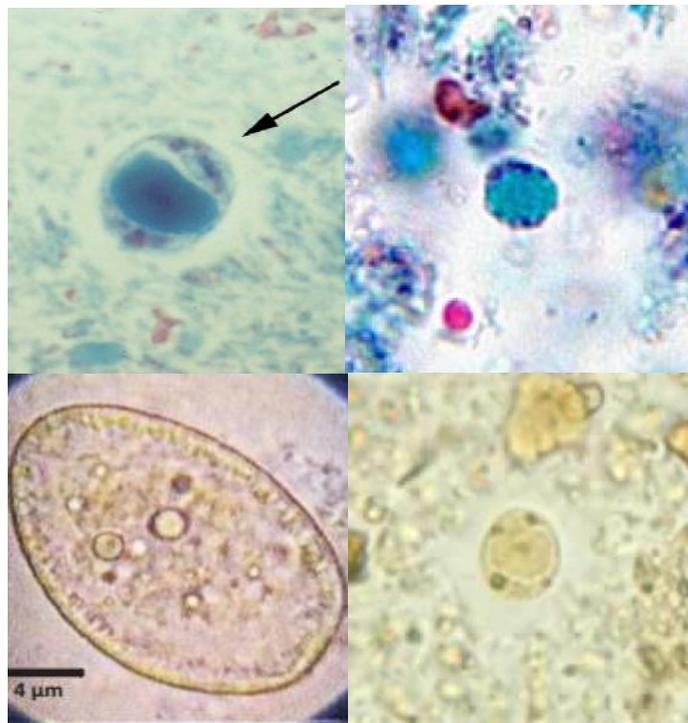


Figura 5.-Tinción tricómica (arriba) y en lugol (abajo) mostrando formas quísticas de *Blastocystis* spp en una muestra fecal. Tomado de: Coyle, C.; Varughese, J.; Weiss, L.; Tanowitz, H, (2011) *Blastocystis*: To Treat or Not to Treat... *Clinical Infectious Diseases*, 54 (1), pp: 105-110; Barua, P.; Khanum, H.; Haque, R.; Najib, F.; Kabir M. (2015). Establishment of *Blastocystis hominis* in-vitro Culture Using Fecal Samples from Infants in Slum Area of Mirpur, Dhaka, Bangladesh. *Acta Medica International*, 2 (1), pp: 40-4639;

Aguirre, A. (2003). Aportaciones sobre la ultraestructura de *Blastocystis hominis*. Ensayo Bibliográfico. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional; Zerpa-Larrauri, R.; Náquira-Velarde, C.; Escobar-Chuquiray, J. (2014). Innumerables formas de *Blastocystis hominis* en heces y cultivo en imágenes bi y tridimensionales. *Peruvian journal of parasitology*, 22(1-2), pp: 29-32..

Las formas **avacuolares** y **multivacuolares** son las más frecuentemente encontradas *in vivo* y las más difíciles de identificar al microscopio. Estas formas miden aproximadamente entre 5-10µm y carecen de cubierta fibrilar. Se pueden encontrar pequeñas vacuolas y uno o dos núcleos en las formas multivacuolares aunque es poco frecuente. Se ha sugerido que las variaciones en el tamaño y la morfología de estas fases pueden deberse a distintos estados de enquistamiento y desenquistamiento parasitario. Las formas multivacuolares son más pequeñas que las formas vacuolares y granulares; hasta la fecha no se ha determinado con exactitud la función de las vacuolas que se encuentran interconectadas, o si están formando un nuevo complejo. Esta forma presenta uno o dos núcleos; también presenta una banda electrodensa en el extremo del núcleo, una capa gruesa que rodea a todas las formas multivacuolares y dentro de esta se pueden encontrar bacterias.²¹

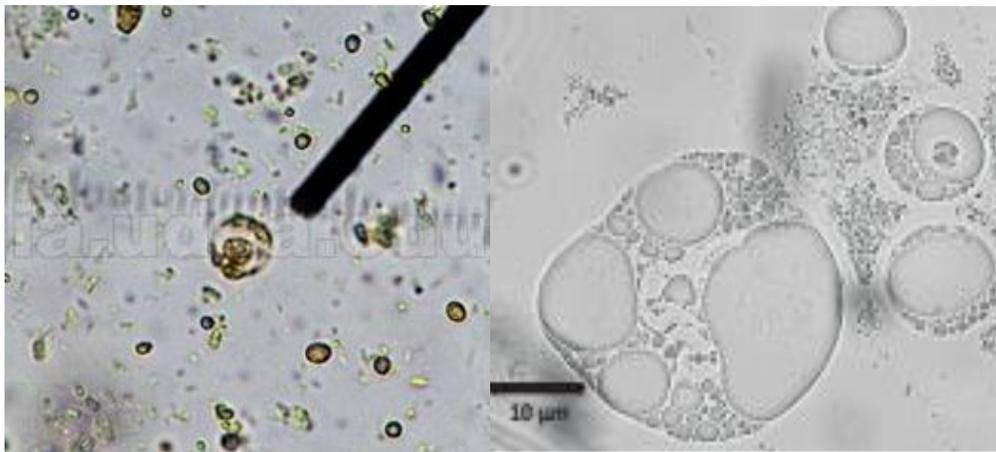


Figura 6.- Formas multivacuolares de *Blastocystis* spp. En la figura de la derecha, se aprecia una forma multivacuolar grande al lado de tres formas vacuolares pequeñas, contrastando el contenido intracelular que poseen. Tomado de: Higuita, L. (2016) Blastocistosis. Aprende en Línea. Plataforma Académica para Pregrado y Posgrado. Programa Integración de Tecnología a la Docencia. Vicerrectoría de Docencia, Universidad de Antioquía; Zerpa-Larrauri, R.; Náquira-Velarde, C.; Escobar-Chuquiray, J. (2014). Innumerables formas de *Blastocystis hominis* en heces y cultivo en imágenes bi y tridimensionales. *Peruvian journal of parasitology*, 22(1-2), pp: 29-32.

Las formas avacuolares miden aproximadamente 5 µm de diámetro, no contienen vacuola central, contienen de uno a dos núcleos, presentan estructuras tipo mitocondria e inclusiones que están en el interior de la matriz citoplasmática.²¹

A continuación se muestran más ejemplos de formas de *Blastocystis* spp en diferentes formas, con diferentes técnicas de microscopia y tinciones:

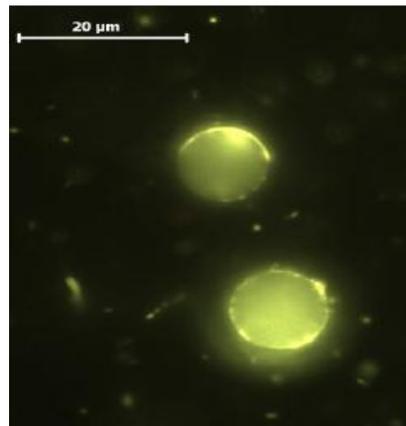


Figura 7.-Cultivo xénico de *Blastocystis hominis*. Se aprecian formas vacuolares con una gran vacuola central, el citoplasma periférico se encuentra muy estrecho y el núcleo se muestra como el área más brillante. Tinción de Naranja de acridina. Tomado de: GRECU, D.; NEAGU, A.; HĂRMĂNESCU, E.; MOGLAN, I. (2013). *In vitro* division modalities developed by *Blastocystis hominis* examined with the acridine orange stain. Analele Ştiinţifice ale Universităţii „Alexandru Ioan Cuza” din Iaşi, s. Biologie animală, Vol. LIX, pp: 13-17

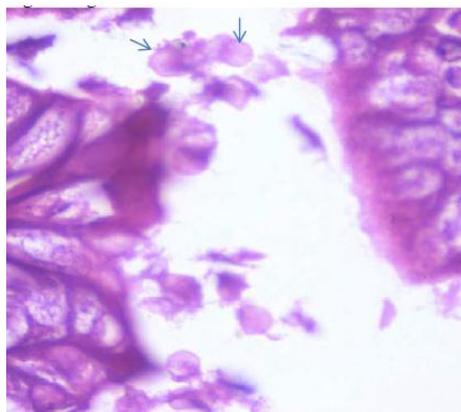


Figura 8.- Tejido de hámster infectado de *Blastocystis* spp. Muchas formas de *Blastocystis* spp se pueden apreciar en la superficie intestinal, así como un grado variable de atrofia vellosa y un foco de inflamación moderada por *Blastocystis* spp

(flechas). Tinción de Hematoxilina-Eosinax1000. Tomado de Ismail, S.; Ali, I.; Fahmy, Z.; Azmy, M.; Magdy, M. (2016). Susceptibility of *Blastocystis hominis* to monolaurine (Lauric Acid), lactoferine (*Lactobacillus acidophilus*) and metronidazole: An *in vitro* and *in vivo* studies. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 10 (21), pp: 14-25

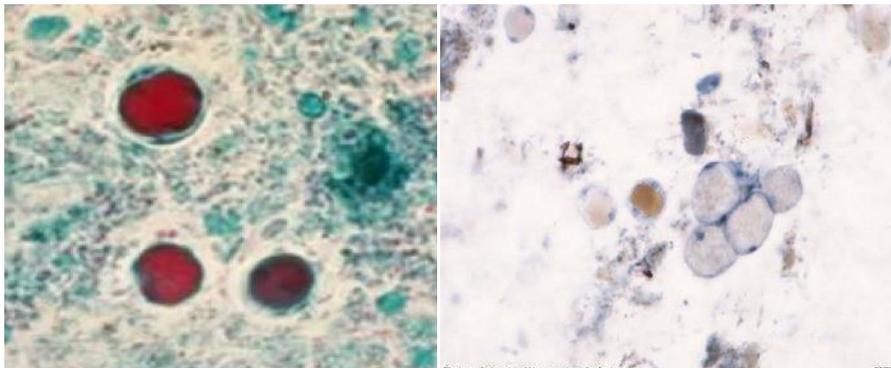


Figura 9.- Formas vacuolares de *Blastocystis* spp en tinción tricómica de Gomori. Tomado de Aguirre, A. (2003). Aportaciones sobre la ultraestructura de *Blastocystis hominis*. Ensayo Bibliográfico. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.

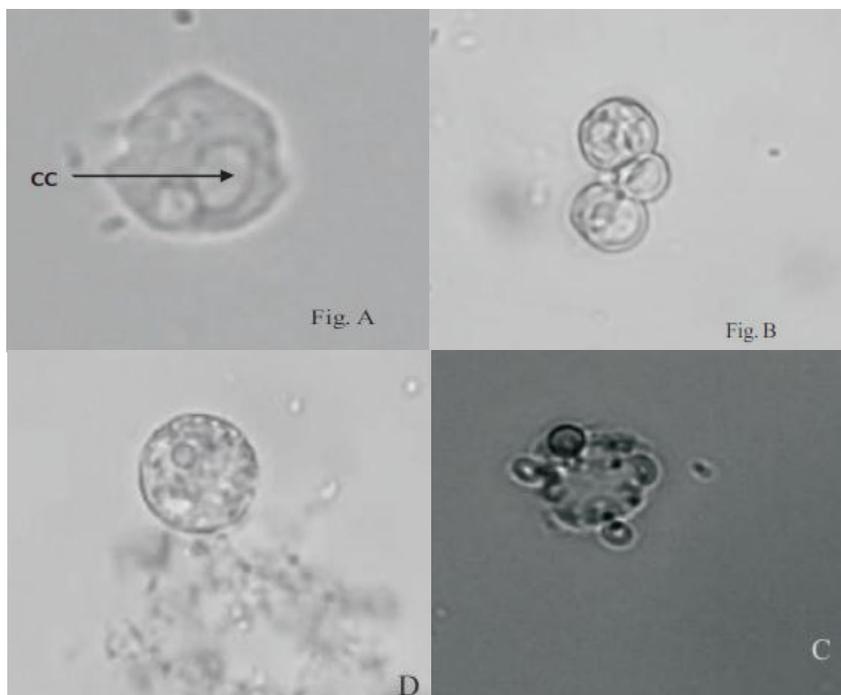


Figura 10.- A) Sedimento del medio de cultivo BDMM alternativo. Forma cuerpo central de *Blastocystis* spp a 400x. La flecha señala el cuerpo central. B) Formas cuerpo central de *Blastocystis* spp de diferentes tamaños y aspecto a 400x. C) Sedimento del medio de cultivo BDM alternativo. Forma globulosa de *Blastocystis* spp con vesículas fuera y dentro del citoplasma a 400x. D) Forma granular de *Blastocystis* spp a 400x. Tomado de Ortigoza, S.; Cruz, M.; Hernández, M.; Castañeda, M.; Castro, M.; González, M. (2011). Medio de

cultivo alternativo para el diagnóstico de *Blastocystis hominis*. Peruvian Journal of Parasitology. 19 (2), pp: 52-59.

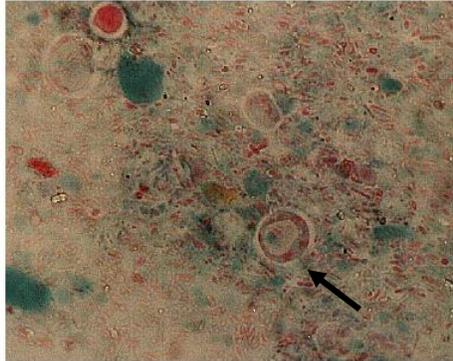


Figura 11.- Quiste de *Blastocystis* spp, evidenciado con tinción tricómica de Gomori. Tomado de Ortigoza, S.; Cruz, M.; Hernández, M.; Castañeda, M.; Castro, M.; González, M. (2011). Medio de cultivo alternativo para el diagnóstico de *Blastocystis hominis*. Peruvian Journal of Parasitology. 19 (2), pp: 52-59.

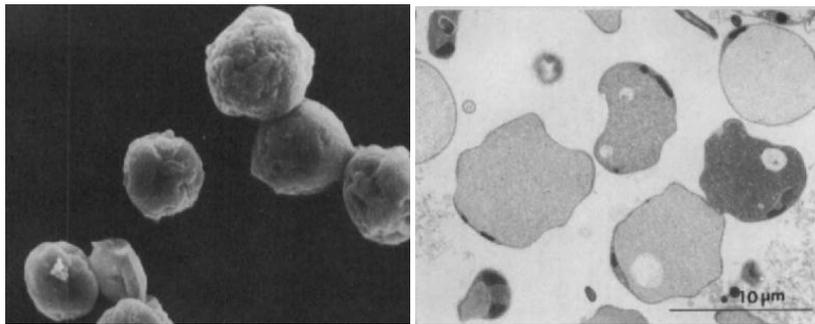


Figura 12. Micrografías de *Blastocystis* spp de un cultivo de laboratorio de Netsky stock. (a) El escaneo con la microscopía electrónica mostrando la forma y superficie morfológica. Aunque generalmente redondeado en forma, se han observado muchas indentaciones en la superficie celular. (b) Micrografía de transmisión electrónica de células de la misma muestra . Se observan variaciones en la apariencia de estructuras internas visibles. Tomado de Boreham, P.; Stenzel, D. (1993). *Blastocystis* in Humans and Animals: Morphology, Biology and Epizootiology. Advances in Parasitology, Vol. 32 Academic Press

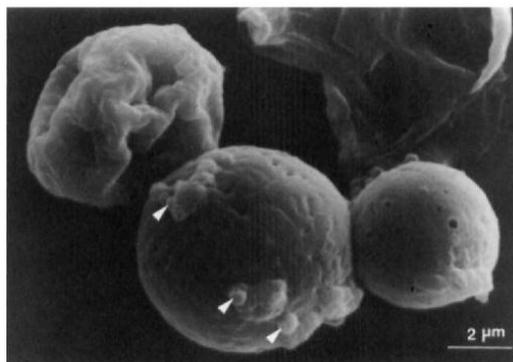


Figura 13.- Escaneo con microscopía electrónica de barrido de *Blastocystis* spp de un cultivo de laboratorio Netsky stock. Se observan aperturas y doblamientos de la superficie celular. Hay bacterias (flechas) que se encuentran asociadas con el recubrimiento de la superficie celular. Tomado de Boreham, P.; Stenzel, D. (1993). *Blastocystis* in Humans and Animals: Morphology, Biology and Epizootiology. Advances in Parasitology, Vol. 32 Academic Press

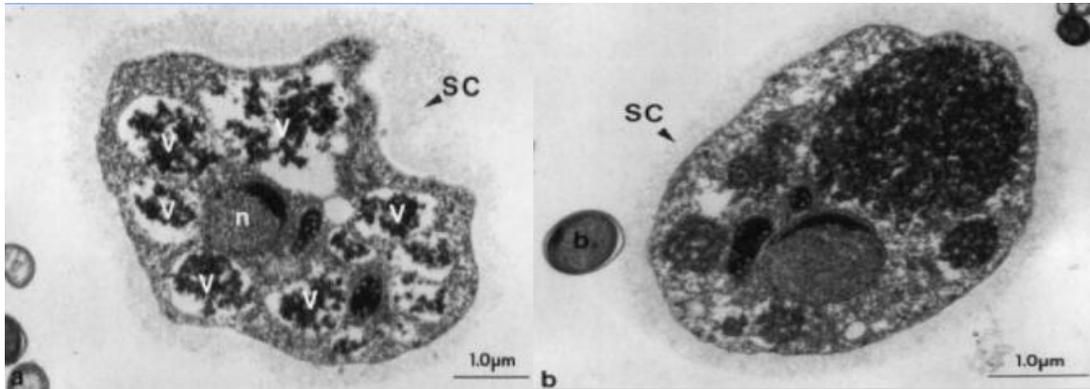


Figura 14.- Micrografía electrónica de transmisión de *Blastocystis* spp de de muestras fecales frescas. Ambas estructuras son de la misma muestra, aunque la morfología y contenido vacuolar son diferentes. En la imagen a se observan múltiples vacuolas pequeñas (V), a diferencia de una sola vacuola grande. El núcleo (n) muestra una banda crecscéntica de cromatina condensada. Un recubrimiento de superficie gruesa (SC) rodea a la célula. B. Una bacteria se logra ver en una asociación con el recubrimiento de superficie. Tomado de Tomado de Boreham, P.; Stenzel, D. (1993). *Blastocystis* in Humans and Animals: Morphology, Biology and Epizootiology. Advances in Parasitology, Vol. 32 Academic Press

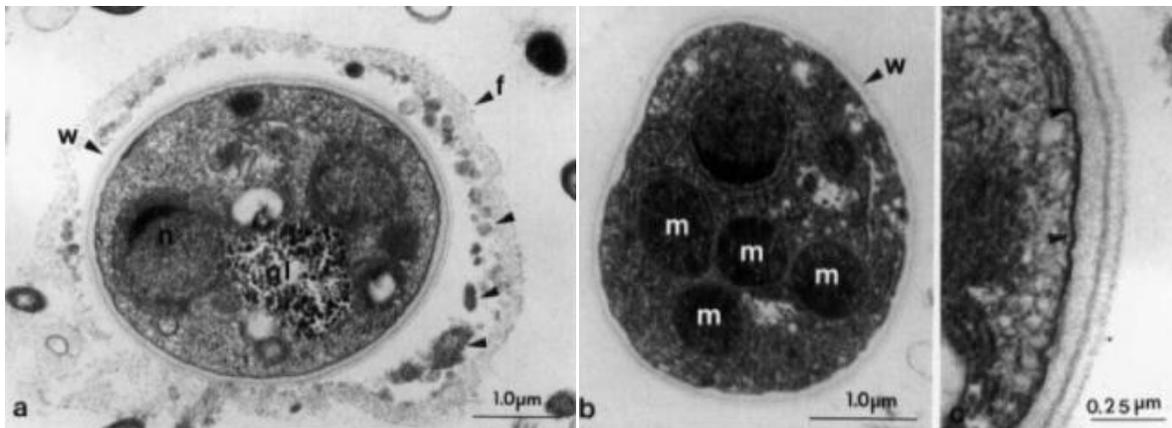


Figura 15.- Micrografías de *Blastocystis* spp mostrando las estructuras internas del parásito. Se pueden apreciar núcleos (n) y organelos tipo mitocondria(m). Tomado de Boreham, P.; Stenzel, D. (1993). *Blastocystis* in Humans and Animals: Morphology, Biology and Epizootiology. Advances in Parasitology, Vol. 32 Academic Press

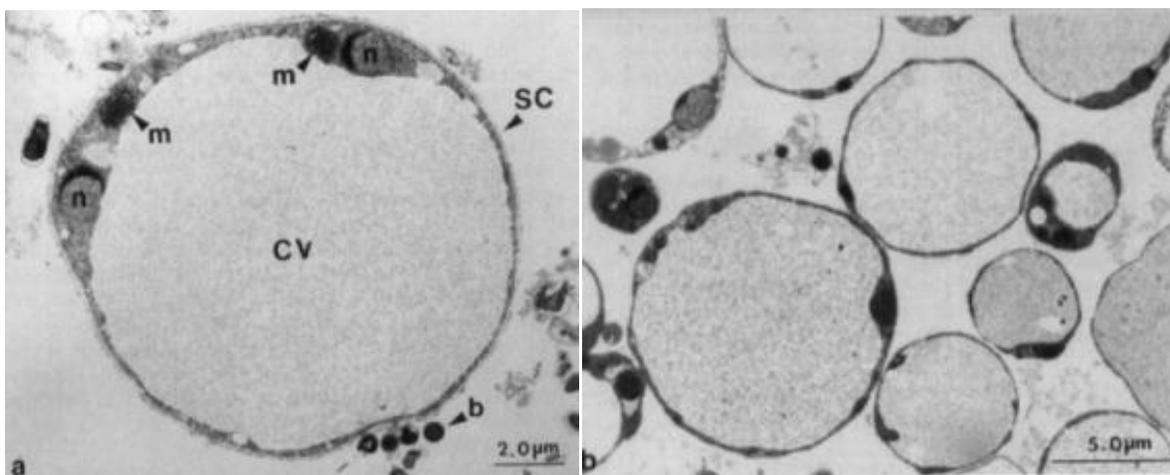


Figura 16.- Micrografías de transmisión electrónica de la forma vacuolar de *Blastocystis* spp de un cultivo de laboratorio. (a) Micrografía con magnificación alta del stock BRIS/87/HEPU/8 mostrando la morfología celular. Una banda delgada de citoplasma que contiene los organelos rodea a la gran vacuola central (CV). Dos núcleos (n) están presentes en esta sección de la célula, ambos mostrando la banda crecscéntica de la cromatina típica del parásito. Algunas bacterias (b) se encuentran en una amplia asociación con el recubrimiento de la membrana. Las estructuras tipo mitocondria (m) se logran observar. (B) Micrografía de baja magnificación mostrando variabilidad de la morfología celular de las formas vacuolares en cultivo Netsky stock. El contenido de la vacuola central puede variar en apariencia. Tomado de Boreham, P.; Stenzel, D. (1993). *Blastocystis* in Humans and Animals: Morphology, Biology and Epizootiology. Advances in Parasitology, Vol. 32 Academic Press

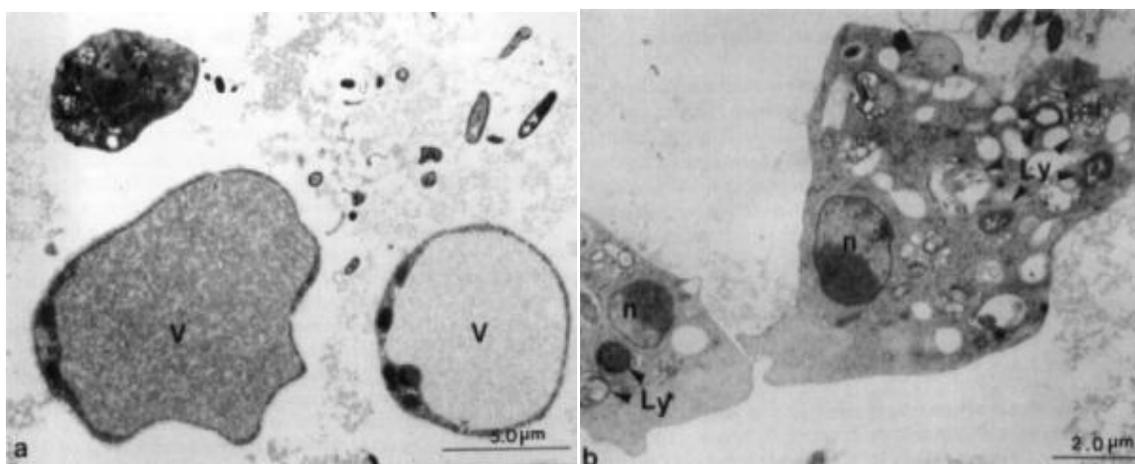


Figura 17.- Micrografía de transmisión electrónica de la forma ameboidea de *Blastocystis* spp stock BRIS/87/HEPU/1 de un cultivo de laboratorio. Las formas vacuolares (v) y ameboideas (A) demuestran las diferencias de tamaño entre las dos formas. (B) Magnificación elevada de las formas ameboideas, mostrando su estructura nuclear. Hay bacterias presentes en inclusiones tipo lisosomales (Ly) en el citoplasma de la célula. Se observa el núcleo (n). Tomado de Boreham, P.; Stenzel, D. (1993). *Blastocystis* in Humans and Animals: Morphology, Biology and Epizootiology. Advances in Parasitology, Vol. 32 Academic Press

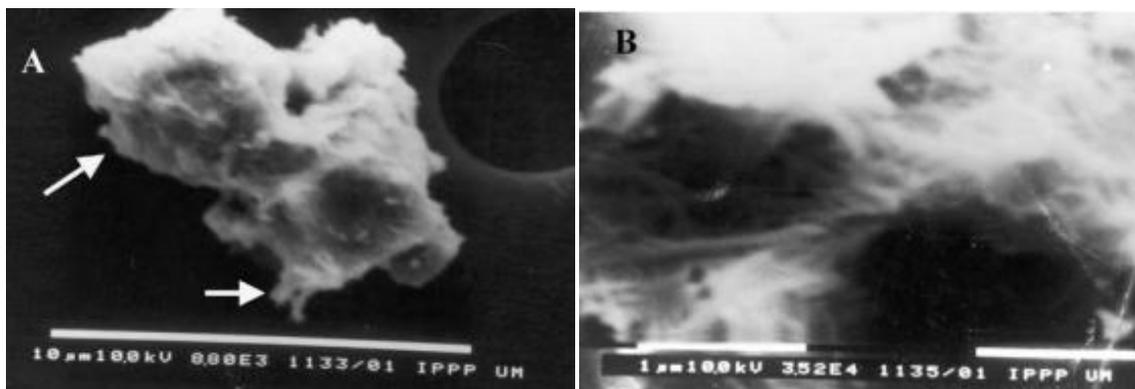


Figura 18.- Micrografía electrónica de barrido de la forma ameboidea de *Blastocystis* spp en un aislado sintomático. (A)Se pueden ver pseudópodos y proyecciones. (B)Se observa una magnificación de la imagen, mostrando la naturaleza fibrilar de la superficie, con profundas indentaciones. Tomado de Boreham, P.; Stenzel, D.(1993). *Blastocystis* in Humans and Animals: Morphology, Biology and Epizootiology. Advances in Parasitology, Vol. 32 Academic Press

Tabla 3.- Características morfológicas de *Blastocystis* spp.¹⁷

Forma	Tamaño (µm)	Vacuola Central	Capa Superficial	Observaciones
Vacuolar	2 -> 200	Presente	Presente, delgada ausente	La vacuola central ocupa la mayor parte de la célula
Granular	6.5 - 80	Presente	Presente, delgada ausente	Gránulos en la vacuola central
Multivacuolar	5 - 8	Ausente	Presente, gruesa	Múltiples vacuolas pequeñas
Avacuolar	5	Ausente	Ausente	Raramente reportada
Ameboide	2.6 -7.8	Ausente	Ausente	Raramente reportada
Quiste	3 - 10	Ausente	Presente o ausente	Pared quística presente

Tomado de Zapata-Valencia, J.; Rojas-Cruz, C. (2012). Una actualización sobre *Blastocystis* sp. Revista Gastrohnp. 14(3), pp:94-100

Genética

Blastocystis spp presenta una amplia diversidad genética, que muestra diferentes variaciones entre especies a nivel molecular.⁵ Es por esto, junto a la falta de capacidad para distinguir morfológicamente a las diferentes especies del parásito, que actualmente se sugiere clasificar a *Blastocystis* spp en ST, como ya se ha mencionado previamente; esto se ha logrado gracias a técnicas moleculares como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), reacción en cadena de polimerasa-polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) y secuenciación por reacción en cadena polimerasa-polimorfismo de conformación de cadena simple (PCR-SSCP) para poder distinguir de mejor manera a estos parásitos con respecto a la anterior clasificación de las especies.¹⁷

Para lograr esto, se han evaluado las SSU-rRNAs de las especies de parásitos pertenecientes al género *Blastocystis*. Estas regiones variables y conservadas en 18 SSU-rRNAs constituyen la base para la identificación de relaciones filogenéticas entre las especies. Se encuentran correlacionadas con los ST y, gracias a esto, se ha reportado la existencia de al menos 17 ST en la actualidad.¹⁴ También se ha podido correlacionar la especificidad del parásito al hospedero y el potencial patogénico de estos parásitos con variaciones en las secuencias SSU-rRNA.

Estos rRNAs se utilizan para el diagnóstico con PCR de alta sensibilidad. Esta clasificación, propuesta a partir de información molecular, podría explicar las variaciones de los síntomas y la respuesta al tratamiento reportado en infecciones por *Blastocystis* spp.⁶

De los 17 ST que se han registrado hasta ahora, los ST 1-9 infectan humanos. ST1 y ST8 colonizan a humanos principalmente, mientras que ST9 infecta solamente a humanos; los ST10-17 están presentes en otros hospederos no humanos.²³ Podemos encontrar como ST propios del humano a los ST 3 y 9; los ST 1, 2, 5 y 8 se pueden observar en el humano y en mamíferos (primates, cerdos, ganado vacuno y porcino); al igual que el ST 4, que se encuentra en humanos, algunos primates, aves y roedores; el ST 1 puede ser encontrado tanto en humanos como en otros animales como caballos, cerdos, monos, gallinas, ovejas, roedores, pavos, faisanes y cabras; los ST 6, 7, 8 se encuentran en poblaciones que conviven con aves, siendo estos propios de estas; en marsupiales, los ST encontrados son

8, 12,13 y 16; en elefantes, el subtipo 11; en jirafas y ganado vacuno, los ST 10, 12, 14 y 15; en roedores los ST 2, 3, 4 17 y en los primates no humanos los ST1, 2, 3, 4, 7, 10, 13, 14 y 15.^{3,34} En 2013 se reportó que los ST 1-4 produjeron más del 90% de los casos en humanos, siendo más prevalente el ST3.^{2, 5, 19}

La tabla siguiente ilustra la distribución de los ST en animales:

Tabla 4.- ST de *Blastocystis* spp en animales. ^{5, 37, 38, 39}

Animal	Subtipos detectados
Vaca	ST1, ST3, ST5, ST10, ST12, ST14, ST15
Cabra	ST3, ST7, ST10
Oveja	ST10, ST15
Cerdo	ST1, ST2, ST3, ST5, ST14
Gallina	ST1, ST6, ST7
Roedor	ST2, ST3, ST4, ST17
Chinchilla	ST3
Topo	ST5
Jirafa	ST3, ST10, ST12, ST14, ST15
Ciervo	ST5, ST10, ST13
Camello	ST1, ST3, ST5, ST10, ST14, ST15
Rinoceronte	ST5
Ave	ST1, ST4, ST5, ST6, ST7
Marsupial	ST8, ST12, ST13, ST16
Perro	ST1, ST2, ST4, ST5, ST6
Primate	ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST7, ST10, ST13, ST14, ST15
Elefante	ST11
Caballo	ST1
Venado	ST13
Faisán	ST8
Cangujo rojo	ST16

Tomado de: Del Coco, V.; Molina, N.; Basualdo, J.; Córdoba, M. (2017). *Blastocystis* spp.: Avances, controversias y desafíos futuros. Revista Argentina de Microbiología, 49 (1), pp: 110-118./ Popruk, S.; Udondom, Ru.; Koompapong, K.; Mahittikorn, A.; Kusolsuk, T.; Ruangsittichai, J.; Palasuwan, A. (2015). Subtype Distribution of Blastocystis in Thai-Myanmar Border, Thailand. Korean J Parasitol, 53(1), pp:13-19; Wang, W.; Cutteli, L.; Bielefeldt-Onmann, H.; Inpankaew, T.; Owen, H.; Traub, R. (2013). Diversity of Blastocystis subtypes in dogs in different geographical settings Parasites & Vectors, 6(215), pp: 1-5; Skotarczak, B. (2018). Genetic Diversity and pathogenicity of Blastocystis. Ann Agric Environ Med, 25 (3), pp:411-416.

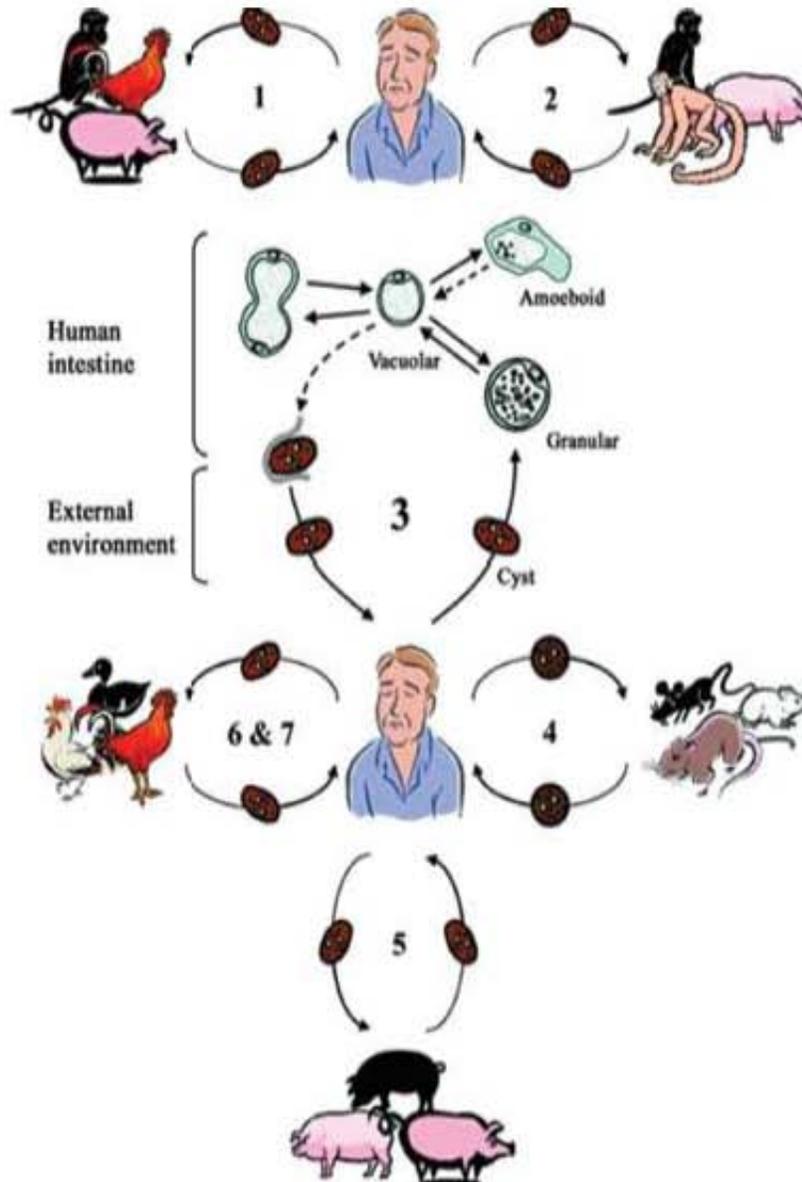


Figura 19.- Transmisión zoonótica de *Blastocystis* spp por ST. Se pueden apreciar los diferentes ST de *Blastocystis* spp (números) que pueden infectar humanos, así como las especies animales con las que puede haber zoonosis. Tomado de: Barua,

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Blastocystis* spp se ha descrito y modificado a lo largo de los años, pero aún se sigue estudiando en la actualidad, debido a la complejidad que este presenta. Hay varias propuestas planteadas por diferentes investigadores para explicar la forma o formas de reproducción del parásito, aunque todavía no se ha llegado a un consenso.

Se sabe que el parásito se puede reproducir por fisión binaria y/o fisión múltiple principalmente, esquizogonia, plasmotomía y endodiogonia.^{17, 28} En la fisión binaria y/o múltiple, la formación de las células hijas se realiza por la acumulación y diferenciación del citoplasma en la periferia del núcleo, seguido por la aparición de la membrana; se puede observar como un mecanismo habitual para la formación de células hijas. En el caso de la endodiogonia, el parásito forma una bolsa de división al interior del este, en donde se pueden encontrar dos células hijas, que eventualmente liberará al exterior. La plasmotomía se da en la fase ameboidea del parásito; se pueden obtener uno o más descendientes conteniendo uno o más núcleos, pero sin cuerpo central. La reproducción por esquizogonia formará una bolsa en donde dará lugar a la generación de hasta treinta estructuras, que tendrán cuerpo central.^{4, 41}

El modelo más aceptado del ciclo de vida nos dice que la forma quística e infectante del parásito se transmite por la ruta fecal-oral, ya sea entre humanos o entre otras especies, debido al potencial zoonótico que presenta. La infección ocurre por fecalismo, lo cual puede deberse a malas prácticas de higiene, como por ejemplo: después de la toma de agua no tratada, la ingesta de plantas acuáticas no desinfectadas que hayan sido contaminadas con quistes y también por el consumo de alimentos contaminados por falta de higiene de manos, etc. La continuación del ciclo biológico dependerá de la compatibilidad del subtipo con el hospedero. En un hospedero adecuado, *Blastocystis* spp

se desarrollará mediante la exquistación del trofozoito en el intestino grueso, localizándose principalmente en el colon y el ciego.^{8, 34}

Después de entrar en la luz intestinal, los quistes se desarrollan, primero en la forma vacuolar, también pudiéndose desarrollar en otras formas diferentes.⁴⁰ En los humanos, las formas vacuolares se dividen por fisión binaria y puede convertirse en ameboides, multivacuolares, o formas granulares, antes de convertirse en quistes. Las formas vacuolares experimentan enquistación en el intestino del hospedero, mientras que las formas intermediarias del quiste se pueden rodear por una gruesa capa fibrilar que posteriormente se perderá durante el paso al exterior para infectar a otras personas. Asimismo, las formas multivacuolares pasarán a una forma prequística que provee la base para generar un quiste de membrana delgada, siendo esta forma una posible causante de autoinfección.^{21, 29}

Se sabe también que las formas ameboides de igual modo dan lugar a prequistes, que se convierten en un quiste de pared gruesa por medio de una esquizogonia. Esto aún se encuentra en evaluación, debido a que los investigadores aún no han encontrado pruebas convincentes para demostrar la ocurrencia de este fenómeno. El enquistamiento del parásito ocurre durante el paso a través del intestino grueso, y los quistes serán evacuados junto con las heces para infectar a un nuevo hospedero.^{16, 29}

Se muestra a continuación la evolución del ciclo de vida de *Blastocystis*, de acuerdo a Alexeieff, Zierdt, la CDC y Amaya et al:

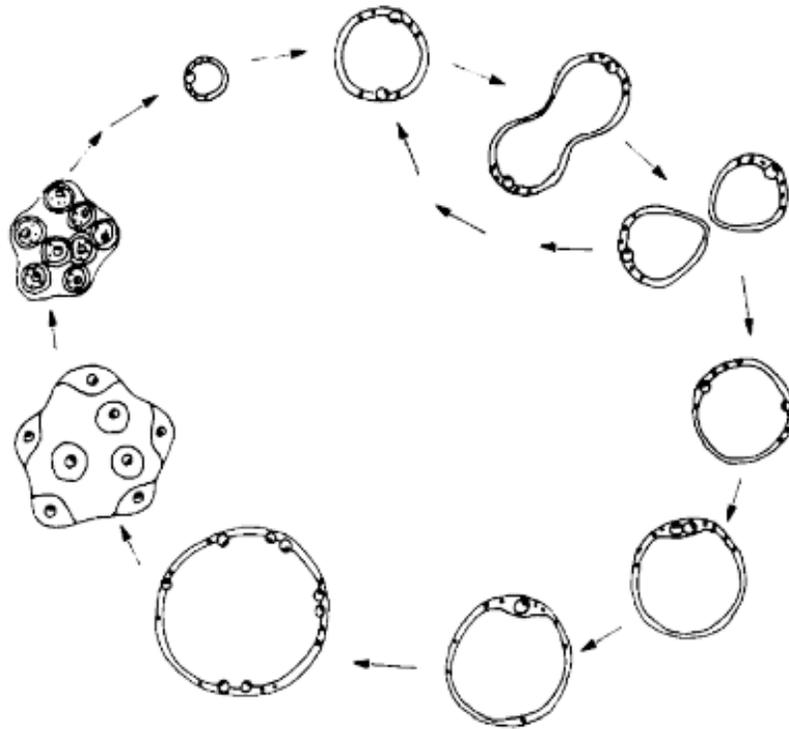


Figura 20.- Ciclo de vida de *Blastocystis* spp, propuesto por Alexeieff (1911). Se puede apreciar reproducción por fisión binaria y por esquizogonia. Se observa primero el proceso de fisión binaria, seguido de un aumento de tamaño por parte del organismo, para después formar esquizontes en su interior y liberarlos al medio ambiente. Tomado de Boreham, P.; Stenzel, D. (1993). *Blastocystis* in Humans and Animals: Morphology, Biology and Epizootiology. Advances in Parasitology, Vol. 32 Academic Press.

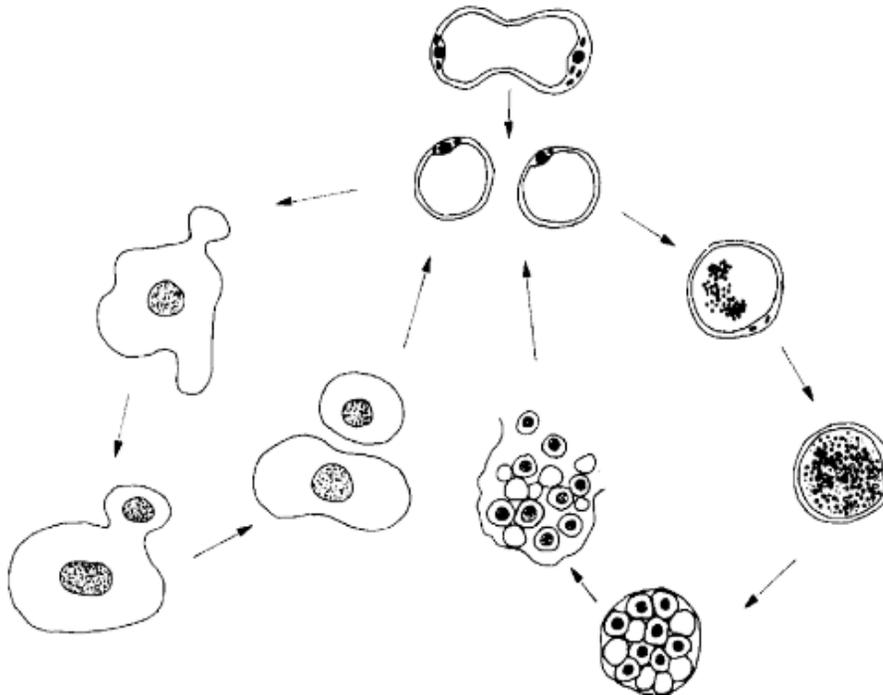


Figura 21.- Ciclo de vida de *Blastocystis* spp, propuesto por Zierdt (1973). Se aprecia reproducción por fisión binaria, plasmotomía y liberación de gránulos reproductivos o esquizogonia. Este ciclo sugiere que *Blastocystis* puede tomar diferentes tipos de reproducción, no necesariamente consecutivos, mostrando cómo el parásito puede reproducirse por esquizogonia o por fisión binaria,.Tomado de Boreham, P.; Stenzel, D. (1993).*Blastocystis* in Humans and Animals: Morphology, Biology and Epizootiology. Advances in Parasitology, Vol. 32 Academic Press

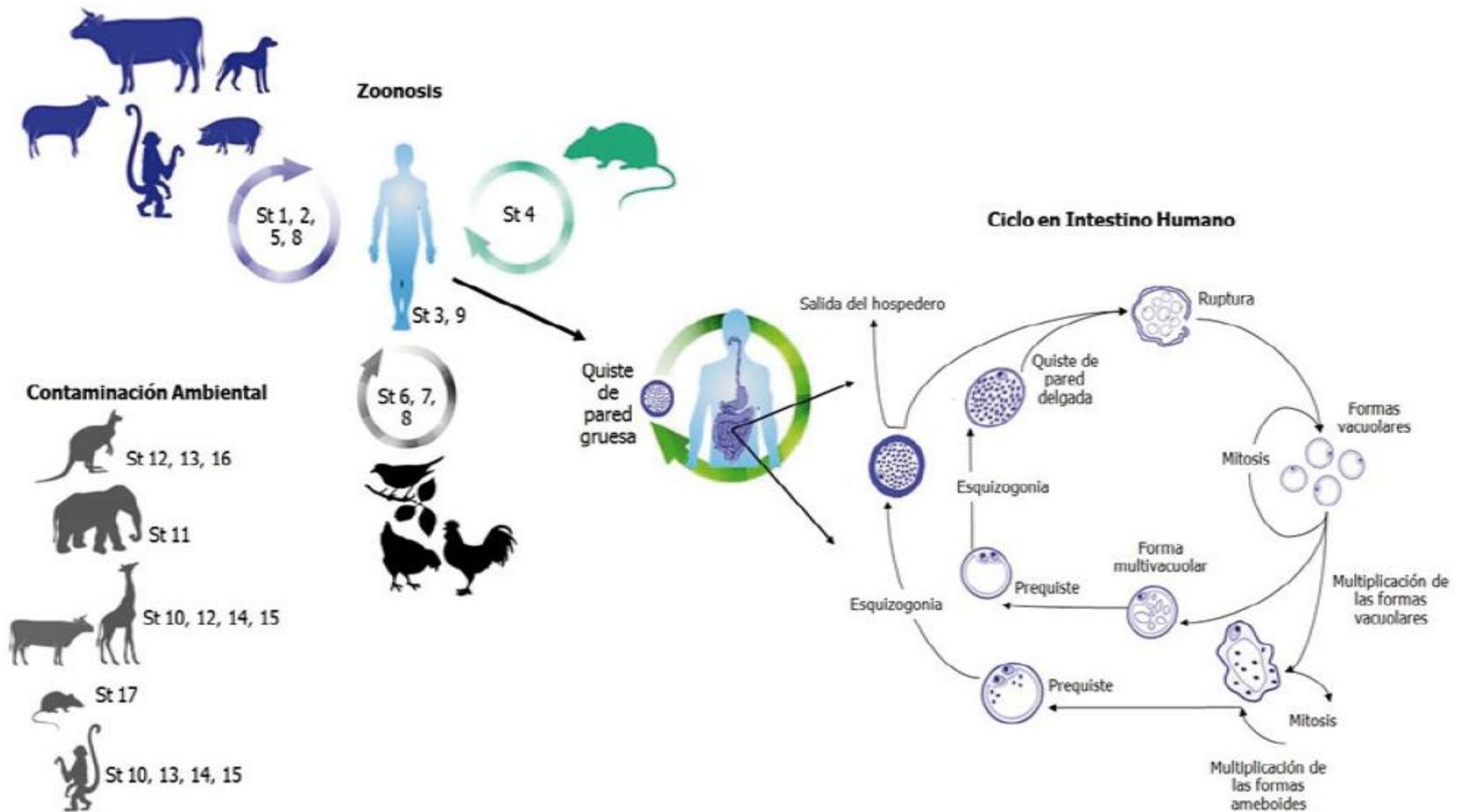


Figura 22.- Esquematación modificada del ciclo de vida de *Blastocystis* spp. Se aprecian los 19 ST y sus respectivos hospederos intermediarios, así como las transmisiones zoonóticas que pueden ocurrir y las formas que toman dentro del hospedero. A la izquierda se observan mamíferos que pueden ser hospederos de *Blastocystis* spp junto con el ST correspondiente; al centro se observan los ST que afectan al ser humano, así como los seres vivos con los que se puede presentar zoonosis; a la izquierda, se aprecia el ciclo de vida que se da en el intestino del ser humano, mostrando las diferentes formas de reproducción que el parásito puede tomar. Tomado de Amaya, A.; Trejo, J.; Morales, E. (2015). *Blastocystis* spp.: revisión literaria de un parásito intestinal altamente prevalente. Rev Univ Ind Santander Salud, 47 (2), pp: 199-208.

Patogenia

Los resultados que se han obtenido de diversos estudios relacionados con la patogenicidad de *Blastocystis* spp han generado controversia entre investigadores, que siguen discutiendo si este parásito realmente representa un problema de salud pública. La patogenicidad del parásito parece estar relacionada con el subtipo con el que el individuo se encuentre infectado, y debido a que esto aún no se ha aclarado, se sigue investigando el tema en la actualidad.⁴

A lo largo de los años, se han ido relacionando el rol patogénico y las manifestaciones clínicas de la infección por *Blastocystis* spp con el tipo morfológico, subtipo y el número de parásitos por campo microscópico. Gracias a lo que se ha estudiado, algunos investigadores y médicos sugieren que *Blastocystis* spp puede considerarse patógeno cuando se logran observar de 3-5 parásitos por campo en observación directa al microscopio.^{4, 10}

Aunque se ha argumentado que los polimorfismos genéticos dentro de cada ST podrían estar relacionados con la patogenicidad de *Blastocystis*, poco se ha investigado y discutido acerca de cómo las diferencias genéticas en este microorganismo pudieran estar asociadas con su crecimiento y si esto puede dar una pista acerca de su patogenicidad. Adicionalmente, se ha argumentado que algunos parásitos explotan a sus hospederos de forma moderada mediante inmunomodulación, subsistiendo sin causar un daño notorio. Esto ya se ha visto anteriormente; como por ejemplo, el uso moderado de algunas levaduras beneficia al parásito si el hospedero se mantiene saludable. Un crecimiento rápido permite al parásito lograr elevar su grado de reproducción, pero puede disminuir su suministro de alimento, que puede verse a manera de otros miembros de la microbiota, recortando una fuente de alimento potencialmente renovable. Este tipo de comportamiento se ha observado en *Blastocystis* spp, pues se ha reportado que una de sus fuentes de alimento son las bacterias de la microbiota e incluso se ha visto que puede ser causa de disbiosis.¹⁰

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la forma ameboide de este parásito se encuentra asociada a la causa principal de los síntomas de la blastocistosis, ya que se ha reportado que en esta forma presenta varios mecanismos de patogenicidad para su supervivencia, excretando moléculas que favorecen su supervivencia y desencadena mecanismos de inflamación y daño a tejidos; por lo que se le considera como la forma más patógena. El rol de *Blastocystis* spp como agente patógeno intestinal se relaciona al síndrome del colon irritable en viajeros, pacientes inmunosuprimidos incluyendo a pacientes con cáncer y VIH, con hipoalbuminemia y anasarca, además de urticaria aguda y crónica.⁴²

Los pacientes que se encuentran inmunocomprometidos, ya sea por alguna enfermedad congénita o cáncer, así como los inmunosuprimidos (virus VIH), son particularmente susceptibles a infección por este parásito, lo que sugiere que *Blastocystis* spp puede actuar como oportunista gracias a los mecanismos de patogenicidad que permiten la inmunomodulación del hospedero, que ya se encuentra desprotegido, así como su supervivencia. No obstante, se ha evidenciado que el estrés exagera la infectividad y la patogenicidad del parásito, por lo que esto pudiera explicar el que este se encuentre diseminado en la población en general. Esto lo hace alterando las respuestas inmunitarias así como los sistemas antioxidantes regulatorios; suprimiendo las respuestas de PBMC e inmunoglobulinas causando un desbalance en el sistema oxidante-antioxidante del hospedero. Englobando los agentes causales de la parasitosis, tenemos que una elevada carga parasitaria y el estado de la inmunidad sistémica (debido a la posibilidad del parásito para modular este), además de la presencia o ausencia de la microbiota humana, son agentes decisivos en la patogenicidad y la ocurrencia de esta parasitosis. Esto es debido a que se han encontrado interacciones entre la microbiota y este parásito que le permitirían su proliferación o que podría causar disbiosis en el intestino, mientras que la inmunomodulación del hospedero le permite subsistir, especialmente si el sistema inmunológico se encuentra alterado. La remisión de la sintomatología y la desaparición de las estructuras parasitarias de las heces después de un tratamiento antiparasitario, se constituye como apoyo a la patogenicidad de este parásito, ya que sugiere que *Blastocystis* spp es causante principal de la sintomatología en el paciente.^{7, 15}

Este microorganismo podría señalarse como responsable de las manifestaciones clínicas en todo paciente que cumpla con los siguientes criterios¹²:

- 1) Presencia de estructuras numerosas de *Blastocystis* spp en muestras fecales.
- 2) Presencia de formas vacuolares grandes en las heces del paciente.
- 3) Ausencia de otros agentes causales (funcionales, otros parásitos, bacterianas, virales, micóticas) que expliquen la sintomatología.
- 4) Desaparición de los síntomas después del tratamiento antiparasitario específico.

Algunos autores sugieren que la autolimitación natural y la desaparición espontánea del parásito se deben a una inmunidad protectora. Esto podría explicar las tasas de infección bajas en niños mayores y adultos, reflejando una inmunidad inducida por infecciones previas; aunque otros estudios han encontrado tasas elevadas de infección en adultos y en niños.

La asociación estadística entre la detección de *Blastocystis* spp en heces y el desarrollo de algunas formas clínicas ha sido asumida como evidencia indirecta de la patogenicidad de este microorganismo. En un artículo de 2014 por *Forte et al*, se organizaron las evidencias de patogenicidad en diferentes grupos: evidencias clínicas, fenotípicas y genéticas.

Las evidencias clínicas las dividen en directas y basadas en asociaciones. Hay dos evidencias directas, las cuales han sido las mejor documentadas: los individuos con mayor carga parasitaria son sintomáticos con mayor frecuencia; la administración del tratamiento antiparasitario correspondiente conduce en la mayoría de los casos a la desaparición de las manifestaciones clínicas. En cuanto a las evidencias basadas en asociaciones, tenemos que las más citadas han sido la asociación entre manifestaciones clínicas, principalmente digestivas, y la infección por *Blastocystis* spp; la asociación entre el síndrome de intestino irritable (IBS) e infección por *Blastocystis* spp; la blastocistosis asociada al desarrollo de manifestaciones cutáneas de tipo urticariano; la presencia de *Blastocystis* spp en pacientes inmunocomprometidos, demostrada en una elevada proporción de los individuos afectados por diarreas; y la asociación entre blastocistosis y anemia por déficit de hierro (ADH).^{11, 43, 44}

Las evidencias que *Forte et al* mencionaron en favor de la existencia de diferencias fenotípicas entre *Blastocystis* spp fueron acerca de la morfología del parásito, donde la forma ameboide es la más frecuente en los aislamientos de personas sintomáticas mientras que la forma granular, es más frecuente en los aislamientos de individuos asintomáticos; el uso de microscopía electrónica de barrido para estudiar a *Blastocystis* spp revela que la superficie de las células de aislamientos obtenidos de personas con manifestaciones digestivas se observa más rugosa que la de los parásitos de aislamientos de individuos asintomáticos; los parásitos presentes en aislamientos provenientes de pacientes muestran mayor afinidad de enlace con lectinas de *Canavalia ensiformis* (ConA) (caracterizada por una alta especificidad por residuos terminales de D-glucosa y de D-manosa) y de *Helix pomatia* (HPA) (su mayor especificidad es por N-acetil-β-D-glucosamina) , en donde se especula que los niveles más altos de D-glucosa, D-manosa y N-acetil-β-D-glucosamina en la superficie de las células de aislamientos provenientes de pacientes podrían facilitar la adherencia del parásito al epitelio intestinal.^{44, 45}

Las evidencias genotípicas más significativas en el trabajo de *Forte et al* se muestran como las siguientes: las diferencias reportadas en la prevalencia de los ST de *Blastocystis* spp en diferentes hospederos han aportado datos sobre posibles reservorios y vías de transmisión, esto principalmente por la predominancia del ST3 en humanos y su ausencia en otros animales, siendo el único genotipo de origen humano, con una transmisión de persona a persona; la moderada especificidad de los otros 16 ST en otros animales, que sugiere una transmisión zoonótica; la tipificación entre pacientes sintomáticos y hospederos asintomáticos muestra resultados diferentes y contradictorios, los cuales sugieren que esto se debe al número limitado de individuos evaluados, que los ST no son poblaciones homogéneas y producen diferentes alteraciones en un organismo, de acuerdo a un estudio realizado por *Husein et al*⁴⁵; las diferencias en las respuestas inmunitarias de cada individuo a cada uno de los ST de *Blastocystis* spp, que daría como resultado una respuesta hospedero parásito para cada uno de los ST, provocando expresiones clínicas diferentes.^{18, 44, 46, 47}

Mecanismos de patogenicidad

Los mecanismos de patogenicidad de *Blastocystis* spp pueden ser clasificados en cinco grupos, en base a lo que se ha reportado, para facilitar su estudio:

1. Inducción de secreción de mucinas neutras por las células de Goblet.

El mucus intestinal forma una importante barrera entre los parásitos y las células epiteliales del hospedero. Las mucinas, glicoproteínas producidas por las células de goblet del epitelio intestinal, son el principal componente del mucus. Hay microorganismos, como *Entamoeba histolytica*, que induce a la secreción de mucinas ácidas y neutras, que presentan una función disminuida en sus capacidades defensivas. En este sentido, *Blastocystis* spp ha mostrado la capacidad de estimular la secreción de mucinas neutras, las cuales tener un incremento significativo (o el decrecimiento relativo de las ácidas) altera la carga eléctrica de la superficie epitelial y aumenta la adherencia del parásito a la superficie intestinal.^{48,49,50} Esto se observó en un estudio realizado por *Iguchi et al*, en donde inocularon quistes de *Blastocystis* spp cepa RN94-9 en ratas, en donde se observó una infección crónica en el ciego. El análisis histológico mostró un aumento ligero pero significativo en el número de células de goblet en la mucosa cecal. Utilizando diferentes tinciones, se encontró que hubo un aumento predominante de células neutrales mucina-positivas. Utilizando métodos moleculares, también se observó una regulación al alta de la expresión del interferón- γ , IL-12 y factor de necrosis tumoral alfa. La inducción de la respuesta local del hospedero, incluyendo la ligera hiperplasia de las células de goblet, además de la regulación al alta de citocinas proinflamatorias y de tipo 1 sugieren que la cepa de *Blastocystis* estudiada es un organismo patógeno que puede provocar respuestas proinflamatorias en tejidos locales a la infección.⁵¹

2. Secreción de proteasas dependientes de cisteína.

Las proteasas producidas por *Blastocystis* spp son predominantemente del tipo cisteíno-dependiente, lo que ha sido evidenciado por la sensibilidad de estas a inhibidores como E-64 y iodoacetamida en ensayos con azocaseína. Estas cisteín-proteasas o proteasas cisteíno-dependientes juegan un papel importante en el ciclo celular y la patofisiología de *Blastocystis* spp (puede liberar cisteín proteasas que pudieran participar en el ataque al epitelio intestinal junto con otras hidrolasas y pueden causar un aumento en la

permeabilidad intestinal, inducción de apoptosis, inmunomodulación del hospedero e inflamación; también puede alterar microbiota por medio de metabolitos no caracterizados, producidos por la poliketido sintasa o péptido sintasa no ribosomal). Existen diferencias en la actividad de estas enzimas entre ST (y entre aislamientos del mismo subtipo) y ello se ha correlacionado con la virulencia del microorganismo.^{52, 53}

Las proteasas cisteíno-dependientes de *Blastocystis* spp contribuyen a su patogenicidad de varias maneras, principalmente en la degradación de la IgA secretoria. La actividad de la IgA secretoria es el principal mecanismo inmunitario del hospedero para impedir la adhesión de *Blastocystis* al epitelio intestinal. Se ha demostrado que las proteasas de cepas aisladas de *Blastocystis* pueden cortar y degradar la inmunoglobulina humana A (IgA).⁵² Mediante la liberación de proteasas cisteíno-dependientes, degrada dichas inmunoglobulinas y con ello evade esa importante barrera defensiva del hospedero.⁵⁴ La forma ameboide de *Blastocystis* spp es la que principalmente excreta estas proteasas, lo que ha dado pauta a que se le conozca como la forma más virulenta, predominando en pacientes sintomáticos.

La actividad de cisteín-proteasas, principalmente las IgA proteasas, es crítica para la supervivencia del parásito en el intestino y su colonización. La asociación entre infección por *Blastocystis* y baja cantidad de IgA sérica podría ser consistente, considerando que la IgA es la inmunoglobulina con mayor actividad en la defensa de la mucosa, además de que también se encarga de prevenir la adherencia de patógenos a la superficie luminal del intestino, ligar toxinas e inhibir la absorción de antígenos. La IgA secretada puede ser efectiva contra patógenos como una respuesta innata no específica o desarrollarse en una respuesta adaptativa específica después de la presentación de antígenos lumbinales al tejido linfoide asociado al intestino (GALT). La disminución de IgA puede tener influencia en las interacciones microbianas y el hospedero.⁵⁵

Se ha comprobado una variación extensiva en la actividad de proteasas entre los ST 4 y 7. Estos mostraron que pueden romper a la IgA secretada con cisteín y aspartato proteasas, respectivamente. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que *Blastocystis* presente como factores de virulencia a sus proteasas y que estas contribuyan a la supervivencia

parasitaria al degradar anticuerpos neutralizantes de la mucosa.⁵² Asimismo, se ha logrado secuenciar el genoma completo del ST 7 y junto con este se han aclarado algunos procesos importantes al identificar genes que codifican proteínas responsables de la inhibición de las proteasas del hospedero.⁵⁶ Se ha visto que *Blastocystis* ST7 probablemente utiliza hidrolasas para atacar tejidos del hospedero para obtener su suministro de alimento. El secretoma predicho de este ST incluye fucosidasa, hexosaminidasa y b-galactosidasa. Puede realizar este proceso al degradar glicoproteínas del hospedero, especialmente las que constituyen la mucosa. Además, las cisteín proteasas podrían degradar mucinas. Estas enzimas podrían permitir a *Blastocystis* spp el usar la mucosa como carbohidrato y fuente de proteína, permitiéndole sobrevivir al ambiente intestinal creando su propio microecosistema.⁵⁷

Se han observado proteasas utilizadas por *Blastocystis* spp para adherirse a la mucosa intestinal, así como ulceraciones colónicas que pueden haber sido causadas por actividad proteolítica del parásito. Se teoriza que este daño puede ser causado por una hidrolización de proteínas de tejidos conectivos de la mucosa intestinal. Se ha observado también que la actividad de proteasas de *Blastocystis* spp es más elevada en un pH neutro, lo que coincide con el pH del intestino grueso, sitio en donde el parásito coloniza.⁵⁸

3. Desregulación de las respuestas inmunitarias del hospedero (inmunomodulación del hospedero)

Blastocystis spp es capaz de inducir una respuesta inmune propia de estos agentes parasitarios, caracterizada por: producción de citocinas como IL-3, IL-4, IL-5, IL-13; promover la diferenciación de linfocitos Th2, quimiotaxis de eosinófilos, y activa una respuesta en IgEs. Todo esto va a conllevar a la generación de la alteración en la homeostasis inmunológica a nivel intestinal y cambios en la microbiota.⁵² Además, es capaz de desencadenar una respuesta inadecuada de linfocitos T, monocitos y linfocitos NK, formación de tejido linfático anómalo y antimicrobianos endógenos que alteran la microbiota intestinal. Este daño a la mucosa intestinal no se mantiene en colon, se propaga a todo el tracto gastrointestinal por vías de señalización no claras actualmente. Si bien este proceso puede considerarse como leve, se mantiene en forma crónica y

persistente en la mucosa intestinal, por lo cual se ha propuesto como causa de dolor abdominal crónico generado por la infección de este microorganismo.¹

Estudios experimentales en ratas y ensayos *in vitro* han demostrado que *Blastocystis spp* estimula respuestas proinflamatorias, con incremento en la secreción de IL-8, Interferón γ , IL-12 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , del inglés Tumor Necrosis Factor Alpha) por células del hospedero. Este tipo de respuestas, que normalmente funcionan como mecanismo de control de la infección, es regulado por la secreción de IL-10 por linfocitos intestinales. Sin embargo, en pacientes de IBS, hay una menor producción de IL-10 y, no ocurriendo la regulación necesaria y por ello se desarrollan lesiones inflamatorias de la mucosa intestinal. A raíz de las tendencias actuales, que de manera creciente demuestran que las parasitosis humanas pueden tener expresiones clínicas debidas al desarrollo de respuestas inmunitarias anómalas, la participación de la desregulación de los mecanismos defensivos a *Blastocystis spp.* en el desarrollo de IBS debe ser profundamente estudiada.¹

Pueden inducir la secreción de IL-8 por células epiteliales intestinales. La IL-8, molécula que desarrolla papeles importantes en la génesis de eventos inflamatorios, atrae leucocitos a sitios de inflamación y activa monocitos en ellos. La región promotora del gen de IL-8 tiene secuencias de enlace para un grupo de factores de transcripción, que incluyen a NF- κ B, NF-IL-6 y AP-1. En la mayoría de los tipos celulares con potencialidades para la producción de IL-8, la activación de NF- κ B es un paso necesario para la transcripción del gen de esa citocina. En las células no estimuladas, NF- κ B está en forma inactiva en el citoplasma, unido a proteínas inhibitorias llamadas I κ B. La estimulación por varios inductores, por ejemplo proteasas cisteíno-dependientes, activa una cadena de señales que culmina con la fosforilación de las I κ Bs, lo que resulta en su degradación. Un estudio reciente demostró que *Blastocystis spp.*, como ya fuera evidenciado antes con *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*, induce la producción de IL-8 por las células epiteliales intestinales mediante la activación de NF- κ B por las cisteín-proteasas del parásito.^{49, 59}

También presentan la capacidad de inducir la secreción de factor estimulante de colonias de macrófagos por células epiteliales intestinales. El factor estimulante de colonias de

granulocitos-macrófagos (GM-CSF, del inglés granulocyte/macrophage colony stimulating factor), como IL-8, es una citocina proinflamatoria. Esta molécula ejerce una fuerte actividad quimiotáctica sobre neutrófilos y monocitos, incrementando la presencia de estos tipos celulares en sitios donde se están desarrollando procesos inflamatorios.^{43, 60, 61, 62, 63}

También estimulan la producción de IL-8 por las células epiteliales del colon a través de un mecanismo dependiente del factor nuclear kB. Este mecanismo sería el responsable de la pérdida de fluidos y la inflamación intestinal en individuos infectados. Esta molécula también induce a hiperplasia de células caliciformes y aumento del interferón γ , IL-12 y el factor de necrosis tumoral alfa, observado en la mucosa cecal de ratas infectadas, lo que sugiere que la infección por *Blastocystis* spp estimula la respuesta específica local e involucra a los linfocitos T, monocitos, macrófagos y a las células NK.⁵

Un mecanismo de acción es la estimulación de la producción de moco, a través de la citocina IL-22, que alivia los síntomas de la colitis, mejorando la salud intestinal. Quizás *Blastocystis* es más común en personas sanas porque ayuda a mantener una capa de moco en el intestino, ya sea directamente o a través de interacciones con bacterias beneficiosas o el sistema inmune.¹⁵

4. Activación de mecanismos de hipersensibilidad tipo I

La infección por *Blastocystis* spp, como la producida por *Giardia lamblia* y otros parásitos intestinales, ha sido asociada a fenómenos urticarianos. El tratamiento de la parasitosis, como fuera expresado antes, conduce tanto a la resolución de la infección como de las lesiones cutáneas. Algunos autores han sugerido que esta asociación está vinculada con la activación por moléculas del parásito de un patrón de respuestas Th2, con alta producción de interleucinas 4, 5 y 13, entre otras, lo que daría lugar a reacciones alérgicas mediadas por IgE. De manera complementaria, también se ha sugerido que *Blastocystis* spp podría activar la vía alternativa del sistema del complemento, lo que generaría moléculas C3a y C5a que, actuando sobre mastocitos y basófilos, estimularían la liberación de histamina que contribuiría a desencadenar lesiones cutáneas como el rash cutáneo.^{43, 61, 62, 63}

En un artículo de *Pavanelli et al* (2015), se observó que la cantidad de formas parasitarias inoculadas en el ratones influenció el grado de la respuesta inflamatoria que se generó, debido a que la cantidad de los mediadores inflamatorios liberados fue directamente proporcional a la cantidad de microorganismos presentes en el hospedero. Estos mediadores inflamatorios son responsables de algunos de los efectos observados en los tejidos evaluados: hiperemia, que aumenta el flujo sanguíneo al tejido dañado para que los leucocitos puedan alcanzar el sitio de infección para realizar fagocitosis; infiltración inflamatoria marcada por la presencia de leucocitos en el sitio de infección, los cuales llegan por medio de mediadores quimiotácticos; y agregados linfoides hiperplásicos que aumentan debido a que los mediadores de inflamación estimulan la síntesis de linfocitos (que son almacenados en los agregados linfoides después de madurar) para que puedan combatir a los agentes infecciosos. La presencia del parásito en el tejido fue un factor estimulante para el surgimiento de una respuesta inflamatoria en el hospedero. En ese estudio, la implantación de formas vacuolares de *Blastocystis* spp en tejidos de ratones infectados o que simplemente pasaron por el tracto intestinal, fueron capaces de desencadenar la infección con infiltrados inflamatorios intensos y una predominancia de leucocitos mononucleares y eosinófilos, los cuales son característicos de enfermedades parasitarias y respuestas alérgicas.⁶⁴

Las moléculas responsables de las manifestaciones extraintestinales de la infección aún son desconocidas. Algunos ST han sido asociados a ciertos antígenos, los cuales podrían tener un papel clave en la patogénesis del parásito. Por ejemplo, ciertas proteasas muestran un papel importante en la patogénesis. El papel del ST 3 puede ser directamente asociado a la producción de cisteína proteasas. Estos también pueden aumentar directamente la producción de IL-8 en las células epiteliales del colon a través de un mecanismo NF-kB dependiente. En el ST 4, las cisteína proteasas provocan respuestas al hospedero, incluyendo una ligera hiperplasia de las células cáliz y una sobrerregulación del interferón γ , IL-12, factor de necrosis tumoral alfa.³⁶ Una asociación entre los ST de parásitos y ciertos trastornos cutáneos se han observado, como la presencia de *Blastocystis* ST2 y ST3, especialmente la forma ameboide o ST4 en pacientes con urticaria

aguda o crónica (CU). Los antígenos de *Blastocystis* spp estimulan a los linfocitos Th2, generando una reacción alérgica mediada por IgE, por lo que en este caso se propone que el organismo, al ser expuesto a las moléculas del parásito, activará la cascada de señalización del complemento, lo cual conllevará a la liberación de la anafilotoxina y a la activación de las células cebadas.^{65, 66}

5. Aumento de la permeabilidad intestinal

Varios estudios han demostrado que la infección por *Blastocystis* spp puede dar lugar a una disminución de la función de barrera de la pared intestinal y, consecuentemente, a un aumento de la permeabilidad de la mucosa del colon; causar modificaciones en el citoesqueleto; y provocar apoptosis celular. Esta actividad también se ha descrito en lisados del parásito. Además, *Blastocystis* WR1 ST4 induce apoptosis contacto-independiente, rearreglo de la F-actina y disrupción de la función de barrera de las células IEC-6.⁵²

Los cambios de permeabilidad, a su vez, han sido asociados a tres eventos clínicos que pueden estar presentes en individuos infectados por ese protozoo:

- a) a la diarrea,
- b) fenómenos alérgicos, fundamentalmente urticarianos,
- c) y al dolor abdominal que caracteriza al IBS.

Al menos, tres mecanismos han sido aludidos para explicar el aumento de la permeabilidad intestinal, consecuencia de la infección por *Blastocystis* spp:

- Secreción de hialuronidasa. La secreción de la enzima hialuronidasa conduce a la degradación de proteínas de la matriz extracelular y con ello a la pérdida de integridad de la mucosa intestinal.
- Inducción de apoptosis de células epiteliales. Un estudio relativamente reciente demostró que el subtipo 4 de *Blastocystis* spp puede inducir apoptosis en la línea de células epiteliales de rata IEC-6 de una manera independiente de contacto. Sin embargo, el papel que pudiera desempeñar la apoptosis en la disminución de la función de barrera de la mucosa intestinal no está claro, pues la utilización de inhibidores de apoptosis en presencia del protozoo no impide el aumento de la permeabilidad de la pared.

- Secreción de proteasas dependientes de serina. El receptor activado por proteasas tipo 2 (PAR-2) de las células epiteliales está involucrado en el aumento de la permeabilidad de la pared intestinal e inflamación de bajo grado. Proteasas de tipo serino-dependientes secretadas por *Blastocystis* spp activan el PAR-2 mediante la separación de su dominio N-terminal. El péptido liberado actúa como ligando, estimula y activa al receptor para aumentar la apertura de TJ (Tight junctions) y desencadena la inflamación; en la superficie de las células epiteliales, incrementa la apertura de los espacios intercelulares y, de esa manera, contribuye al deterioro de la función de barrera de la mucosa intestinal. El aumento de la permeabilidad celular permite la difusión de ambos antígenos y bacterias a la submucosa, participando en la inflamación y puede estimular las terminaciones nerviosas presentes allí, lo que sería la causa del dolor abdominal que caracteriza la presentación clínica del IBS.^{59, 60} Los PAR también están presentes en la superficie de las neuronas intestinales.

La activación de los miembros de la familia PAR podría contribuir al dolor abdominal. De acuerdo a los reportes que se han obtenido, se ha visto que *Blastocystis* spp posee una actividad de proteasa, visto en estudios experimentales con los ST 4 Y 7; junto con esto, se han predicho al menos 22 proteasas secretadas con la información genómica del ST7, lo que nos sugiere que este parásito tiene un rol en las alteraciones intestinales por medio de las vías anteriormente mencionadas.⁵⁷

Las lesiones generadas a nivel de la mucosa se puede presentar en la totalidad de la mucosa del intestino delgado comprometiendo la absorción de nutrientes y poniendo en riesgo el estado nutricional de los pacientes pediátricos; este proceso inflamatorio afecta a las microvellosidades del intestino delgado proximal causando una disminución en los niveles de lactasa, lo que trae como consecuencia una malabsorción de lactosa y manifestaciones de intolerancia a la misma tales como distensión abdominal, dolor abdominal, diarrea, entre otros.¹

El daño a nivel de la mucosa GI causa lesión de las uniones apretadas del intestino, incrementando la permeabilidad a moléculas proteicas de alto peso molecular,

potencialmente alergénicas, generando una respuesta Th2 y como consecuencia alergia alimentaria, como podría ser el caso de la alergia a la proteína de leche de vaca documentada en lactantes con presencia e identificación de *Blastocystis*.⁵²



Figura 23.- Rash cutáneo de un paciente masculino de 36 años diagnosticado con Blastocistosis crónica adquirida domésticamente. Esta infección ha sido descrita como recurrente e intensamente prurítica. Tomado de EIDA, O. et al (2008). evaluation of the nitric oxide activity against *Blastocystis hominis* *in vitro* and *in vivo*. Journal of the Egyptian Society of Parasitology, 38 (2), pp:521-536.

Blastocystis y microbiota

Las explicaciones para los mecanismos de patogenicidad mencionados anteriormente pueden incluir diferencias entre los ST en *Blastocystis*. Además, la presencia de la microbiota del intestino parece ser un factor esencial para la expresión patógena de protozoos entéricos como *Blastocystis* spp.¹⁵

El intestino humano es estéril al nacer y es durante la infancia temprana cuando es colonizada por microorganismos provenientes de la madre, la dieta y el medio ambiente. A

estos colonizadores se les conoce como microbiota. El adulto humano es hospedero de al menos 100 trillones de especies de organismos comensales que viven en armonía con los trillones de células en nuestro cuerpo. Más del 90 % de la materia fecal está compuesta de bacterias (93%), y otros microorganismos (virus, archaea, eucariontes). La microbiota intestinal contiene un estimado de 3.3 millones de genes (microbioma), que superan por mucho a los genes humanos (20,000). La microbiota esta siendo considerada cada vez más como un órgano adicional del ser humano con importantes funciones metabólicas, nutricionales, neuroendócrinas y protectoras. La microbiota fecal produce micronutrientes como las vitaminas B y K y cadenas cortas de ácidos grasos (SCFA). Las bacterias facilitan la fermentación de la comida para el metabolismo del hospedero, producen neurotransmisores que son absorbidos sistemáticamente, conducen priming inmunológico, inducen a la diferenciación de células T-helper en el hospedero y ayudan en la protección de otros patógenos lumbinales.⁶⁷

Se han identificado diferentes poblaciones bacterianas en el intestino humano, de los cuales 90 % de estas se clasifican en dos phylum dominantes, los cuales son Bacteroidetes y Firmicutes, que además tienen gran variedad individual a nivel de especies y de cepas. Se han visto tres enterotipos que predominan en *Bacteroides* (de Bacteroidetes) (Tipo1), *Prevotella* (de Bacteroidetes) (Tipo 2) y *Ruminococcus* (de Firmicutes)(Tipo 3); aunque en realidad hay diferencias notables entre estos tres grupos en la población humana.⁶⁷

Se ha observado de igual forma que la relación entre *Blastocystis* spp y la microbiota de individuos infectados puede estar relacionada con la presencia de la enfermedad. Se ha demostrado en algunos estudios que a pacientes con predominio intestinal de *Prevotella* spp y *Ruminococcus* spp presentan infección por *Blastocystis* spp, mientras que es poco común en pacientes con predominio de Bacterioides. A raíz de esto, se sugiere que la modificación de la microbiota intestinal podría ser un factor determinante en la manifestación de la infección parasitaria.^{7, 16, 34}

Se ha visto en diferentes estudios que interviene directa o indirectamente en la patogenicidad de *Blastocystis* spp. La desregulación de esta conlleva a una

hipersensibilidad visceral y desórdenes de la motilidad intestinal. Las anomalías parietales contribuyen a los síntomas con una permeabilidad paracelular e inflamación de bajo grado en la mucosa del colon. Este tipo de modificaciones en la microbiota se pueden observar en pacientes con IBS, donde se ha observado un desbalance entre *Firmicutes/Bacteroidetes*. Este desbalance puede tener impacto en la producción de metabolitos como los SCFA y gas. Los SCFA han mostrado tener un papel importante en la motilidad intestinal y en el aumento de producción de gas puede generar (bloating), el cual es uno de los principales síntomas observados en el IBS. Ya que la microbiota interactúa fuertemente con funciones biológicas importantes como en la inmunidad de la mucosa, la alteración en su composición podría tener un impacto en la homeostasis intestinal. Un desbalance inmunológico provocado por alteraciones de la microbiota podría incrementar la permeabilidad intestinal asociada con la activación de las vías nociceptivas. Estas alteraciones celulares podrían también contribuir a desregulaciones del sistema nervioso entérico.⁶⁸

Aunque la microbiota varía mucho de persona a persona, se ha reportado un aumento de Enterobacteriaceae en pacientes con IBS asociado a una disminución de *Lactobacilli* y *Faecalibacterium prauznitzii*. En el trabajo de Nourrison et al (2014), se llegó a la conclusión de que *Blastocystis* spp puede ser indicativo de cambios en la microbiota, pudiendo llegar a interactuar con esta e inducir cambios en su composición^{56, 68} Complementando esto, en ese trabajo se vio que la disminución de *F. prauznitzii* y *Bifidobacteria* pudo deberse a la presencia de *Blastocystis*; es de relevancia, pues *Bifidobacteria* ha sido utilizada como probiótico por su efecto anti-carcinogénico e inmunoestimulante, además de que su consumo aumenta la presencia de *F. prauznitzii*. La ausencia de estas bacterias puede dejar desprotegido al hospedero.⁶⁸

Existe la posibilidad de que las proteasas secretadas por *Blastocystis* y otras bacterias sean las que generen el IBS. Además, *Blastocystis* spp podría tener un impacto negativo en la microbiota intestinal, llegando a incrementar los síntomas del IBS. Parece que los genes de codificación de una poliketido sintasa (PKS) y dos péptido sintasa no ribosomales (NRPS), que son conocidos por producir antibióticos, están involucrados en la alternancia de la composición de la microbiota intestinal.^{57, 69}

Además de los mecanismos mencionados anteriormente, se ha propuesto un posible mecanismo para los síntomas semejantes al IBS que puede ser el bajo grado de inflamación a través de una exposición antigénica persistente en una infección crónica de *Blastocystis*.⁵⁶

IBS

Debido a que *Blastocystis* spp provoca síntomas similares a los atribuidos al síndrome del colon irritable (IBS) como la diarrea, dolor abdominal, cólicos y náuseas, se ha sugerido la relación de este parásito con la enfermedad. También se teoriza que el cambio en el ambiente del intestino causado por el IBS pueda permitir las condiciones para que este parásito se pueda desarrollar fácilmente.⁷¹ Se cree que la inflamación de baja intensidad ocurre como consecuencia de la constante activación inmunológica causada por el parásito y una constante exposición a los antígenos del hospedero.⁷⁰

Los mecanismos potenciales exactos de *Blastocystis* spp para inducir los síntomas característicos de IBS aún no se han dilucidado claramente. Se ha teorizado acerca de esto, como la apoptosis y el aumento de la permeabilidad intestinal siendo resultado de la degradación de proteínas de unión unidas, la regulación positiva de citocinas proinflamatorias, etc.⁶⁹ En un estudio de Irán, se encontró una presencia mayor de *Blastocystis* spp en pacientes con IBS que en el grupo control.⁷²

Esto lo podemos observar de mejor manera en la siguiente imagen:

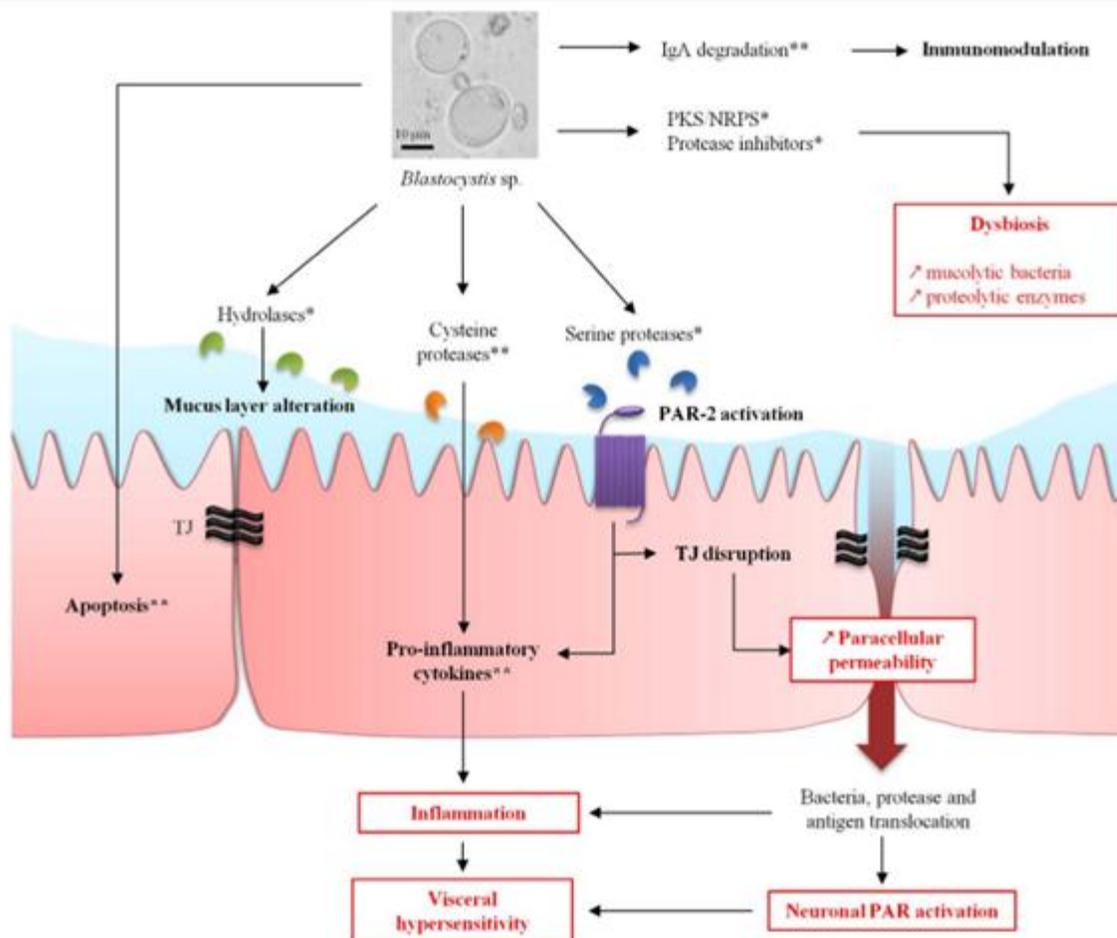


Figura 24.- Modelo hipotético de mecanismos de patogenicidad de *Blastocystis* spp. Se aprecian diferentes moléculas por las cuales *Blastocystis* spp podría actuar sobre el hospedero, provocando disbiosis, inflamación e inmunomodulación. Tomado de Poirier, P., Wawryzniak, Vivares, C.; Delbac, F.; Alaoui, H. (2012). New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. PLoS Pathog. Vol. 8(3): e1002545. doi:10.1371/journal.ppat.1002545

Algunos estudios han encontrado que pacientes con IBS presentan ciertos polimorfismos relacionados a la IL-10, TNF- α , IL-4 y serotonina; por lo tanto, podemos teorizar que, cuando pacientes con ciertos polimorfismos genéticos son infectados con *Blastocystis* spp, tienen más probabilidades de desarrollar diarrea.²⁴

La disponibilidad de recursos, un sistema inmunológico efectivo y los genes del hospedero son factores que pueden influenciar la respuesta contra agentes patógenos.¹⁰

Por otro lado, de acuerdo a los resultados obtenidos en un trabajo realizado por *Dogruman-Ali et al*, se sugirió que la infección por *Blastocystis* spp no causa daño al hospedero, sino es el hospedero que, en un intento por erradicar al parásito, genera varios mecanismos de defensa que van a causar la sintomatología de la enfermedad; lo cual explicaría el por qué algunos pacientes presentan la sintomatología al estar infectados con el parásito y otros no. Sin ser concluyentes, sugieren una mejor investigación de los mecanismos de ST relacionados con la patogenicidad de *Blastocystis* spp.⁷³

En estudios recientes, se ha sugerido que el dolor visceral asociado a IBS podría ser explicado por alteraciones en la barrera epitelial, resultado en motilidad intestinal y desórdenes de sensibilidad. Asimismo, se ha reconocido que hay inflamación de bajo grado de la mucosa en esta enfermedad

En la imagen siguiente se engloban los diferentes mecanismos de patogenicidad mejor descritos de *Blastocystis* spp.

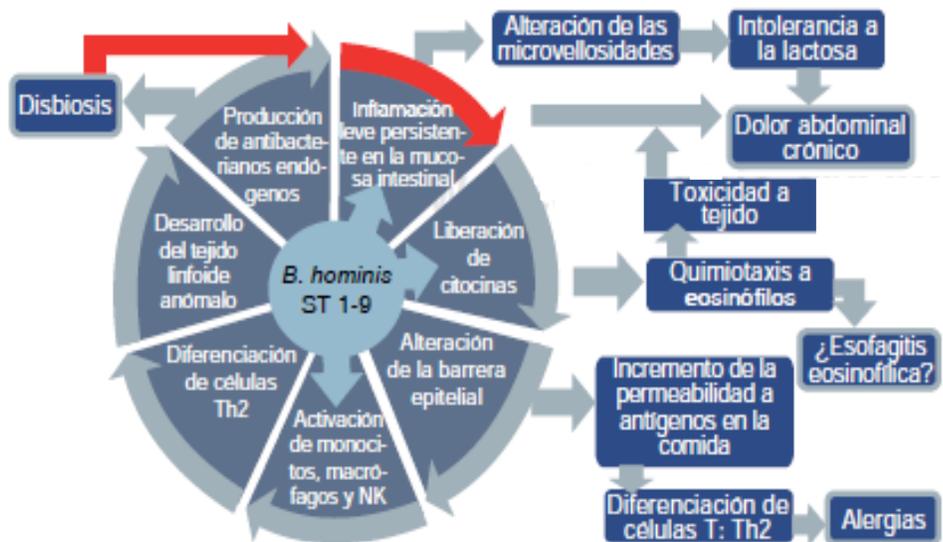


Figura 25.- Mecanismos de patogenicidad de *Blastocystis* spp. En el diagrama circular se observan los diferentes mecanismos de patogenicidad registrados de *Blastocystis* spp, como estos generan cambios en el intestino y las consecuencias de estas alteraciones. Tomado de Vichido-Luna et al (2016). *Blastocystis hominis*, un agente patógeno controversial en la génesis de enfermedades gastrointestinales y alérgicas. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 25 (3), pp 78-83

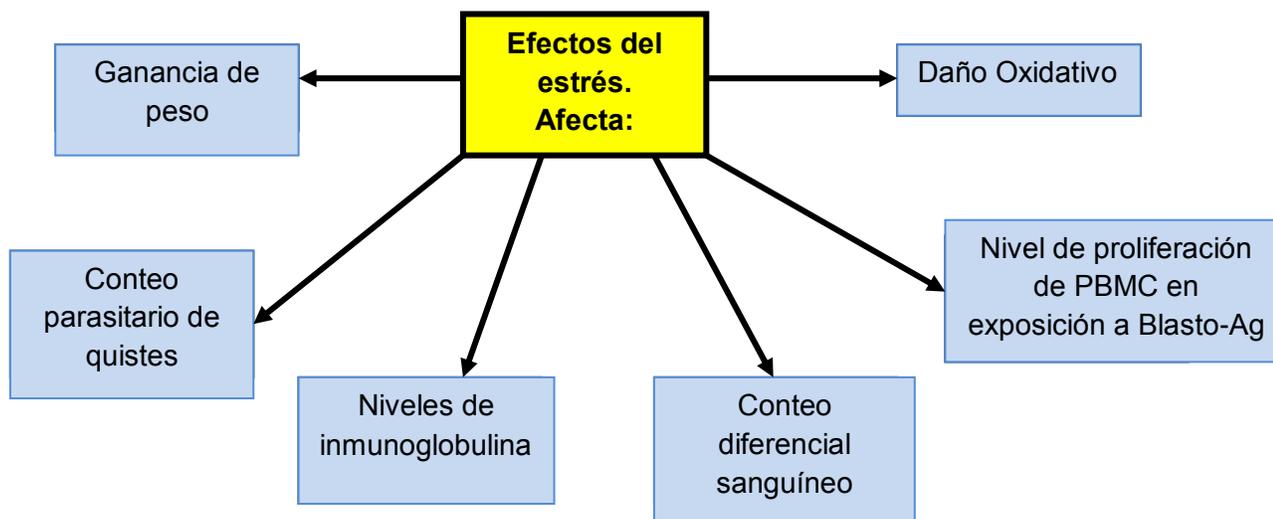


Figura 26.- Efectos del estrés en infección por *Blastocystis* spp. Se ve la influencia a nivel molecular, celular, físico e incluso a nivel parasitario. Modificado de de Chandramathiet al (2014). Stress exacerbates infectivity and pathogenicity of *Blastocystis hominis*: In Vitro and In Vivo evidences, PLoS ONE, 9(5): e9456

Estrés oxidativo y *Blastocystis*

El estrés oxidativo, un fenómeno normal en el cuerpo, también podría verse involucrado en la infección por *Blastocystis* spp. Si persiste durante un largo período de tiempo, podría conducir a muchas condiciones fisiopatológicas que resultan en enfermedades, incluido el cáncer. Este evento fisiológico juega un papel importante en la respuesta a una infección por *Blastocystis* spp y es probablemente una razón por la cual ciertos ST de *Blastocystis* spp son más virulentos; esto ocurre cuando la formación de ROS es mayor que la capacidad del cuerpo para desintoxicar los intermediarios reactivos. Los estudios han demostrado que el estrés oxidativo es elevado en humanos infectados con parásitos intestinales como *Blastocystis* spp en pacientes con cáncer.⁷⁴ Está reportado que la infección por *Blastocystis* spp se correlaciona con un estallido oxidativo, que conduce al estrés oxidativo. Algunos ST pueden inducir mayores concentraciones de estrés oxidativo y precipitar reacciones de la piel como la urticaria. Un estudio reciente mostró que parásitos vivos y lisados de células enteras de *Blastocystis* spp no activaron a los receptores tipo peaje en el TLR humano línea celular monocítica reportera, mientras que los parásitos vivos ST4-WR1 inhibieron la activación de NF-κB mediada por LPS.¹⁵

En este sentido, *Chandramathi et al* encontraron que tanto el estrés como la infección pueden alterar la respuesta inmunológica y la actividad antioxidante reguladora, sugiriendo que el estrés aumenta la susceptibilidad y la patogenicidad del mismo, debido a que suprime la respuesta de células mononucleares sanguíneas y la producción de inmunoglobulinas, causando además un desbalance en los sistemas oxidantes-antioxidantes del hospedero.⁷⁵ Se concluyó que el estrés y la infección por *Blastocystis* podrían desregular de manera independiente la respuesta inmunitaria así como el antioxidante oxidante sistemas regulatorios; el estrés mejora la susceptibilidad y patogenicidad de *Blastocystis* mediante la supresión o desregulación respuestas de PBMC e inmunoglobulinas; el estrés mediado por el aumento de *Blastocystis* causa desequilibrio en el sistema oxidante-antioxidante del hospedero.³⁵

Además, se ha sugerido una relación entre *Blastocystis* spp y el cáncer colorrectal (CCR), el cual es uno de los cánceres más comúnmente diagnosticados en todo el mundo. A pesar de los avances en los programas de detección, el CCR permanece como la segunda causa principal de muerte por cáncer en los Estados Unidos. El estrés oxidativo juega un papel importante en los mecanismos moleculares del cáncer colorrectal (CCR) y ha mostrado estar asociado con *Blastocystis* spp. En un estudio, el antígeno solubilizado aislado de *Blastocystis* spp mostró tener la habilidad para suprimir las células mononucleares en sangre periférica mientras se promueve la proliferación de células colorrectales. El antígeno aislado del ST 3 *Blastocystis* spp mostró el efecto más prominente hacia la proliferación celular de cáncer colorrectal. El efecto patógeno de *Blastocystis* spp fue probado con la evidencia de la formación de cisteín-proteasas. En otro estudio, las células intestinales mostraron un bajo nivel de IgA y un mayor nivel de proinflamatorio citocinas en presencia de infección por *Blastocystis*.⁷⁴

Genética y patogenicidad

En el trabajo de *Eme et al*, se encontró que *Blastocystis* ST1 ha adquirido genes por medio de la transferencia lateral de genes (LGT), algo que podría ayudar a comprender su patogenicidad de mejor manera. Los genes que adquirió, se cree que son principalmente

de bacterias. Se observó en primera instancia que adquirió cinco familias de genes por LGT, que se cree están relacionados con la respuesta al estrés oxidativo, como en procesos oxidativos generados por la respuesta inmune del hospedero o metabolitos producidos por la microbiota. *Blastocystis* ST1 ha adquirido el gen *yqhD* que codifica la Alcohol deshidrogenasa ADH3 de las proteobacterias; además de una glicerol-deshidrogenasa, *GldA*, que actúa como regulador a la baja de *YqhD*. Estas dos enzimas son responsables de la degradación del metilglioal, un metabolito tóxico que puede provocar estrés oxidativo y que está implicado en el IBS. *Blastocystis* ha adquirido una proteína contenedora de dominio tioredoxina 12 (*Txndc12*), una proteína de la superfamilia tioredoxina metazoaria que actúa en la regulación redox y defensa de estrés oxidativo generado por el sistema inmunológico en respuesta a la infección por parásitos.⁷⁶

Se observaron 17 adquisiciones de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos, incluyendo 5 involucrados en la importación y metabolismo de la fucosa, que es de gran importancia en la ecología microbiana del intestino: glicanos fucosilados existen en la superficie de las células epiteliales de la mucosa en forma de antígenos de Lewis y H y son quimioatrayentes, además de ser fuente de carbono para algunos microorganismos. Se teoriza que *Blastocystis* ST1 recicla la fucosa y otros carbohidratos del hospedero para expresar moléculas glicosiladas en su superficie, para así poder evadir al sistema inmunológico del hospedero.⁷⁶

Blastocystis ST1 ha adquirido lateralmente diez genes involucrados en el metabolismo de nitrógeno. Entre los LGT, se ha encontrado una nitroreductasa, que está involucrada en la reducción de compuestos que contienen nitrógeno, permitiéndoles degradar compuestos tóxicos como los nitrofuranos y nitroimidazoles, como el metronidazol, el cual convierten en metabolitos mutagénicos, resultando en muerte celular.⁷⁶

También se ha observado que *Blastocystis* ST1 ha adquirido un gen que codifica a la 1,3-galactosiltransferasa (*b1,3GalT*) de animales. En humanos, este gen es responsable de la biosíntesis del grupo sanguíneo de Lewis y los respectivos determinantes ABH. Se hipotetiza que *Blastocystis* utiliza estos genes para sintetizar proteínas de membrana, que le servirán de camuflaje para sobrevivir en el hospedero. También se detectó la colesterol-alfa-glucosiltransferasa, que generalmente se ha visto en *H. pylori*, con la cual escapa de la fagocitosis por macrófagos, los cuales son estimulados por el contenido membranar

elevado de colesterol en su membrana. Este mecanismo se hipotetiza también para *Blastocystis*.⁷⁶

También se ha descrito una poliacetil sintasa tipo 1 de origen bacteriano en *Blastocystis* ST1, que puede contribuir a la disbiosis del hospedero y a la inflamación en IBS. Otro gen bacteriano para triptofanasa para producir indol se ha detectado. El indol se difunde pasivamente en las membranas e influencia varios procesos fisiológicos, incluyendo formación de esporas y biofilm, resistencia a antimicrobianos y virulencia. La adquisición horizontal de asparaginasa y aspartasa puede haber llevado a modificaciones metabólicas que le faciliten a *Blastocystis* subsistir en condiciones anaerobias.⁷⁶

Signos y síntomas

Las características clínicas de la blastocistosis no son específicas. Un estudio de 1991 en EE. UU. describió la presentación clínica inusual de la blastocistosis: "La queja más común de los pacientes con blastocistosis es de incomodidad abdominal intensa acompañada de dolor. La diarrea no se presenta en todos los casos y el estreñimiento es común. Los síntomas recogidos de la literatura incluyen, además: malestar, anorexia, hinchazón, calambres, estreñimiento, diarrea intermitente con estreñimiento, evacuaciones acuosas, vómitos, deshidratación, insomnio, náusea, pérdida de peso, incapacidad para trabajar, lacia, mareos, flatulencia, prurito y tenesmo."¹¹

La infección por este parásito puede generar síntomas extraintestinales, como comezón, rash cutáneo con hepatoesplenomegalia, eosinofilia, síntomas de reacciones alérgicas, así como sangrado rectal e infección de fluidos sinoviales. Se ha reportado sangre en heces, así como moco con presencia de leucocitos excesivos. Los síntomas varían de leve, moderado, hasta una manifestación aguda severa y situaciones crónicas. Como ya se mencionó anteriormente, algunos autores sugieren que el número de parásitos encontrados en las muestras de heces indicarán la severidad de la infección, aunque esto se mantiene en tela de juicio.^{2, 3, 16}

Este parásito puede ser identificado en heces de pacientes sintomáticos y asintomáticos. Se ha encontrado que los ST ST1 y ST3 se encuentran en mayor frecuencia en infecciones crónicas y en individuos monoparasitados sintomáticos, mientras que el ST2 se ha observado en heces de pacientes asintomáticos y en adultos mayores, aunque también se presenta en niños y adultos. La expresión de síntomas no equivale a la facilidad de detección –un ejemplo de esto es el ST2, el cual es más fácilmente detectado mientras que el ST 3 es difícil de detectar y puede permanecer indetectable en pacientes sintomáticos a pesar de múltiples pruebas de laboratorio.

Los ST 4, 6 y 7 parecen mostrar cierto grado de especificidad al hospedero, ya que sus únicos hospederos no humanos son roedores (ST 4) y aves (ST 6 y 7). Esta especificidad de hospedero puede ser responsable de la baja prevalencia de estos ST en estudios de la población humana, aunque aparecen con mayor frecuencia en estudios con muestras de pacientes sintomáticos, lo que sugiere la posibilidad de que estos pueden estar asociados con una infección aguda en humanos. Sin embargo, la cantidad de evidencia a la fecha es insuficiente y se necesitan investigaciones adicionales para entender las diferencias potenciales en el curso de la infección asociada con los diferentes ST. El ST4 ha mostrado una alta frecuencia en pacientes europeos con diarrea grave. En un trabajo realizado en Colombia se registró que a los pacientes con el ST1 eran asintomáticos, el ST2 se presentaba en individuos con diarrea y el ST3 estaba presente en individuos con el síndrome de colon irritable.^{5, 11}

La forma amebode de *Blastocystis* ST3 se ha encontrado en pacientes que presentan urticaria aguda, por lo que algunos autores sugieren que los síntomas cutáneos pueden ser causados por alteraciones a la homeostasis inmunitaria cuando el hospedero produce una respuesta inmunitaria contra las formas ameboides. También se tienen registrados casos en donde se observa la presencia de *Blastocystis* ST2 en un cuadro de síntomas gastrointestinales severos y urticaria crónica en ausencia de otros agentes infecciosos. Hay estudios que indican que el ST4 es un posible patógeno, debido a la alta frecuencia de este en pacientes con diarrea severa. También se ha sugerido que el ST8 podría también ser un subtipo patogénico.⁵⁶

Se ha observado que algunos pacientes con *Blastocystis* spp pueden estar también infectados por otros agentes patógenos, como por ejemplo *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Dientamoeba fragilis*. Incluso puede haber mejoría en estos pacientes por el tratamiento dado para *Blastocystis*, como metronidazol o trimetoprim-sulfametoxazol.⁶

Se ha propuesto recientemente la relación inversa entre la colonización de *Blastocystis* y las enfermedades intestinales. La microbiota intestinal en pacientes afectados por enfermedades intestinales como IBS y IBD son diferentes de las personas sanas.⁷⁷

Como ya se mencionó anteriormente, hay varios trabajos que relacionan a *Blastocystis* con el síndrome del intestino irritable (IBS). Este es un trastorno gastrointestinal altamente prevalente caracterizado por dolor abdominal con diarrea y/o estreñimiento; es a nivel mundial uno de los trastornos gastrointestinales más frecuentes con un impacto negativo en la calidad de vida y el estado socio-económico de los pacientes. Lo podemos definir como un grupo de desórdenes funcionales en el intestino en el que el dolor abdominal es constante y asociado con defecación o alteraciones en hábitos intestinales.^{11, 69} La etiología de esta enfermedad no ha sido completamente descrita. Se creía que el IBS era un trastorno psicossomático, pero más estudios recientes han identificado la activación inmunológica crónica en pacientes con este síndrome. Los costos anuales directos e indirectos de IBS en los Estados Unidos pueden ser tan altos como \$ 30 mil millones de dólares, por lo que es una de las enfermedades gastrointestinales más costosas en los Estados Unidos y otros países desarrollados. A diferencia de la gastroenteritis viral y bacteriana, los síntomas del IBS pueden durar indefinidamente. La naturaleza crónica de la enfermedad puede limitar las actividades normales de los pacientes.¹¹

La prevalencia relativa de los síntomas de dolor abdominal, diarrea y estreñimiento en la infección por *Blastocystis* spp e IBS muestran una notable similitud y las altas tasas de infección por *Blastocystis* spp en pacientes con IBS parecen confirmar esto. Investigadores de Pakistán y otros países han sugerido que el IBS puede ser causado por *Blastocystis* spp.¹¹ Un estudio de 2014 por *Nourrisson et al* sugirió que *Blastocystis* spp se puede usar como indicador de cambios en la microbiota; una menor abundancia de *Bifidobacterium*

spp. Y *Faecalibacterium prausnitzii* que tienen efectos protectores y antiinflamatorios, podría conducir a disbiosis intestinal y IBS.¹⁷

Diagnóstico

Blastocystis spp es uno de los numerosos parásitos intestinales buscados en heces en laboratorios clínicos de microbiología. Hay varios métodos para la detección de *Blastocystis* spp. La microscopía con tinción permanente es considerada uno de los estándares de oro para el diagnóstico en la mayoría de los laboratorios clínicos. La detección se lleva a cabo en observación directa y utilizando diversas tinciones, como por ejemplo la tinción con lugol, tinción tricrómica, Giemsa, Gram, hematoxilina férrica, naranja de acridina, entre otras. Aun así, se ha observado que esta tiene una baja sensibilidad para la detección de este patógeno (48%) a comparación de la PCR (94%).^{14, 34, 71}

Una metodología comúnmente utilizada es la de procesar cada muestra de materia fecal individualmente con el método directo en fresco teñido con Lugol y con el método de concentración por flotación de Faust o Ferreira. El análisis microscópico se realiza a 10x y 40x. La identificación de los parásitos se realiza de acuerdo con sus características morfológicas.⁷⁸

Los exámenes coproparasitológicos (CPS) de concentración son los adecuados para la identificación de quistes cuando se trata de materia fecal formada; pero si es diarreica, lo indicado son los CPS directos en fresco, a fin de identificar las demás fases del protozoo.^{14,42} A pesar de ser herramientas de trabajo muy utilizadas, los métodos fisicoquímicos tales como la técnica de concentración de formol-acetato de etilo (FECT) no necesariamente maximizarán la recuperación de todos los parásitos intestinales debido a sus diferentes gravedades específicas y sensibilidades a la formalina. En un estudio se determinó que las técnicas de concentración presentaron un bajo rendimiento en la obtención de parásitos protozoarios y de *Blastocystis* spp, la cual fue a su vez similar a lo obtenido en un examen directo; se sugirió que esto pudiera deberse a la fragilidad de los organismos, que podrían destruirse al ejecutar las técnicas.^{79, 80} Algunos aislados tienen un

tamaño de solo 6-8 μm , lo que hace detección microscópica difícil, especialmente cuando los parásitos están presentes en pequeños números. Las etapas vegetativas pueden confundirse con glóbulos grasos, leucocitos u otros artefactos en las heces. La infección con el ST3 se detecta con menos facilidad que la infección con ST 2 usando FECT. Como el ST 2 es menos probable que esté asociado con la monoinfección sintomática, este efecto puede ser responsable de producir resultados conflictivos entre los investigadores. Para mejorar las tasas de detección, un estudio informó el uso de una "muestra purgada", que implica el uso de un laxante.¹¹

Las grandes dificultades en el diagnóstico de la blastocistosis están dadas por la gran variedad de morfologías que presenta este microorganismo, lo cual dificulta su identificación por microscopia de luz convencional cuando el personal encargado del diagnóstico no está familiarizado con todas ellas. Ocasionalmente se pueden apreciar formas en fisión binaria en muestras de materia fecal. Conocer su distribución en la población humana es necesario para establecer la sensibilidad de las pruebas diagnósticas. Al igual que para otras infecciones por enteroparásitos, la excreción de *Blastocystis* varía de un día a otro, por lo cual se recomienda emplear varias muestras para aumentar las probabilidades de detectar este microorganismo tanto en los portadores asintomáticos como en los sintomáticos.²¹

Una de las tinciones ideales y ampliamente recomendadas es la tinción de hematoxilina férrica o la denominada "tricrómica de Gomori", ya que con esta se logra contrastar al parásito, haciéndolo detectable de manera más sencilla y observándolo de una coloración gris a verde. Esta muestra mejores resultados que el examen directo de materia fecal, aunque algunos autores consideran el cultivo como el estándar de oro para el diagnóstico de la blastocistosis.¹⁴

La tinción de Naranja de Acridina está diseñada para teñir los ácidos nucleicos, usados selectivamente para determinar el ciclo celular. Este interactúa con el DNA y el RNA por medio de intercalación, o fuerza de atracción electrostática, respectivamente. El DNA se intercala con naranja de acridina (Fluorescencia verde leída a 525 nm); el RNA por medio de atracción electrostática (Fluorescencia roja a menos de 630 nm). Esta tinción tiene la

ventaja de que enfatiza en varias fases de desarrollo del parásito, especialmente *in vivo*, permitiendo diferenciar a las distintas formas de vida, especialmente la forma quística, la cual es difícil de reportar con una tinción normal. En un estudio realizado con este fluorocromo, se pudo observar la presencia de células hijas en endogonia como una modalidad dominante de división *in vitro*, además de la predominancia de la división binaria *in vivo*. También se utiliza el colorante azul de Tripán para poder detectar la viabilidad celular y la concentración celular. En un estudio se eligió contar las muestras diariamente por cuatro días. Debido a que el número de células en los controles negativos declinaron después de las 92 horas, se realizó la evaluación por 4 días solamente.⁴

Este parásito se puede llegar a confundir con ooquistes no esporulados de *Cyclospora cayetanensis* y gotas de grasa, por lo que se debe tener un criterio amplio y una buena destreza visual para identificarlo correctamente. Para poder considerar un diagnóstico como positivo, ya se ha mencionado que la recomendación es que se confirme que haya de 3 a 5 estructuras por campo en muestras fecales, aunque también se ha llegado a considerar la sola presencia del parásito para un diagnóstico positivo.³

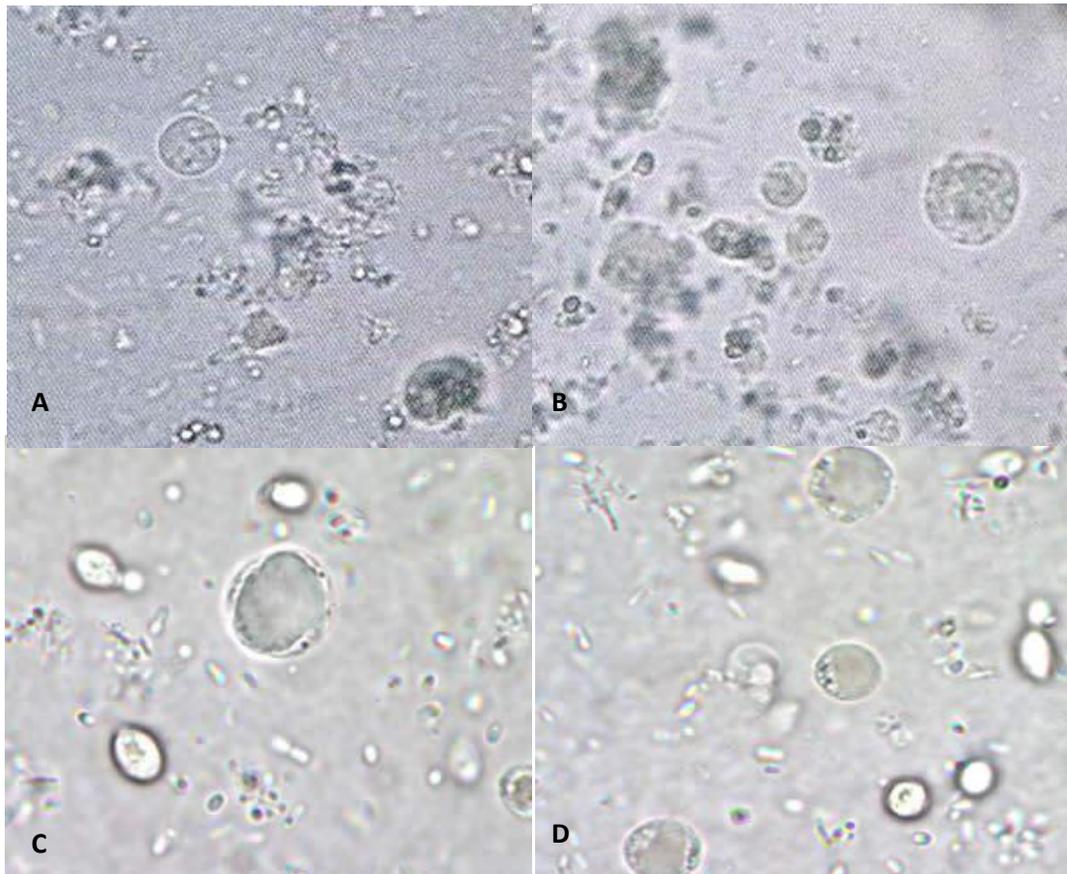


Figura 27.- Comparación entre ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* (A y B) y formas vacuolares de *Blastocystis spp* (C y D). Tomado de Burstein, S. (2005). Ciclosporiasis: una parasitosis emergente (II). Diagnóstico Microbiológico mediante una nueva técnica de coloración. Rev. gastroenterol. Perú.25:4; *Blastocystis hominis*.DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern.U.S Department of Human Health & Public Services Health. Consultado en: <https://www.cdc.gov/dpdx/blastocystis/index.html>.

La variación morfológica de *Blastocystis spp* complica su identificación, incluso para el personal de laboratorio experimentado. La forma vacuolar tiene un cuerpo central único y, para esta estructura, existe una baja posibilidad de dar un mal diagnóstico. Con la excepción de esta, las demás formas de *Blastocystis spp* pueden ser fácilmente confundidas con otros parásitos protozoarios intestinales. Además de la elevada tasa de proliferación de *Blastocystis spp*, otra de las razones por las que el cultivo de corto término *in vitro* del parásito debe ser idealmente utilizado es porque las formas que fácilmente

pueden ser confundidas pasarán a la fase vacuolar después de un corto tiempo gracias a sus características biológicas.⁷¹

Una de las opciones más viables para determinar el número de células de *Blastocystis* spp, consiste en contar 10 campos con objetivo de 40x, estando distribuidos sobre la preparación de la siguiente forma: dos en cada una de las esquinas, para un total de 8, y dos en el centro de la lámina; después del conteo, se obtiene el promedio de las células observadas en esos campo y se reporta el resultado. Opcionalmente, se puede reportar la presencia del parásito como más de cinco células por campo o menos de cinco células por campo. Hay que recordar que la emisión de *Blastocystis* spp se produce en forma discontinua, por lo que es importante analizar más de una muestra para evitar falsos negativos, el agua y diversas soluciones lisan al protozoario, produciendo falsos negativos.¹²

Una prueba de sensibilidad antimicrobiana simple para *Blastocystis* spp podría ayudar a asegurar que se administre el medicamento correcto e impedir el desarrollo de resistencia.⁵⁶ Las pruebas de susceptibilidad antiparasitaria para *Blastocystis* spp, así como el cultivo para protozoarios intestinales, han sido publicados escasamente en la literatura médica. *Stenzel y Boreham* mencionan que *Blastocystis* spp es un parásito anaerobio estricto, difícil para su aislamiento, lo cual se plantea como un factor limitante para estudiar al parásito; y la posibilidad de realizar pruebas de susceptibilidad antiparasitaria sería más difícil. La prueba de susceptibilidad antiparasitaria que se presenta para conocer el comportamiento del parásito *Blastocystis* spp, frente a diversos antimicrobianos, constituye una alternativa (en caso de validarse) de utilidad potencial para su aplicación en el tratamiento contra los protozoarios, así como en la vigilancia de la resistencia.⁸¹

Métodos moleculares

Los exámenes de detección de componente genómicos y antigénicos son los más sensibles y específicos, aunque no están disponibles para la mayoría de los laboratorios a escala internacional por su elevado costo (\$390-\$400 USD) a comparación de los métodos tradicionales, además de la necesidad de personal altamente especializado.

Se han hecho evaluaciones por medio de pruebas de ELISA para la detección de *Blastocystis* spp a partir de antígenos y anticuerpos para pacientes sintomáticos y asintomáticos. También se puede realizar una evaluación por medio de la prueba de inmunofluorescencia (IFA), llegando a tener un 70% de éxito al detectar anticuerpos para *Blastocystis* spp en pacientes infectados.^{14, 16}

Las infecciones causadas por *Blastocystis* spp inducen una respuesta inmunológica mediada por IgA e IgG, pudiendo ser detectados por medio de inmunoensayos como inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayo inmunoabsorbente vinculado a enzimas (ELISA). Estos métodos son tienen una sensibilidad y especificidad elevadas, aunque a la fecha no se utilizan con fines diagnósticos. Debido a que el conocimiento referente a la respuesta del hospedero ante *Blastocystis* spp es limitado todavía, además de que la diversidad antigénica del parásito es evidente, las pruebas y ensayos serológicos no son utilizados rutinariamente. Estas técnicas no se utilizan para el diagnóstico del parásito debido a la relación costo-beneficio mencionado anteriormente y porque muchos laboratorios no reportan a *Blastocystis* spp por la idea que algunos médicos tienen de que este parásito no es patogénico o porque el analista no tiene la capacitación necesaria para detectarlo.⁶

La reacción en cadena de polimerasas (PCR) ha sido ampliamente utilizada para la detección y estudio de este parásito, ya que *Blastocystis* spp es antigénicamente y genéticamente no similar entre las diversas especies reportadas.⁸² Esta técnica ha demostrado ser una herramienta rápida y altamente sensible para la identificación del

parásito y la detección de variantes genéticas de este. Por medio de esta se han logrado identificar diferentes ST del parásito y encontrar evidencias epidemiológicas que han permitido discernir entre aquellos ST que afectan tanto humanos como animales o aquellos que solo están presentes en animales o en humanos. Las variaciones genéticas han sido consideradas para la amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD) y la restricción de longitud de tamaño de polimorfismo (RFLP) por medio de la exanimación de la amplificación por una PCR de SSUr RNA.³

La amplificación del DNA de *Blastocystis* spp obtenidas de muestras frescas de heces o de cultivos es conveniente para el uso en estudios epidemiológicos, de mapeo y genotipificación. El desarrollo de la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (PCR) como método de diagnóstico sensible y rápido para *Blastocystis* spp y su habilidad para diferenciar los diferentes genotipos del parásito será también de suma importancia en el mapeo y en estudios epidemiológicos.⁴³

El diagnóstico por medio de la PCR debe considerarse cuando no se pueda identificar otro agente infeccioso.⁵⁶

El estudio molecular de *Blastocystis* spp en muestras de heces utilizando estas técnicas nos proporciona mejores datos epidemiológicos y ayudan a las investigaciones que buscan explicar su patogenicidad. Sin embargo, la detección por PCR de *Blastocystis* spp en las muestras de heces es bastante insensible. Por lo tanto, el desarrollo de un método para el aislamiento y evaluación del parásito con alta sensibilidad y especificidad es de primordial importancia. Se requiere la extracción de DNA antes de la PCR, lo que se dificulta debido al tipo de muestra que se maneja al detectar a *Blastocystis* spp (heces). Por ello el cultivo *in vitro* es útil para la detección por microscopía óptica y también para estudios moleculares utilizando PCR debido al aumento del número de parásitos viables y en una muestra menos contaminada.⁸³

Cultivo

El cultivo *in vitro* para este parásito intestinal es un buen método establecido para la detección y/o confirmación del parásito. Ha sido sugerido como un método diagnóstico que puede ofrecer buena sensibilidad y en algunos casos bajo costo. Se toma en algunos estudios como el “estándar de oro” para el diagnóstico de *Blastocystis spp* en muestras fecales por medio de la realización de un frotis simple y usando también la tinción tricrómica.⁴⁰ Este es exitoso siempre y cuando se inocule una muestra con una elevada carga parasitaria de *Blastocystis spp*. Se utiliza principalmente cuando existe duda de que el paciente presente la infección por este parásito, y en estos casos se utiliza como método confirmatorio.⁵

En estudios de crecimiento del parásito, el tiempo de generación de *Blastocystis spp* en cada parámetro diferente se calcula de acuerdo a la ecuación: $T_g = (T_2 - T_1) / (\log_2(n_2/n_1))$, en donde T_g denota el tiempo de generación, n_1 denota el número de células cultivadas en el tiempo inicial (T_1) y n_2 representa el número de células en el tiempo final (T_2) en el cultivo *in vitro*.^{10, 71}

Se ha evaluado diferentes medios de cultivo con respecto al crecimiento de *Blastocystis spp*, encontrando que la T_g varía en relación a las variaciones de los cultivos; esto se piensa que se debe a que *Blastocystis spp* es fácilmente afectado por el ambiente intestinal y sus cambios (como osmolaridad, variaciones en la composición de la microbiota, hospedero, dieta, entre otros.), que conllevan a la eventual pérdida de infección, lo que explica la remisión espontánea, que ha sido ya reportada en algunos trabajos.¹¹

El cultivo xénico (con presencia de bacterias) de *Blastocystis spp* es útil para detectar al parásito y puede ser realizado a partir de heces, a fin de apoyar en el diagnóstico en caso de que al examinar las muestras por microscopia, la morfología no sea contundente o la cantidad de estructuras parasitarias sea baja.¹¹

El cultivo en medio axénico es considerado, de igual modo, el estándar de oro para la detección de *Blastocystis* spp. Este método es más sensible que la microscopia, pero no está disponible en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico. También se utiliza este medio para el estudio de *Blastocystis* spp, principalmente en investigación. Estos medios contienen cepas puras de *Blastocystis* spp, siendo útiles principalmente en el análisis con PCR. Un ejemplo de esto también es propuesto por *Kukoschike et al.*⁸⁴

Uno de los primeros trabajos que se hicieron para cultivar a *Blastocystis* spp se remonta a la primera parte del siglo XX, donde Barret utilizó un medio de cultivo líquido, consistente en suero humano al 10% y una solución de cloruro de sodio 0.5%; con lo que se lograron obtener formas de *Blastocystis* spp en el fondo del cultivo.⁸⁵

Otro de los medios que se utilizaron inicialmente fue el medio de Jones, el cual consiste en suero de equino estéril, solución de marmita, buffer de solución salina (pH 7.2) y almidón de arroz. Hoy en día se utiliza el medio modificado de Jones, que consiste en una solución de sales (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 y NaCl), suero de equino 10% y extracto de levadura.^{86, 87}

Se ha propuesto que *Blastocystis* spp crece en medios estrictamente anaerobios a 37° C. Cuando se observan formas vacuolares, se recomienda realizar un cultivo en el medio de Lowenstein-Jensen, incubando por 48 horas en condiciones anaerobias para obtener colonias muy brillantes y mucosas. Se pueden resuspender en SSF para poder observar al microscopio las estructuras parasitarias.² Se pueden utilizar los medios Dobell y Laidlaw cubierto con la solución de Ringer suplementado con 20% de suero humano y sulfato de estreptomicina, medio mínimo esencial enriquecido con suero de equino al 10%, Medio de suero tripticasa de Diamond, medio monofásico, medio de Loeffler cubierto con la solución de Ringer con suero humano al 20%, y el medio Dulbecco modificado de Isocove enriquecido con suero de equino al 10%.³

También se puede utilizar el medio de Pavlova para una buena observación de *Blastocystis* spp. Este medio utiliza suero de caballo, aunque se ha reportado el uso de suero humano para obtener el mismo resultado.⁶⁸

Los cultivos xénicos y monoxénicos se pueden mantener vivos con el medio de Jones o Boeck-Drbohlav. *Blastocystis* spp puede crecer tanto en medios sólidos como en líquidos. Las colonias pueden sobrevivir hasta dos semanas y pueden preservarse tanto en medio sólido como líquido. El medio RPMI permite observar formas vacuolares solamente.⁴

Una metodología utilizada para realizar cultivos de *Blastocystis* spp de manera estandarizada es la que proponen Kukoschike *et al*:

“Los cultivos son incubados el día en que las muestras fecales son recibidas; se utilizan 100 µL de líquido en muestras diarréicas y 100 mg de muestras sólidas, inoculándolos en el medio de cultivo, el cual se mantiene anaerobio en una atmósfera libre de oxígeno a 36°C por una semana antes de usarlos. Los cultivos son incubados en condiciones de anaerobiosis por 5 días. *Blastocystis* spp crecerá como sedimento en la base del medio de cultivo. Para realizar un subcultivo, la mitad del sedimento celular debe transferirse después de cinco días a otro medio preincubado”.⁸⁴

Los subcultivos se realizan transfiriendo la mitad del sedimento celular en 1-5mL de sobrenadante a un tubo atemperado. Estos subcultivos son incubados por 5 días antes de volverlos a transferir. Las bacterias extracelulares se eliminan en presencia de ampicilina (4g/l), estreptomycin (1g/L) y colistina (1.5-4 mg/L) después de 8-10 transferencias. Los cultivos que no presentan bacterias extracelulares después del examen microscópico se evalúan para crecimiento microbiano en un subcultivo en agar sangre, incubando a 36°C por tres días en condiciones aerobias y anaerobias. Los cultivos que no muestran crecimiento microbiano son designados como axénicos. Para minimizar la producción de anticuerpos dirigidos contra componentes del medio de cultivo, se utiliza suero de conejo al 25% v/v para el cultivo.⁸⁴

Tratamiento

Se sigue discutiendo si los pacientes infectados con *Blastocystis* spp requiere de tratamiento. Lo que la mayoría de los médicos sugieren es de que sólo se trate a los sintomáticos (síntomatología crónica de diarrea y dolor abdominal en ausencia de otros agentes patógenos, lo cual se determina por medio de la evaluación de las muestras fecales) con antiparasitarios, aunque varios investigadores se oponen a este tipo de pensamiento.

Debido a la gran controversia que rodea a *Blastocystis* spp, junto a la naturaleza autolimitante de los síntomas, el tratamiento de esta enfermedad puede ser equívoco.⁴ Los fármacos de elección contra este parásito deben cumplir con dos requisitos muy importantes: Concentrarse en el colon y no ser degradados por la flora intestinal. Se han utilizado diferentes tipos de medicamentos para tratar esta parasitosis, cada uno de estos tienen una amplia variabilidad en el grado de curación y erradicación del parásito, observado en las heces del paciente.⁵² La mayoría de los estudios de caso reportan tratamiento con metronidazol, aunque se tiene reportado el uso de otros fármacos utilizados contra esta infección como: Emetina, Furazolidona, Iodoclorhidroxiquina, pentamidina, Trimetoprim-Sulfametoxazol, etc.^{6, 16}

Se han registrado casos en los que la remisión de los síntomas causados por *Blastocystis* spp se dan gracias al tratamiento dirigido a este parásito. Por ejemplo, en un caso de 2007, en Perú, se describió la mejoría de los síntomas y signos de urticaria en una paciente que presentaba angioedema, con afectación en la cara, y acompañada de urticaria recurrente después de administrar el tratamiento antiparasitario.⁸⁹

El Metronidazol es un Nitroimidazol, considerado el fármaco de primera elección para el tratamiento de infecciones parasitarias. Este fármaco induce a apoptosis en el parásito, lo que provoca en *Blastocystis* spp una disminución en el tamaño celular, condensación y marginalización de la cromatina, vacuolización y la formación de cuerpos apoptóticos.⁹⁰ Con este tratamiento, la mayor parte de los pacientes alcanzan remisión clínica (88%) y una erradicación fecal a los 6 meses (80%) El Metronidazol se ha prescrito en una dosis

que varía desde los 250 mg hasta los 750 mg 3 veces al día, durante 10 días, llegando a 12.25 g por día durante el mismo periodo de tiempo. Se utiliza sólo o en combinación con otros fármacos como la paramomicina o el clotrimoxazol.⁵²

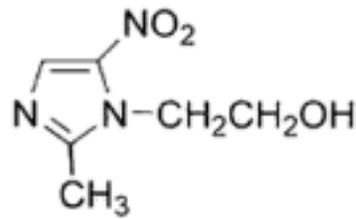


Figura 28.- Estructura del Metronidazol. Tomada de Raviña, E. (2008). Medicamentos: Un viaje a lo Largo de la evolución del descubrimiento de fármacos, Vol. 1. Univ Santiago de Compestela, p. 150.

A pesar de esto, se ha ido reportando cada vez más frecuentemente la resistencia a este antiparasitario, llegando a ser poco efectivo debido a la amplia variabilidad de respuesta que presenta el parásito. En estos casos, debido a esta variabilidad, se sugiere que sólo se dé terapia a pacientes con síntomas persistentes.⁵²

La forma en la que la en Metronidazol actúa en aislados de *Blastocystis* aún no se ha descrito claramente, por lo que se discute todavía si el mecanismo de acción actúa directa o indirectamente sobre *Blastocystis* spp o a través de la inhibición/erradicación de microorganismos relacionados con este parásito.⁹¹ Estudios han sugerido un mecanismo que permite que *Blastocystis* spp produzca un elevado número de células viables al regular el proceso apoptótico en respuesta al tratamiento con Metronidazol, lo que sugiere que este antiparasitario deba ser utilizado a la más alta concentración posible para tratar infecciones con este parásito. Esto no es lo más adecuado debido a los posibles efectos secundarios relacionados al tratamiento con metronidazol, como náusea y vómito. Además, se pudo constatar que nunca hubo una erradicación total del parásito, lo que sugiere que el metronidazol no tiene un efecto completo sobre *Blastocystis* spp.⁹²

Uno de los estudio demostró que la apoptosis en *Bastocystis* spp está relacionada al ST y que ocurre mediante una vía caspasa dependiente y un pequeño porcentaje de células pasan por vías independientes de caspasas. En este describía que previamente se había demostrado la existencia de formas viables apoptóticas (VA) y que estas

podrían ser las fases transicionales para desencadenar la formación y liberación de formas vacuolares, en correlación con las células apoptóticas y viables en ST tratados con metronidazol. También se propuso que el fármaco pudo haber desencadenado la permeabilidad en la membrana de las estructuras tipo mitocondria, resultando que en el citocromo C (Cyt C) se libera en el citosol, provocando los eventos río abajo de los mecanismos apoptóticos. Cuando las células son activadas bajo ciertos tipos de estrés, algunas formas vacuolares entran en apoptosis, pudiendo dar lugar a las formas granulares, las cuales a su vez liberarán la progenie en formas vacuolares con el propósito de propagarse. Esto es importante, ya que se ha visto que las formas granulares presentan otro tipo de reproducción asexual diferente a la fisión binaria, por lo que el fármaco podría estar aumentando el potencial reproductivo del parásito, diseminando gránulos reproductivos.⁹³

No han sido pocos los estudios que se han hecho para evaluar la susceptibilidad de *Blastocystis spp.* a estos antimicrobianos. A raíz de estos estudios se ha determinado que, aparentemente, los diversos ST del parásito muestran diferentes patrones de susceptibilidad y que el metronidazol no es el tratamiento más efectivo para *Blastocystis spp.*⁴ Existe la posibilidad de una correlación entre los ST del parásito y la resistencia a antimicrobianos, pero aún no se ha comprobado esto. Varios otros estudios clínicos y experimentos sugieren fuertemente que el tratamiento con probióticos puede ayudar a combatir la infección por *Blastocystis spp.*, así como otras infecciones gastrointestinales severas.⁷

Trimetoprim-sulfametoxazol es el fármaco de segunda elección para los pacientes a los que el metronidazol no les ha funcionado. Esto se debe a que presenta una buena respuesta al tratar a pacientes con infección de *Blastocystis spp.*, aliviando los síntomas y aumentando el grado de curación de estos. El TMP-SMX ha mostrado ser el fármaco más adecuado para actuar contra todos los ST.⁹² También ha mostrado una erradicación de alto grado en estudios clínicos, así como en estudios *in vitro*.

Por esto es que llega a ser considerado superior al Metronidazol en el tratamiento, quitando los efectos secundarios. Está recomendado cuando el Metronidazol no ayuda a

eliminar los síntomas. Aún está por definirse si el efecto de este fármaco consiste en atacar directamente al parásito o erradicar a las bacterias, la supuesta fuente primaria de alimento para *Blastocystis* spp.⁵² Asimismo, la paramomicina, un antibiótico aminoglicósido de amplio espectro, también se ha demostrado como buen tratamiento para *Blastocystis* spp asociado a lesiones cutáneas, especialmente la urticaria.^{16,52}

La paramomicina es actualmente uno de las opciones de tratamiento recomendadas por el centro de control de enfermedades (CDC) y las pautas terapéuticas australianas (Australian Therapeutic Guidelines) para varios parásitos entéricos, en los que se incluye a *Blastocystis* spp. Se han reportado casos en los que el fármaco presenta una efectividad elevada; en contraparte, se han hecho estudios *in vitro* en donde se ha demostrado que llega a ser completamente inefectivo. En un estudio, se demostró que, a pesar de que en concentraciones bajas, el número de parásitos no superó al del control, hubo una alta cantidad de células aún en las concentraciones más elevadas. Además, la Paramomicina es un fármaco aminoglicosido de baja absorción, por lo que no actuará de forma eficiente a nivel *in vivo* y no se recomienda como un tratamiento ideal.⁹²

La Nitazoxanida, un 5-nitrotiazol antiparasitario de amplio espectro, también presenta un efecto potente contra *Blastocystis* spp. Los rangos de erradicación del parásito en los niños al ser tratados con este fármaco van del 97 al 100 % de éxito, presentando una buena tolerancia por parte de los pacientes y sin efectos adversos severos, de acuerdo a lo que se ha reportado.⁵²

La ivermectina y el albendazol son utilizados comúnmente como antihelmínticos que no han sido muy evaluados como opción terapéutica contra *Blastocystis* spp. Se ha llegado a la conclusión de que estos dos fármacos pueden servir como opciones terapéuticas en la blastocistosis.⁹

Un tratamiento alternativo que va tomando fuerza es el uso del Óxido Nítrico (NO), el cual tiene como objetivo las cisteín proteasas que el parásito llega a producir, eliminando estas proteasas que causan la destrucción de los anticuerpos IgA. Esto se debe a su efecto oxidante, y los fármacos que liberan NO han sido utilizados previamente para tratar otras

infecciones parasitarias como la de *Plasmodium falciparum*, *Trichomonas vaginalis* y promastigotes de *Leishmania* spp. Ejemplos de estos fármacos son el nitrito de sodio, cuyo efecto antiparasitario fue demostrado en un trabajo de *Omima et al* (2008), sugiriendo el uso de medicamentos donadores de NO para tratar efectivamente la blastocistosis. Sin embargo, también puede conducir al daño celular y a la falla de la barrera intestinal, además de estar involucrado en la patogenia de muchos procesos inflamatorios y enfermedades autoinmunes, por lo que recomienda seguir la investigación de estos para tratar la blastocistosis antes de utilizarlos rutinariamente para esta enfermedad.²¹

Se necesitan estudios controlados para evaluar la eficacia de estos medicamentos, cuyo estudio podría ayudar a confirmar el papel patogénico de esta infección. Los distintos tratamientos han sido registrados a lo largo de los años, pudiendo determinar el grado de fracaso terapéutico de los fármacos utilizados para tratar al parásito; sin embargo, se necesitan realizar estudios más profundos para determinar los tipos de antiparasitarios efectivos contra los diferentes ST del parásito, así como las concentraciones ideales para su erradicación.⁹⁴

Hay estudios que incluso recomiendan el tratamiento con probióticos para ayudar a tratar la infección, utilizando a *Saccharomyces boulardii*. Esta levadura ha mostrado tener efectividad al interferir en vías de señalización, regulando la microbiota e interfiriendo con la habilidad de los agentes patógenos para colonizar el tracto digestivo, modulando la respuesta inmunitaria, estabilizando las funciones de la barrera gastrointestinal e induciendo actividad enzimática para favorecer la absorción y la nutrición. Otros estudios indican que la monolaurina y *Lactobacillus* podrían ofrecer una alternativa terapéutica para utilizar como complemento al tratamiento con antimicrobianos convencionales.⁷

La falla en la erradicación del parásito

Las diferencias entre la tasa de respuesta clínica y la tasa de respuesta microbiológica pueden deberse a varias posibilidades: el número de parásitos puede haber disminuido, lo que produce una mejoría clínica pero no logra erradicar definitivamente la parasitosis, o

como se ha reportado en el caso del Metronidazol, el fármaco podría haber actuado indirectamente mediante al inhibir otros microorganismos patógenos no identificados responsables de algunos signos y síntomas del paciente, pero sin erradicar al parásito, que causa la enfermedad.⁹⁴

Hay varias razones para explicar el fracaso del tratamiento antiparasitario. Este confiere al parásito una mejora en el potencial reproductivo en primera instancia, especialmente si no se le da el seguimiento adecuado a la dosis prescrita por el médico. En el caso del tratamiento con Metronidazol, se ha visto que pueden influir diferentes razones: la inhabilidad de los aislados de *Blastocystis* para inducir a la forma tóxica del metronidazol debido a la falta de los genes *ntry/o nim* que están presentes en las especies de *Giardia* y *Entamoeba*; la inhabilidad del fármaco para alcanzar concentraciones elevadas en el lumen colónicos; riesgos elevados de reinfección en zonas endémicas; diferentes interacciones de la flora intestinal y el parásito; se ha observado que este fármaco puede provocar la reversión a la forma granular del parásito, además de la liberación de gránulos reproductivos que darán lugar a un aumento en la cantidad de parásitos presentes en la muestra y, por ende, los observados al microscopio y en cultivos en la fase post-tratamiento. Además, las formas quísticas de este microorganismo son genéticamente heterogéneas y debido a ello presentan una resistencia significativa al efecto citotóxico del fármaco.^{52, 91} En este caso, podríamos describir el problema, en vez de resistencia al antiparasitario, como una pobre eficacia del metronidazol.

Principalmente, la elección de la erradicación depende de los ST de *Blastocystis* spp, región geográfica de ocurrencia, patogenicidad, sistema inmune del hospedero, microbiota intestinal humana, o enfermedades crónicas, como la diabetes.¹⁵

Se ha encontrado que los ST 4 y 7 presentan resistencia al Metronidazol y también exhiben una resistencia cruzada al tinidazol. *Nasirudeen et al* reportaron que el metronidazol induce al parásito a una muerte celular programada, en donde la vacuola central actúa como un repositorio en donde los cuerpos apoptóticos se almacenan antes de ser liberados en el espacio extracelular. Se conoce poco acerca de cómo este fenómeno puede afectar la efectividad del fármaco, aunque se tiene registrado que los

organelos tipo mitocondria tienen un rol en la reducción de ferredoxinas en el subtipo 7 que tiene un rol en la conversión del metronidazol a su forma activa.⁵²

En un estudio, el Omidazol mostró ser altamente efectivo contra protistas como *Dientamoeba fragilis*, el cual es un comensal que se encuentra comúnmente en conjunción con *Blastocystis* spp en muestras de heces. Aun así, sólo tuvo efecto a su concentración más alta, por lo que no lo consideran un fármaco ideal para el tratamiento de *Blastocystis* spp.⁹²

También se encontró que en la terapia triple con Furazolidona, Nitazoxanida y Secnidazol, sólo el último presentó efecto, pero tal y como ocurrió con el Metronidazol en el mismo estudio, después presentó un aumento en el número de células viables a comparación del control.⁹²

Por lo anterior nos hemos planteado la siguiente pregunta:

¿Es posible evaluar la sensibilidad de antiparasitarios de *Blastocystis* spp mediante un modelo *in vitro*?

Esto se ha realizado en algunos estudios; sin embargo, en México no se tiene registro del uso de estas técnicas para el diagnóstico de la blastocistosis a nivel clínico. La tecnología que hay para identificar al parásito permite detectar su presencia e incluso el subtipo del que se trate (utilizando herramientas moleculares) de manera eficiente. La problemática que surge con este tipo de herramientas es que presentan un costo de operación bastante elevado, obteniendo resultados que pueden ser equiparables a lo obtenido por un examen coproparasitológico de rutina. Aunado a esto, los médicos aún no le dan la suficiente relevancia a este parásito, y junto con ellos también varios analistas clínicos, que pueden no reportarlo en los estudios por omisión. Debido a esto, surge la necesidad de estandarizar un medio de cultivo sencillo y económico, que nos permita tener un diagnóstico confirmatorio de *Blastocystis* spp; además de estandarizar una prueba de evaluación de su resistencia a antiparasitarios, pues como ya se ha mencionado, el microorganismo puede llegar a ser resistente a los medicamentos de primera línea prescritos para tratar la infección.

Objetivo General

-Estandarizar un sistema *in vitro* para evaluar sensibilidad a antiparasitarios para *Blastocystis* spp utilizando el medio de cultivo Suero Salino de Barret.

Objetivos Particulares

- Estandarizar el uso del medio de cultivo xénico suero-salino de Barret para el cultivo de *Blastocystis* spp.
- Diseñar un modelo *in vitro* para evaluar la sensibilidad a antiparasitarios de *Blastocystis* spp.
- Evaluar la sensibilidad a metronidazol de *Blastocystis* spp, a partir de aislamientos de pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Justificación

En México, *Blastocystis* spp, es el parásito que con más frecuencia se reporta (2.0% a 41.7%) en los exámenes coproparasitoscópicos.⁷⁸

En el laboratorio de parasitología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, *Blastocystis* spp es el parásito que más se identifica en las muestras fecales, como infección única o múltiple; la frecuencia de *Blastocystis* spp en los últimos tres años, según registros del laboratorio de Parasitología, ha sido de 14.44% en 2016, 18.53% en 2017 y 18.65% en 2018, en promedio de 17.21% de frecuencia en el laboratorio; además, se ha encontrado que el 70 % de las parasitosis por este microorganismo son únicas, mientras que el 30% restante se encuentra en asociación a otros parásitos, como lo son *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba histolytica/dispar* y *Endolimax nana*. Es actualmente el parásito más frecuente reportado en niños atendidos en la institución. En un artículo de

2015 se reportó que de 1990 al 2010 se vio un aumento de casos reportados, principalmente porque antes de 1998 no se reportaba al parásito, hasta que en ese año se le dio la categoría de patógeno en el hospital. Desde entonces y hasta la fecha, sigue siendo el parásito más reportado en el laboratorio de rutina de parasitología de la institución, con una prevalencia del 21.8% del total de las muestras.^{81, 95}

Existen reportes en la literatura internacional acerca de resistencia al antiparasitario de primera elección, que es el Metronidazol, al momento de la realización de este trabajo no existe información al respecto en México, por lo que es de nuestro interés estandarizar un modelo *in vitro* que permita evaluar la sensibilidad a antimicrobianos de *Blastocystis* spp particularmente útil en los casos que la infección sea persistente a pesar de tratamientos repetidos.

Hipótesis

La estandarización *in vitro* del cultivo de *Blastocystis* spp en el medio de cultivo Suero-Salino de Barret, para evaluar la sensibilidad a antiparasitarios, nos permitirá conocer la susceptibilidad de *Blastocystis* spp de diferentes muestras de pacientes al Metronidazol.

Procedimiento Experimental

Material y Métodos

Diseño de Investigación

Se trata de un estudio observacional, descriptivo y prospectivo.

La experimentación se llevó a cabo en dos fases. La primera de ellas correspondió a la estandarización del medio de cultivo xénico Suero salino de Barret para lograr el desarrollo

de *Blastocystis* spp a partir de muestras de heces de pacientes pediátricos, a las cuales se les observó *Blastocystis* spp por microscopia.

La segunda parte incluyó el diseño de un modelo *in vitro* para evaluar la sensibilidad a metronidazol de *Blastocystis* spp empleando diferentes concentraciones del fármaco.

Estandarización del medio de cultivo xénico Suero-Salino de Barret

De la revisión de la literatura se eligió el medio Suero-salino con base a la experiencia previa de uso en el Laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil de México²², debido a que los reactivos y material son accesibles y por la facilidad de manejo y conservación.

Materiales

Tubos cónicos de 2 mL

Tubos de vidrio de 13 X 100 mm

Hemocitómetro (American Optical)

Cubreobjetos para Hemocitómetro rectangular de 20x26 mm (Manufactura de Espejos S.A.)

Pipetas pasteur

Micropipetas (20-200 µL)

Puntas para micropipetas

Portaobjetos

Cubreobjetos

Hemacitómetro

Aplicadores de madera

Reactivos

Solución salina fisiológica (SSF)

Suero Fetal Bovino inactivado

Lugol parasitológico (Hycel, concentrado)

Eosina nigrosina (Hycel) al 1%

Equipo

Estufa 37°C

Microscopio óptico

Material biológico

Muestras de heces positivas con *Blastocystis* spp

Software

GraphPad Prism V.6

Procedimiento

- Preparar los sistemas con medio de cultivo en tubos cónicos de 1.5 mL para determinar la concentración óptima de suero fetal bovino de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla 5.-Concentraciones de suero fetal bovino para medio de cultivo de *Blastocystis* spp

Concentración de SFB %	Suero fetal bovino (μL)	SSF (μL)
0	0	1000
5	50	950
10	100	900
20	200	800
40	400	600

- Homogeneizar aproximadamente 1 g de heces con 10 mL de SSF.
- Inocular 500 μL de la suspensión de heces a cada tubo, cerrar herméticamente.
- Incubar a 37°C
- Revisar los cultivos a las 24, 48, 72 y 96 hrs, mediante un examen directo con SSF y lugol.
- Observar al microscopio con el objetivo 40 X.
- Contar en hemocitómetro las estructuras parasitarias presentes en los cultivos, utilizando la cuadrícula para leucocitos.
- Evaluar la viabilidad de las formas parasitarias mediante la exclusión del colorante Eosina al 1%. Las formas parasitarias que se observan teñidas de rosa se

consideran no viables, por el contrario las que no se contrastan y se ven incoloras se consideran viables.

- Contar 100 células y reportar en % de viabilidad.

Estandarización del sistema in vitro para evaluación de sensibilidad a metronidazol

Después de establecer las condiciones de trabajo para el medio suero salino de Barret, y con base a lo previamente reportado en la literatura, se procedió a diseñar un sistema para evaluar la sensibilidad a metronidazol de *Blastocystis* spp *in vitro*.

Material biológico

-Cultivos de *Blastocystis* spp obtenidos a partir de muestras de pacientes pediátricos, identificadas como positivas mediante microscopia, con viabilidad mayor a 95%. Los aislamientos se mantuvieron mediante pases cada 4 días utilizando el mismo medio de cultivo.

Material

Hemocitómetro

Reactivos

-Metronidazol en solución inyectable, concentración de (5mg/mL) PISA.

Equipo

Estufa

Microscopio

Software

GraphPad Prism V.6

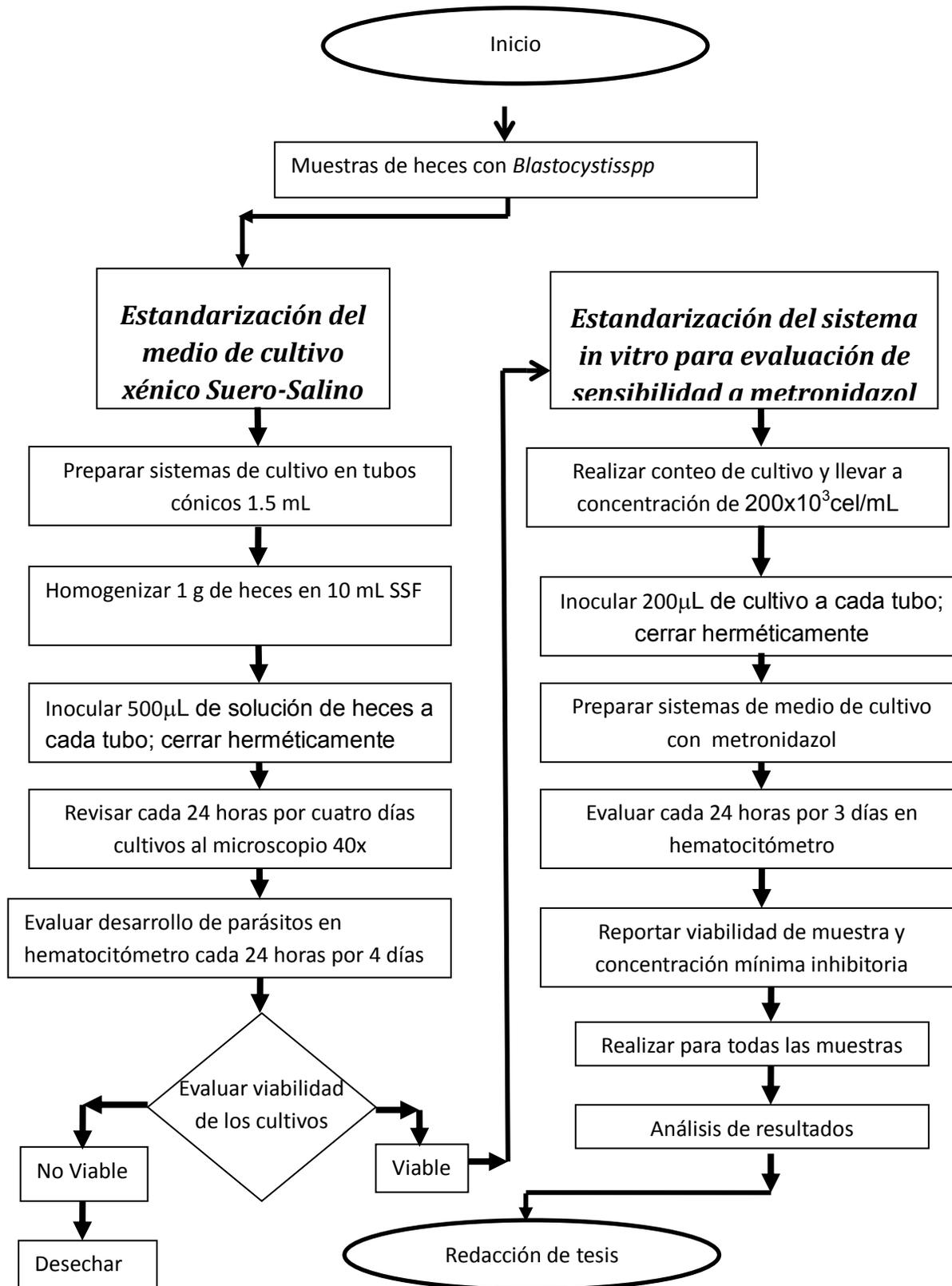
- Realizar un conteo con hemocitómetro del cultivo de *Blastocystis* spp a utilizar, para posteriormente llevarlo a una concentración de 200×10^3 cel/mL con SSF
- Preparar los diferentes sistemas de prueba para sensibilidad a Metronidazol, incluyendo testigos (+) y (-), de acuerdo a las siguientes tablas:

Tabla 6.- Matriz reactivos para cultivo de prueba de susceptibilidad de *Blastocystis* spp

		Concentración de Metronidazol $\mu\text{g}/\mu\text{L}$				
Volumen μL	Control (-)	125	500	1250	2500	Control de muerte con calor
Suspensión parásitos	200	200	200	200	200	200
SFB	50	50	50	50	50	50
MTZ(5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0	50	100	250	500	0
SSF	750	700	650	500	250	750

- Contar en hemocitómetro las estructuras parasitarias presentes en los cultivos, utilizando la cuadrícula para leucocitos, a las 24, 48 y 72 horas.
- Evaluar la viabilidad de las formas parasitarias mediante la tinción con Eosina al 1%. Las formas parasitarias que se observan teñidas de rosa se consideran no viables, por el contrario las que no se contrastan y se ven incoloras se consideran viables.
- Contar 100 células y reportar en % de viabilidad.
- Determinar la Concentración inhibitoria mínima (CIM), la concentración del fármaco en donde hay menor desarrollo en comparación con el control negativo y la concentración inhibitoria 90 (CI90).

Diagrama de Flujo



Resultados:

Estandarización del medio de cultivo xénico Suero-Salino de Barret

Se trabajó con 30 muestras de heces de pacientes pediátricos de entre 1 y 18 años con un promedio de edad de 11 años, 50% femeninos y 50% masculinos; a quienes previamente les fue solicitada la búsqueda intencionada de parásitos, y de las que se identificaron por microscopia formas vacuolares de *Blastocystis* spp. El 10% de muestras mostraron alteración en su consistencia.

Ocho de las muestras positivas se inocularon en el medio de cultivo xénico suero salino de Barret variando la concentración de SFB con los siguientes resultados:

Tabla 7.- Resultados de la evaluación cuantitativa del desarrollo de *Blastocystis* spp en el medio de cultivo a diferentes concentraciones de SFB

Concentración de SFB %	Evaluación cuantitativa del desarrollo ^a Concentración células viables x10 ⁵ /mL			
	24 hr	48 hrs	72 hrs	144 hrs
A				
0	13	1	1	0
5	14	5	6	0
10	9	5	6	1
20	15	15	26	46
40	32	125	150	52
B				
0	8	3	0	0
5	12	13	5	0
10	12	13	7	25
20	13	39	42	33
40	12	41	51	102
C				
0	3	1	1	0
5	8	8	3	3
10	8	8	6	3
20	8	11	6	3
40	14	11	10	25
D				
0	12	7	0	0
5	22	25	8	5
10	24	60	62	86
20	30	204	190	110
40	45	230	180	117
E				

0	4	6	0	0
5	4	6	1	1
10	5	6	2	2
20	5	6	3	36
40	6	5	5	2
F				
0	12	4	2	2
5	25	25	12	2
10	25	54	46	18
20	25	63	33	7
40	25	52	94	90
G				
0	10	4	2	2
5	17	14	3	0
10	16	30	39	35
20	20	15	24	68
40	17	23	23	57
H				
0	14	4	0	0
5	17	14	23	10
10	17	16	25	45
20	20	20	47	8
40	20	27	44	11

^aConteo en hemacitómetro de células viables.

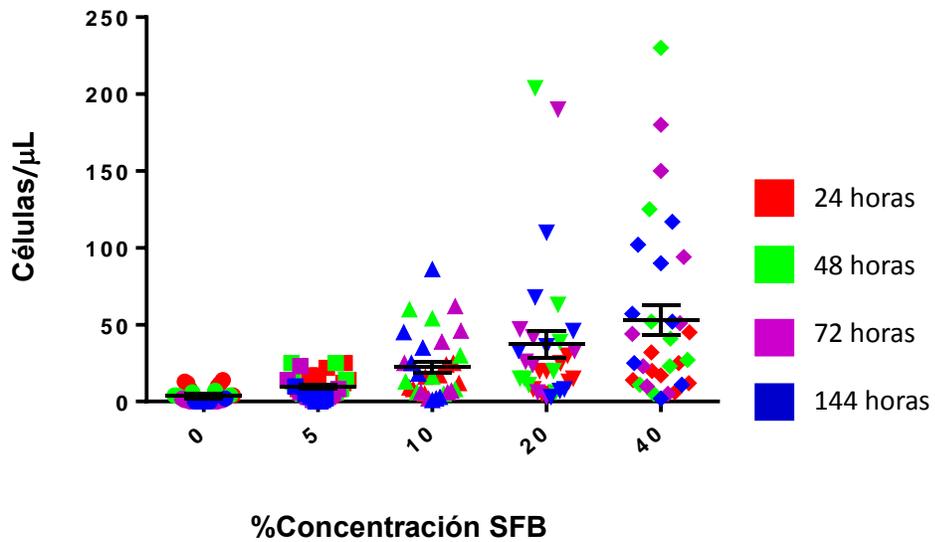


Figura 29.- Gráfica del desarrollo de *Blastocystis* spp en medio de cultivo vs concentración de SFB

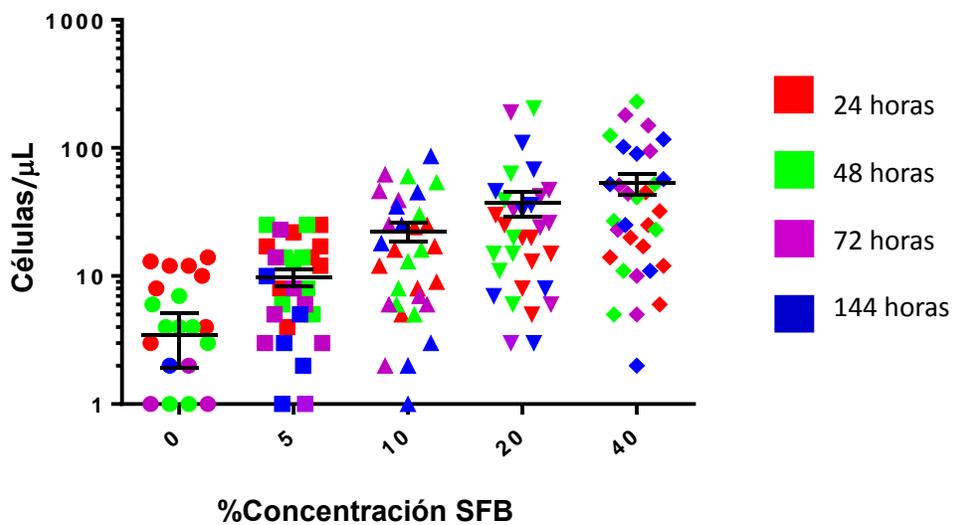


Figura 30.- Gráfica del desarrollo de *Blastocystis* spp en medio de cultivo vs concentración de SFB en escala logarítmica. Tres puntos se omiten por tener valor de cero.

Tabla 8-Datos estadísticos de los resultados de la evaluación cuantitativa del desarrollo de *Blastocystis* spp en el medio de cultivo a diferentes concentraciones de SFB

Horas	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Mediana
24	3	45	15.45	14
48	1	230	30.475	13.5
72	0	190	29.7	7.5
144	0	117	25.175	6
Total	0	230	25.2	12

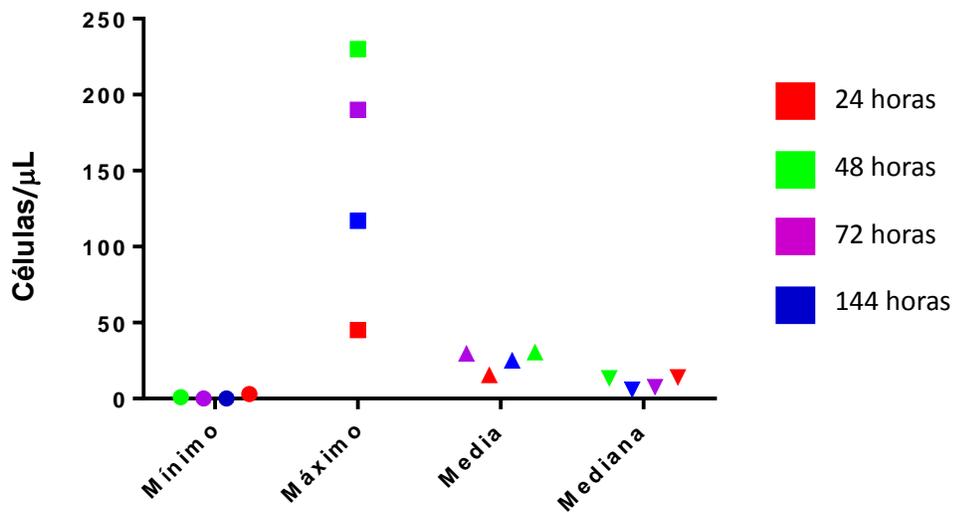


Figura 31.- Gráfica de los valores estadísticos del desarrollo de *Blastocystis* spp a diferentes concentraciones de SFB

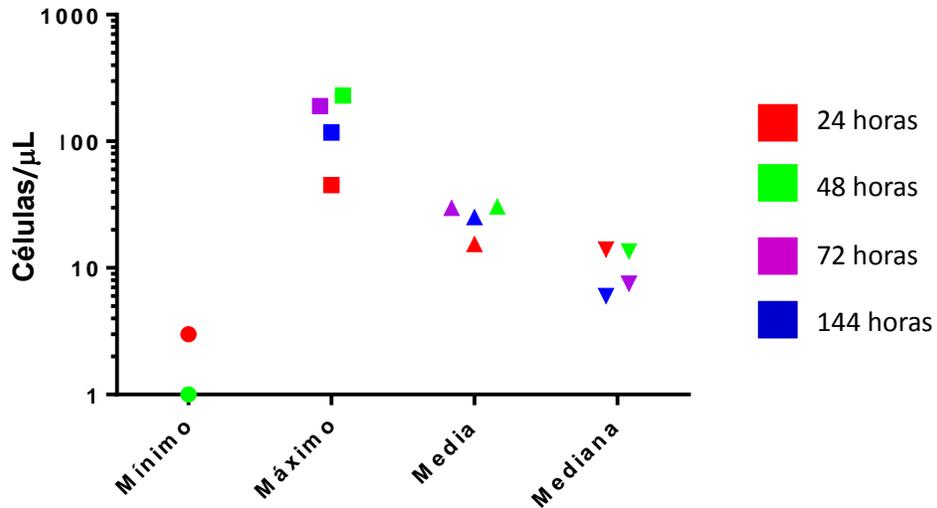


Figura 32.- Gráfica de valores estadísticos del desarrollo de *Blastocystis spp* a diferentes concentraciones de SFB en escala logarítmica. Se omiten dos valores.

A partir de los resultados presentados se decidió utilizar la concentración de suero fetal bovino al 10%.

De las 30 muestras de heces de pacientes positivos a *Blastocystis spp*, se obtuvieron 193 cultivos, a los cuales se les evaluó el desarrollo de manera cualitativa con respecto al tiempo. Se lograron mantener viables los cultivos primarios por siete días en promedio (2 – 10 días).

Con base a las observaciones anteriores se definió hacer pases en medio de cultivo fresco cada cuatro días para prolongar la supervivencia de los aislamientos. Los pases se realizaron tomando 200 μ L del cultivo anterior, resuspendiendo el sedimento de este previamente y colocándolo en un nuevo medio de cultivo, dejando incubar 48 hrs.

Estructuras parasitarias observadas en los cultivos

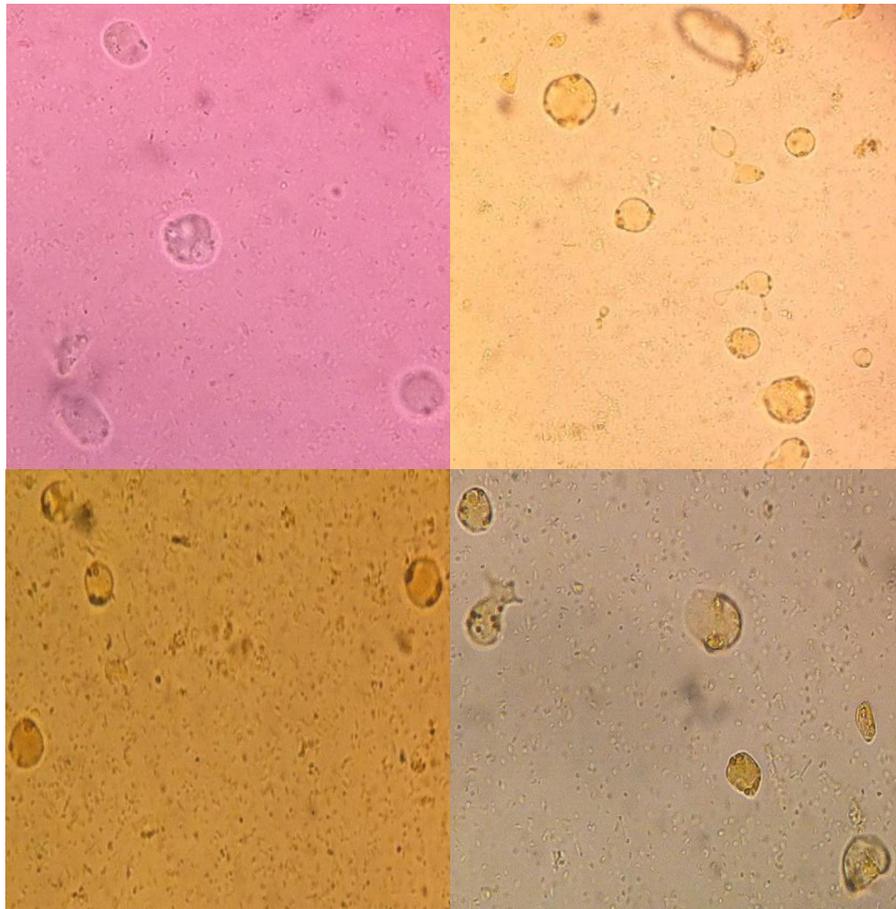


Figura 33.- *Blastocystis* spp obtenidos a partir del medio de cultivo propuesto. Tinción de lugol, 40x. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

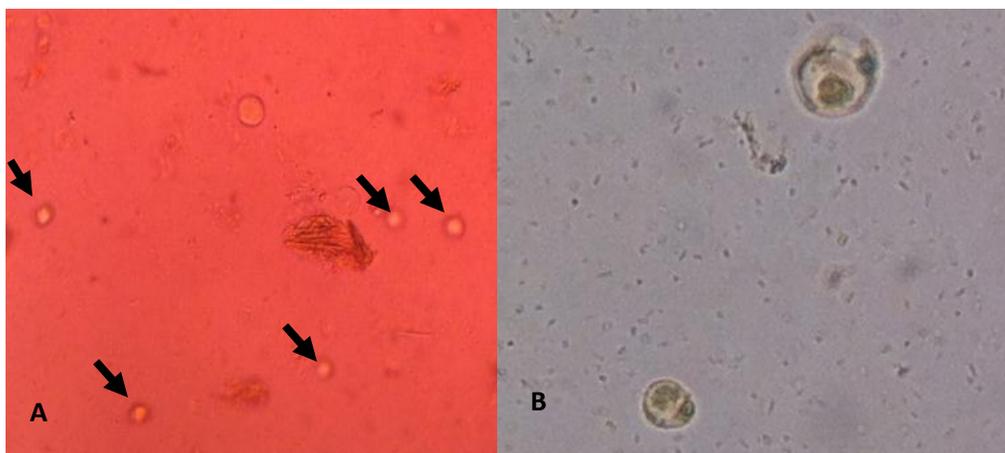


Figura 34.-*Blastocystis* spp con tinción de eosina (A) y lugol (B). Se observan diferentes estructuras en cada una; con eosina se observan parásitos viables (señalados con flechas). Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

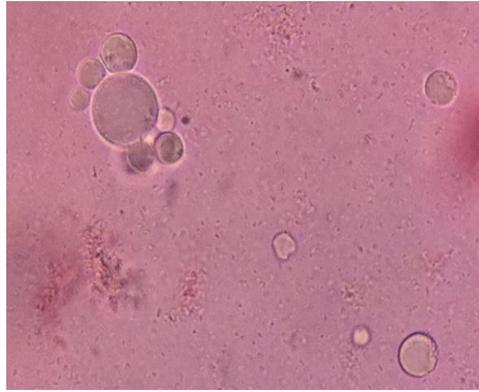


Figura 35.- Formas vacuolares de *Blastocystis* spp. en asociación. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

Fases reproductivas observadas en los cultivos

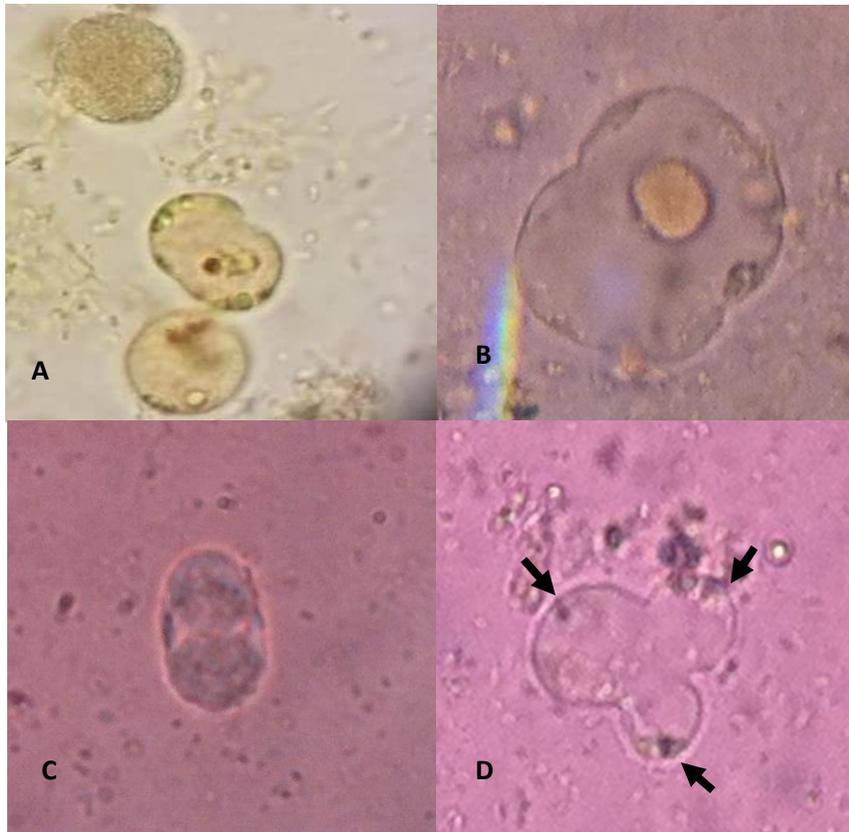


Figura 36.- Formas reproductivas de *Blastocystis* spp. Se pueden apreciar procesos de división por fisión binaria en A , B y C; y fisión múltiple o plasmotomía en D. Tinción de eosina, 40x, 100x. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

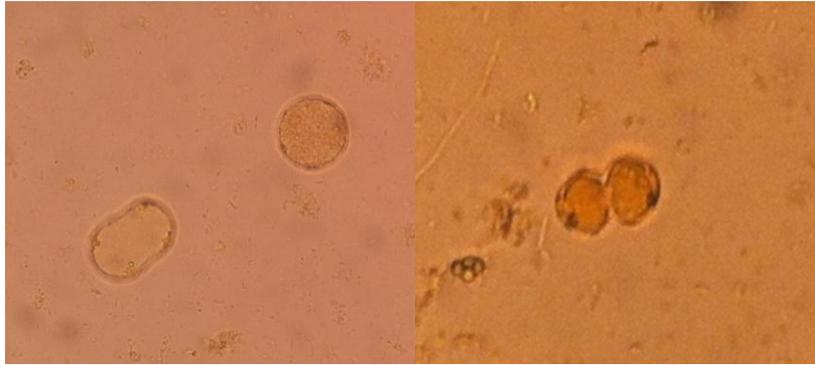


Figura 37.- Formas de *Blastocystis* spp. en la última etapa de reproducción por fisión binaria. Se puede apreciar la conservación de la vacuola interna en ambas células. Tinción de lugol, 40 X. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.



Figura 38.-Conteo en hemacitómetro de formas vacuolares de *Blastocystis* spp. 40x. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

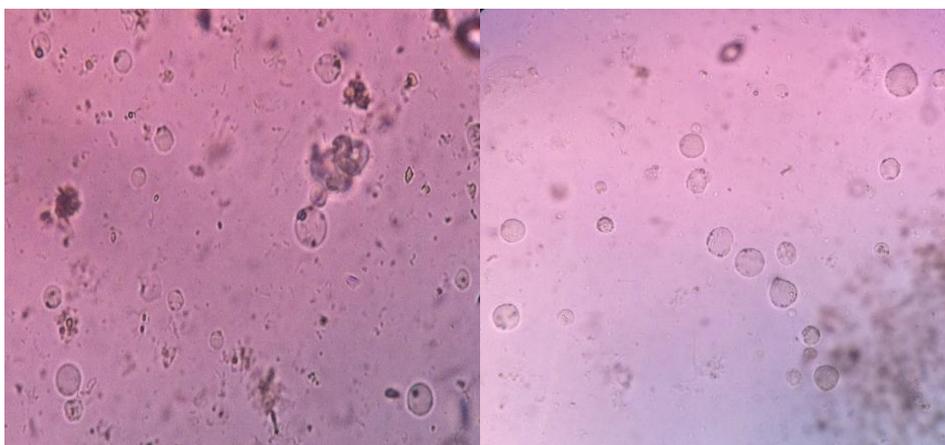


Figura 39.- Evaluación microscópica cualitativa del desarrollo de formas de *Blastocystis* spp entre 10 y 20 células por campo. Examen en fresco con solución salina isotónica. 40X. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

Fases vacuolares

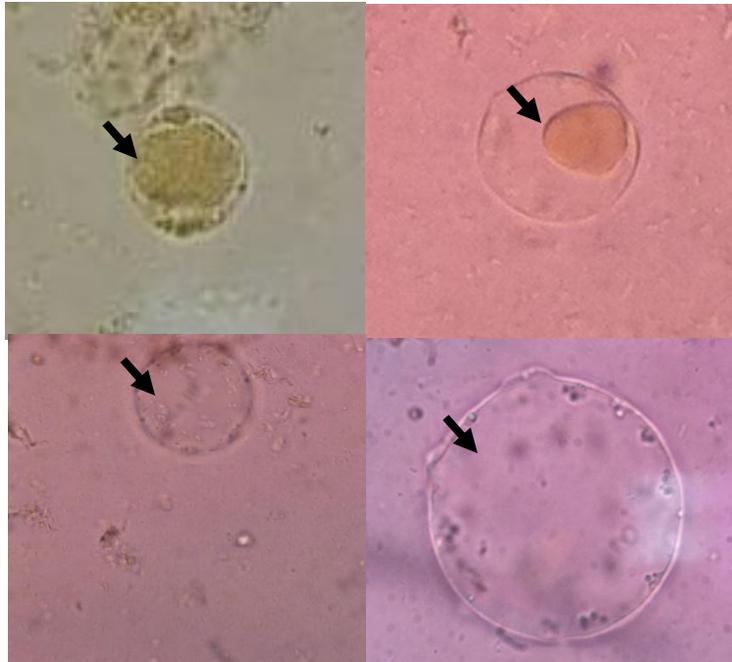


Figura 40.- Formas vacuolares de *Blastocystis* spp con tinciones de lugol y eosina. Las vacuolas se encuentran señaladas por una flecha. 100x. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

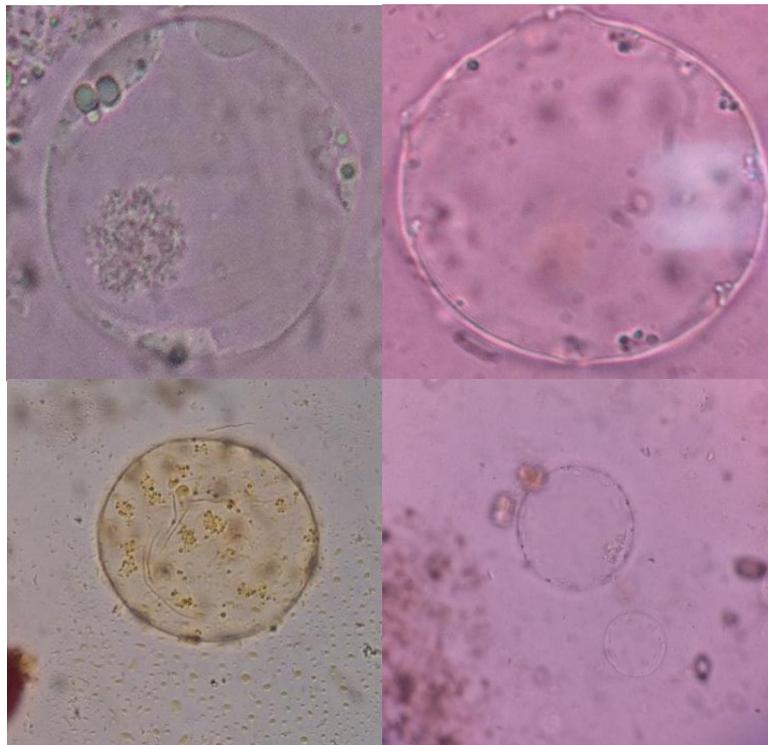


Figura 41.- Formas de *Blastocystis* spp de gran tamaño. Aumento. 100x. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

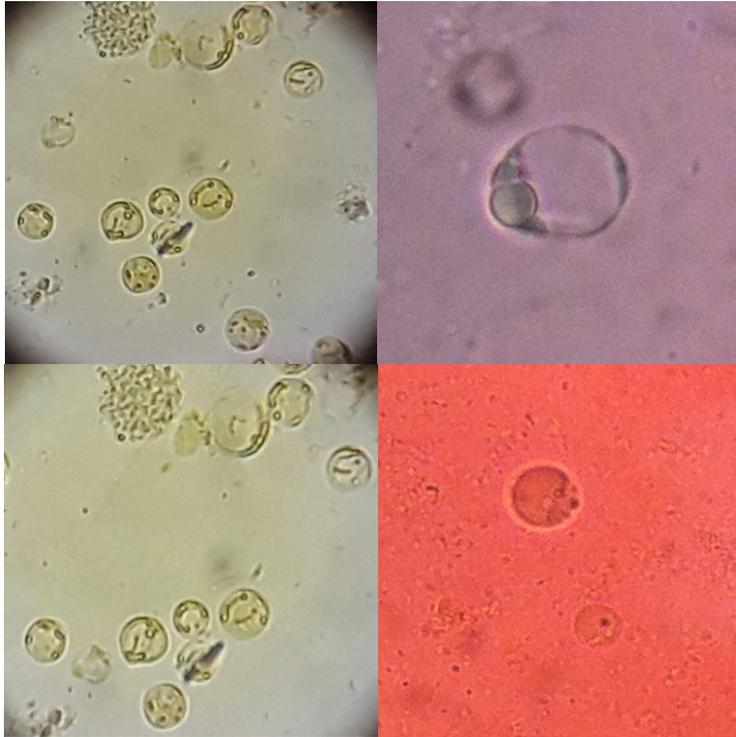


Figura 42.- Formas vacuolares de *Blastocystis* spp observadas con tinción de lugol (izquierda) y eosina (derecha). 40X. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

Fase multivacuolar

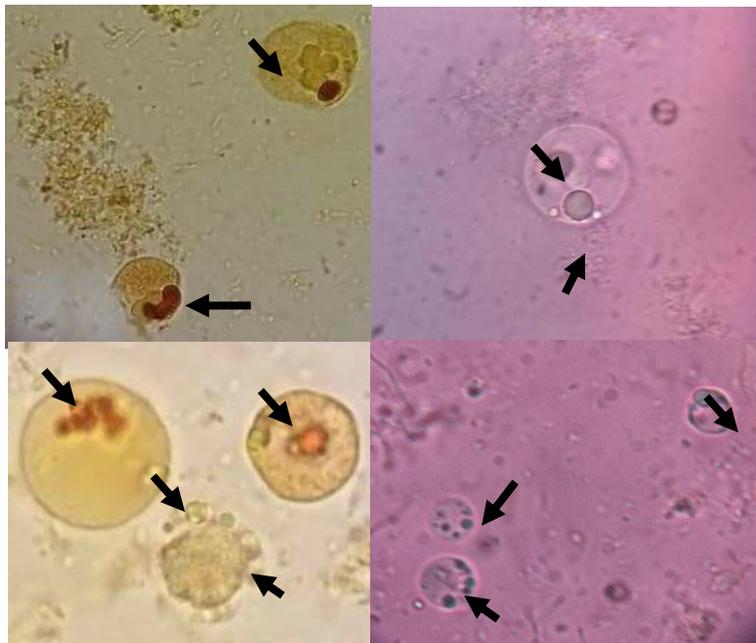


Figura 43.- Formas multivacuolares de *Blastocystis* spp. Se aprecian diferentes tipos de vacuolas dentro de las estructuras parasitarias. Las vacuolas están señaladas con una flecha. Lugol y eosina, 100x. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

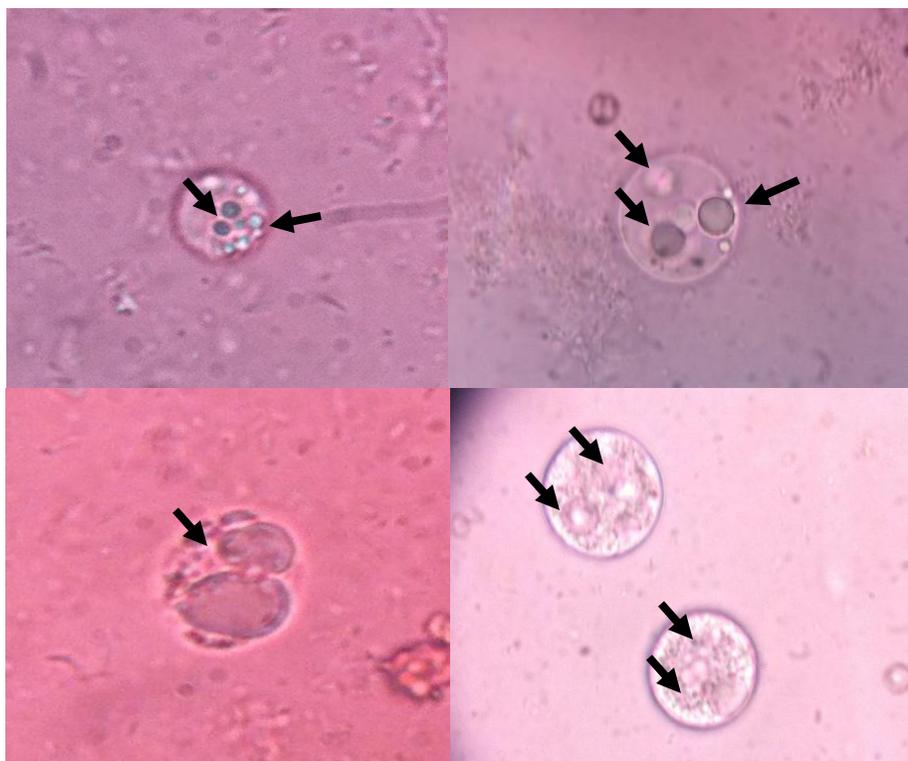


Figura 44.-Vacuolas de diversos tamaños, señaladas con una flecha. 40 x y 100x. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

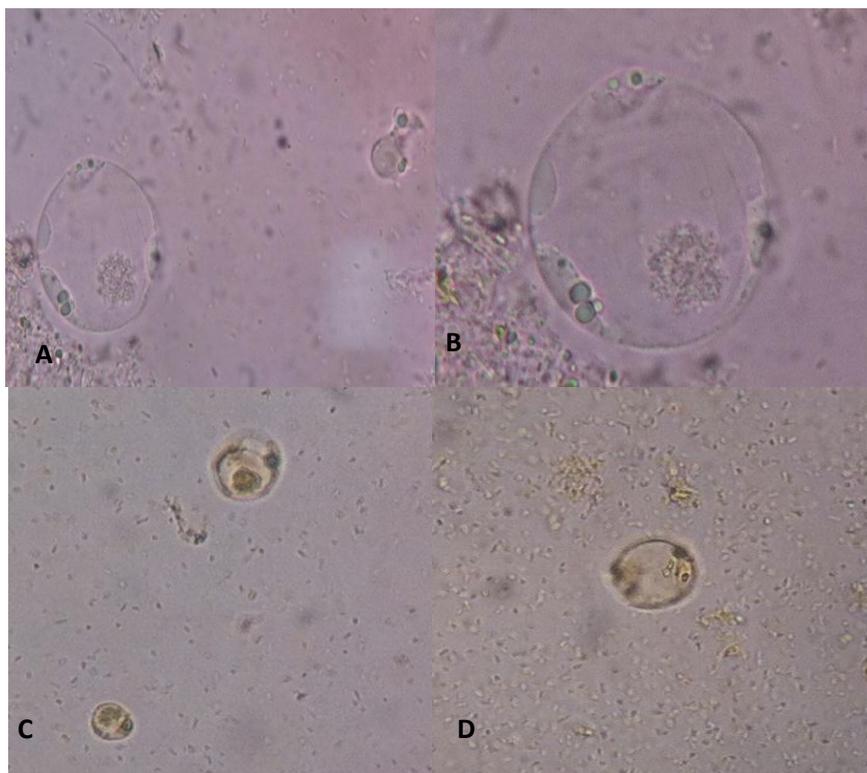


Figura 45.- Formas multivacuolares de *Blastocystis* spp. Arriba se aprecia Una forma vacuolar a 40x (A) y a 100x (B). Abajo se aprecian formas vacuolares, donde C presenta una vacuola más pequeña y resaltada por el lugol. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

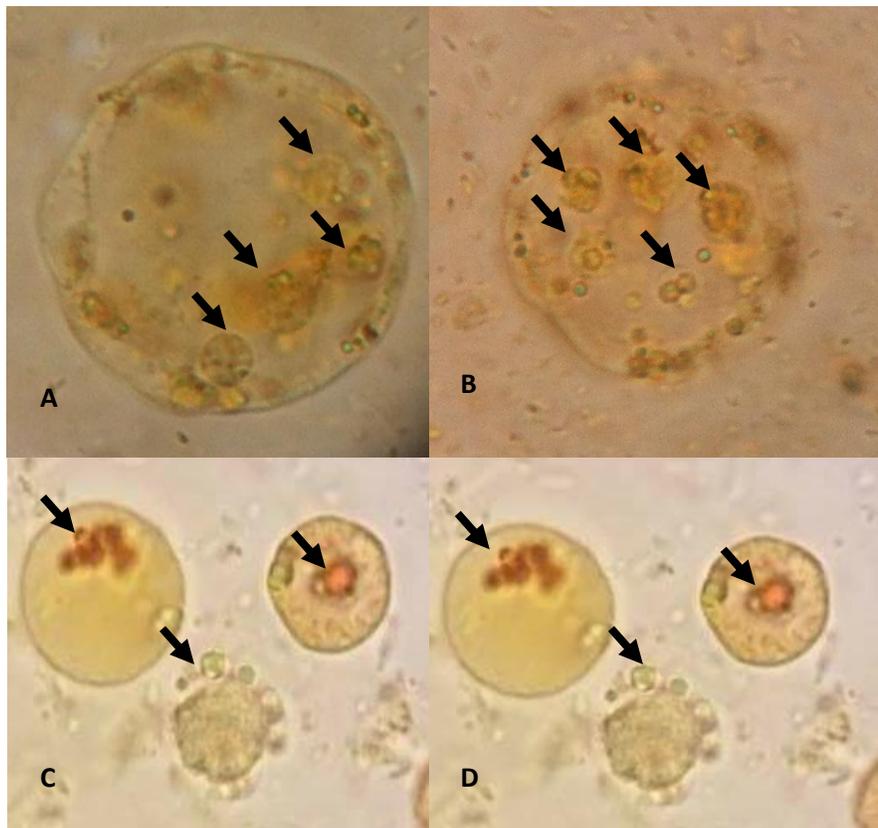


Figura 46.- Formas multivacuolares de *Blastocystis* spp obtenidas de cultivo. A y B presentan formas de gran tamaño. C y D presentan vacuolas con posible contenido nutricional en ellas. Tinción de lugol 40x, 100x.Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.



Figura 47.- Formas multivacuolares de *Blastocystis* spp con diferentes vacuolas. A la izquierda se observa una forma multivacuolar, con sus vacuolas distribuidas en el citoplasma. A la derecha, se aprecia otra forma multivacuolar, con las vacuolas en la periferia del espacio citoplasmático. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

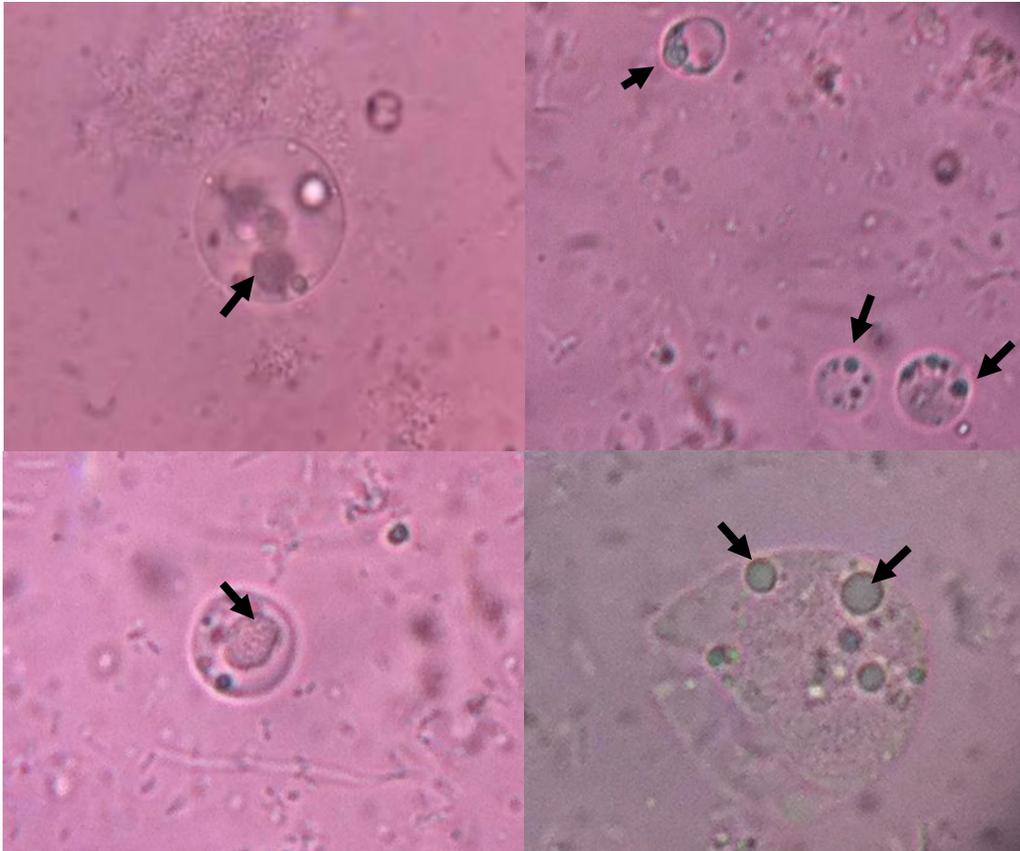


Figura 48.- Formas multivacuolares. Se observa variación en el tamaño del parásito, tamaño de sus vacuolas y en su forma. En la imagen inferior derecha el parásito presenta una ruptura en su pared celular. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

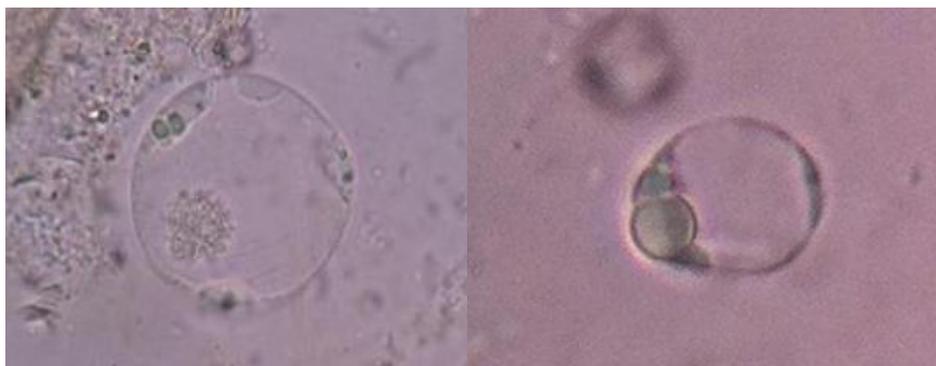


Figura 49.- Comparación entre dos formas multivacuolares. En la imagen de la izquierda, las vacuolas son más pequeñas y abundantes que en la imagen de la derecha; esta, en cambio, tiene vacuolas más grandes. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG

Forma Granular

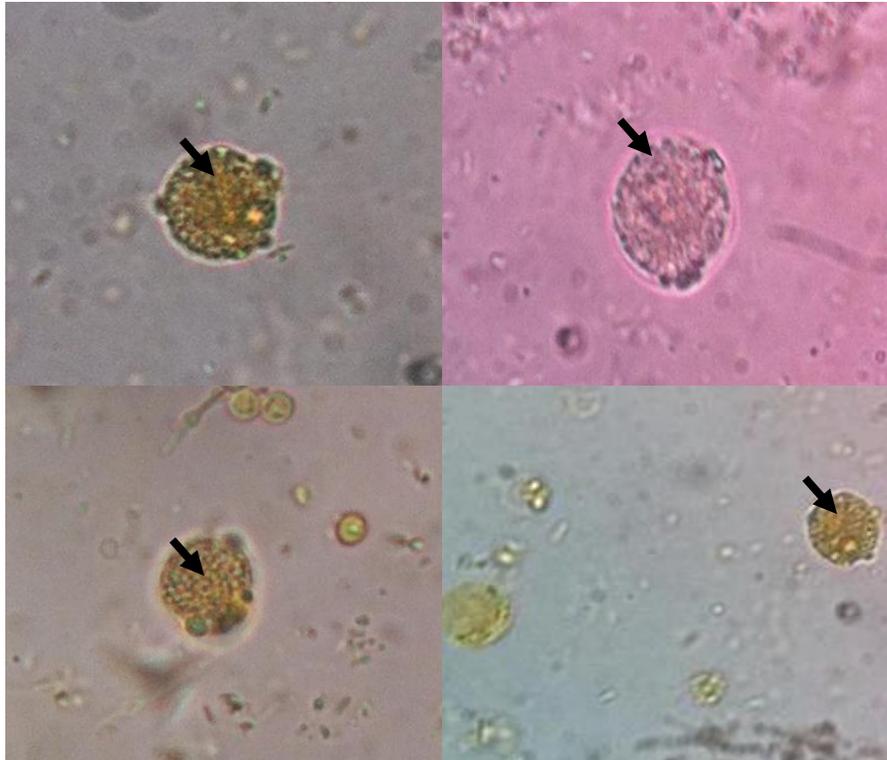


Figura 50.- Formas granulares de *Blastocystis* spp. Se observan diferentes formas granulares de *Blastocystis* spp. Tinción de lugol y eosina, 40x. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

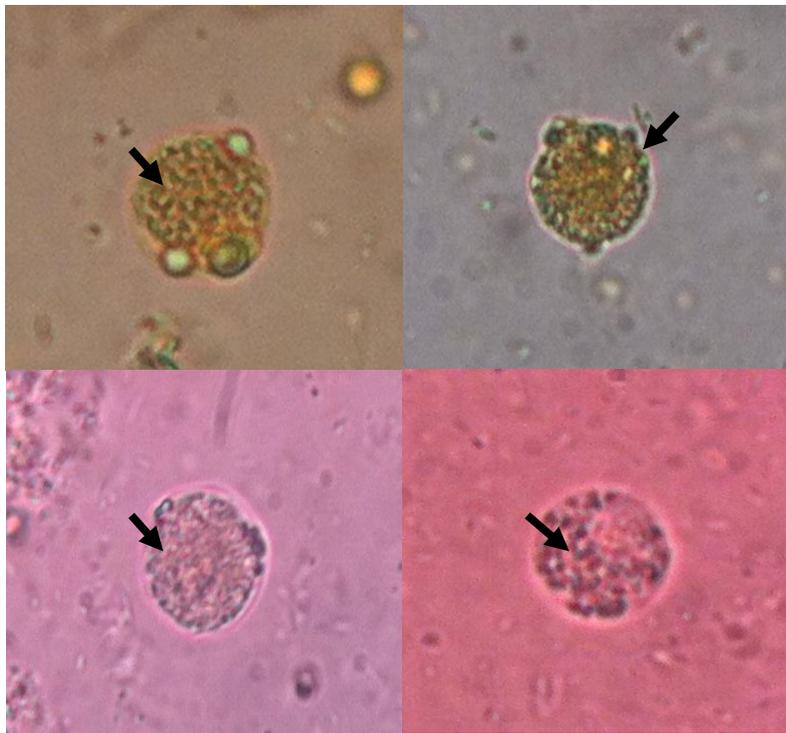


Figura 51.- Formas granulares. Se observan gránulos de diferentes tamaños, internos y externalizados. 100 x. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

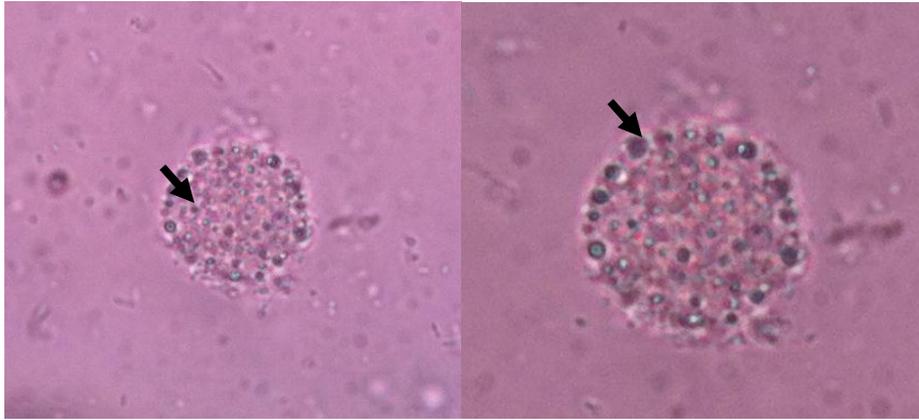


Figura 52.- Formas granulares de *Blastocystis* spp a 100x. Se pueden observar con más detalle las granulaciones que presenta el parásito, las cuales refringen la luz. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

Forma ameboide

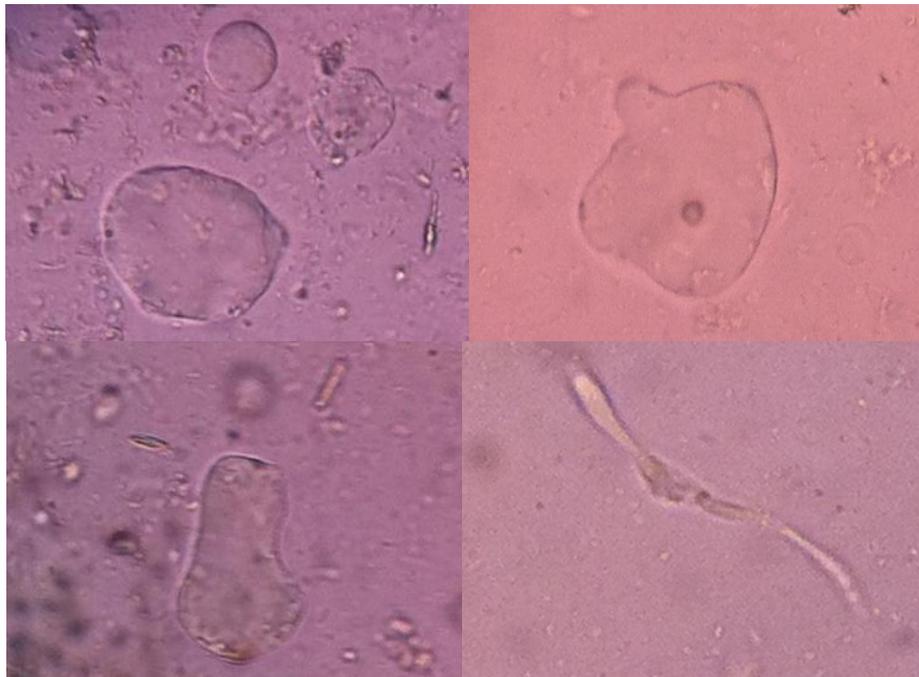


Figura 53.- Se observan diversas formas ameboides. SSF, 100x. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.



Figura 54.- Diversas formas ameboides de *Blastocystis* spp. Resultados obtenidos del laboratorio de parasitología del HIMFG.

Estandarización del sistema *in vitro* para evaluación de sensibilidad a metronidazol

Posterior al diseño del sistema *in vitro* para la evaluación de la sensibilidad de *Blastocystis* spp, se probaron aislamientos del parásito (con una confluencia en cultivo igual o mayor a 20 estructuras parasitarias por campo y con viabilidad >95%), realizando la evaluación del desarrollo cuantitativo de células viables cada 24 horas por 3 días, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 9.- Evaluación cuantitativa del desarrollo de cultivos de *Blastocystis* spp en diferentes concentraciones de Metronidazol

Concentración de MTZ $\mu\text{g/mL}$	Evaluación cuantitativa del desarrollo ^a		
	Concentración células viables $\times 10^5/\text{mL}$		
	24hrs	48hrs	72hrs
C1			
Control(-)(0 $\mu\text{g/mL}$)	15	11	10
(125 $\mu\text{g/mL}$)	15	7	3
(500 $\mu\text{g/mL}$)	20	14	8
(1250 $\mu\text{g/mL}$)	12	8	10
Control(+)(2500 $\mu\text{g/mL}$)	3	5	2
C2			
Control(-)(0 $\mu\text{g/mL}$)	27	15	13

(125µg/mL)	18	16	6
(500 µg/mL)	17	15	7
(1250µg/mL)	9	9	7
Control(+)(2500µg/mL)	5	3	5
C3			
Control(-)(0µg/mL))	71	39	17
(125µg/mL)	35	39	30
(500 µg/mL)	18	28	22
(1250µg/mL)	34	23	20
Control(+)(2500µg/mL)	14	19	10
C4			
Control(-)(0µg/mL))	318	196	143
(125µg/mL)	71	35	10
(500 µg/mL)	63	28	17
(1250µg/mL)	44	14	14
Control(+)(2500µg/mL)	18	5	5
C5			
Control(-)(0µg/mL))	577	207	296
(125µg/mL)	56	31	6
(500 µg/mL)	27	15	7
(1250µg/mL)	20	9	7
Control(+)(2500µg/mL)	11	14	14
C6			
Control(-)(0µg/mL))	397	39	35
(125µg/mL)	56	6	6
(500 µg/mL)	27	4	2
(1250µg/mL)	2	1	1
Control(+)(2500µg/mL)	15	1	22
C7			
Control(-)(0µg/mL))	46	28	11
(125µg/mL)	25	8	2
(500 µg/mL)	13	14	2
(1250µg/mL)	10	9	3

Control(+)(2500µg/mL)	4	9	2
C8			
Control(-)(0µg/mL))	29	39	11
(125µg/mL)	18	15	5
(500 µg/mL)	9	17	5
(1250µg/mL)	13	11	8
Control(+)(2500µg/mL)	17	7	2
C9			
Control(-)(0µg/mL))	29	12	2
(125µg/mL)	4	4	1
(500 µg/mL)	4	4	0
(1250µg/mL)	4	5	1
Control(+)(2500µg/mL)	1	1	0
C10			
Control(-)(0µg/mL))	108	175	153
(125µg/mL)	10	1	0
(500 µg/mL)	1	2	0
(1250µg/mL)	1	0	0
Control(+)(2500µg/mL)	0	0	0
C11			
Control(-)(0µg/mL))	30	22	44
(125µg/mL)	18	13	32
(500 µg/mL)	16	11	12
(1250µg/mL)	13	12	10
Control(+)(2500µg/mL)	8	8	8
C12			
Control(-)(0µg/mL))	32	11	31
(125µg/mL)	17	2	12
(500 µg/mL)	13	4	6
(1250µg/mL)	12	4	10
Control(+)(2500µg/mL)	12	4	6
C13			
Control(-)(0µg/mL))	45	18	22

(125µg/mL)	30	61	21
(500 µg/mL)	30	7	15
(1250µg/mL)	16	12	11
Control(+)(2500µg/mL)	0	5	7
C14			
Control(-)(0µg/mL))	6	10	5
(125µg/mL)	19	2	4
(500 µg/mL)	6	2	3
(1250µg/mL)	0	2	4
Control(+)(2500µg/mL)	3	0	0
C15			
Control(-)(0µg/mL))	7	0	0
(125µg/mL)	5	0	0
(500 µg/mL)	3	2	1
(1250µg/mL)	2	0	0
Control(+)(2500µg/mL)	3	0	0
C17			
Control(-)(0µg/mL))	0	1	5
(125µg/mL)	1	0	1
(500 µg/mL)	5	0	1
(1250µg/mL)	1	1	0
Control(+)(2500µg/mL)	2	0	0
C18			
Control(-)(0µg/mL))	5	0	5
(125µg/mL)	2	0	0
(500 µg/mL)	1	0	0
(1250µg/mL)	1	0	0
Control(+)(2500µg/mL)	0	0	0
C19			
Control(-)(0µg/mL))	9	13	35
(125µg/mL)	4	0	0
(500 µg/mL)	1	0	0
(1250µg/mL)	0	0	0

Control(+)(2500µg/mL)	0	0	1
C20			
Control(-)(0µg/mL))	28	28	72
(125µg/mL)	12	7	14
(500 µg/mL)	12	6	10
(1250µg/mL)	11	3	8
Control(+)(2500µg/mL)	10	5	7
C21			
Control(-)(0µg/mL))	26	42	21
(125µg/mL)	7	6	5
(500 µg/mL)	4	2	0
(1250µg/mL)	2	0	1
Control(+)(2500µg/mL)	1	0	0
C22			
Control(-)(0µg/mL))	6	61	18
(125µg/mL)	6	5	1
(500 µg/mL)	3	5	0
(1250µg/mL)	2	1	4
Control(+)(2500µg/mL)	2	1	1
C23			
Control(-)(0µg/mL))	5	0	0
(125µg/mL)	1	0	0
(500 µg/mL)	1	0	0
(1250µg/mL)	1	0	0
Control(+)(2500µg/mL)	0	0	0
C24			
Control(-)(0µg/mL))	2	9	12
(125µg/mL)	3	0	0
(500 µg/mL)	0	0	0
(1250µg/mL)	1	2	0
Control(+)(2500µg/mL)	0	0	0
C25			
Control(-)(0µg/mL))	5	5	18

(125µg/mL)	0	0	0
(500 µg/mL)	0	7	1
(1250µg/mL)	0	0	6
Control(+)(2500µg/mL)	0	0	0

Tabla 10.- Datos estadísticos de la Evaluación cuantitativa del desarrollo de cultivos de *Blastocystis* spp en diferentes concentraciones de Metronidazol

Registro	Fecha	control (-) (0)	Control (+)(500)	P2 (250)	P3 (100)	P4 (50)
p4-1	21/02/2018	15	3	12	20	15
	22/02/2018	11	5	8	14	7
	23/02/2018	10	2	10	8	3

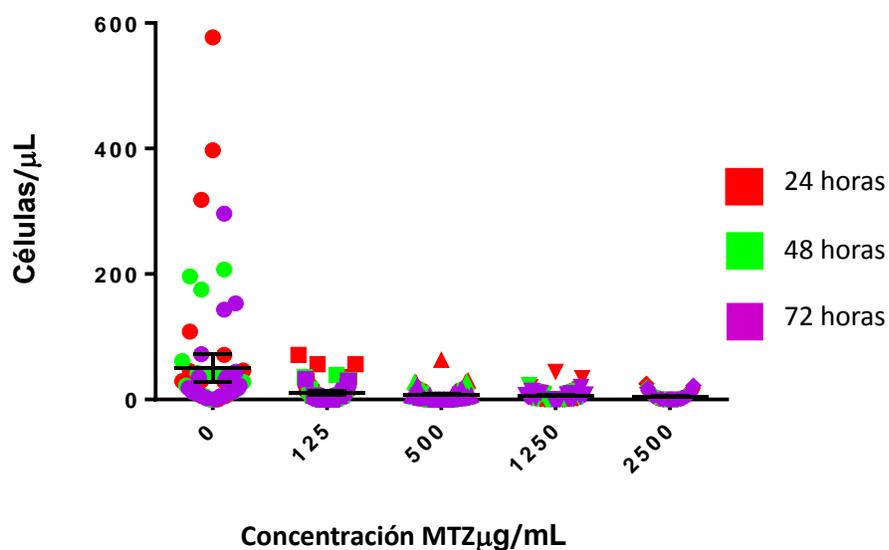


Figura 55.- Gráfica de supervivencia de organismos parasitarios contra concentración de Metronidazol

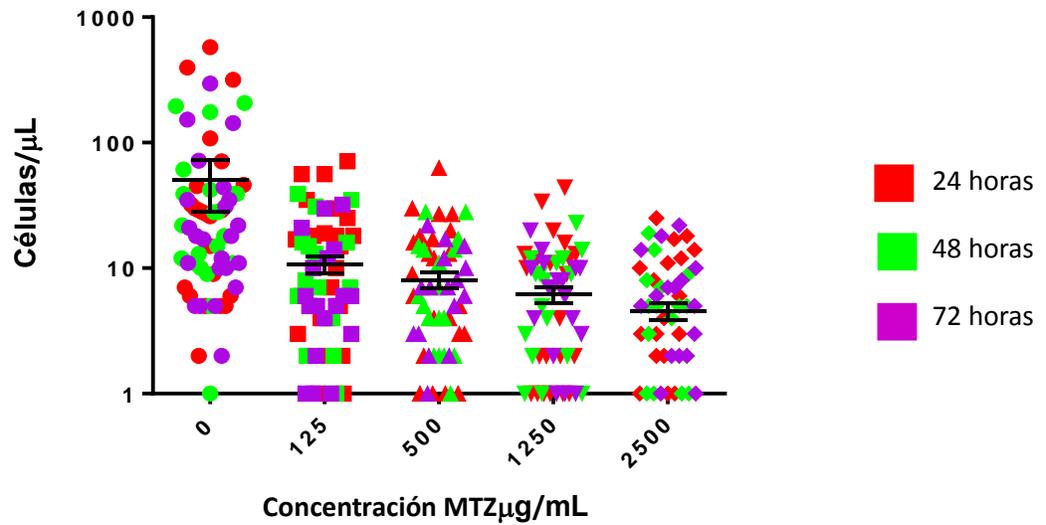


Figura 54.- Gráfica de supervivencia de organismos parasitarios contra concentración de Metronidazol en escala logarítmica. Debido a que se trata de una escalalogarítmica, 85 puntos quedan fuera

Tabla 11.- Datos estadísticos de supervivencia de organismos parasitarios contra concentración de Metronidazol

Horas	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Mediana
24	0	577	24.0833	8.5
48	0	207	13.2416	5
72	0	296	12.3166	5
Total	0	577	16.5472	5

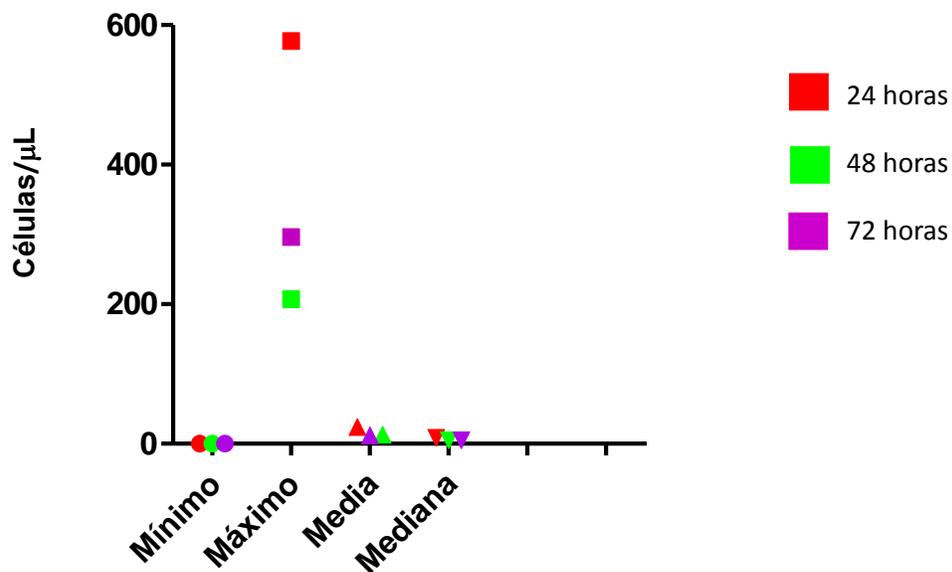


Figura 57.- Gráfica de datos estadísticos de supervivencia de organismos parasitarios contra concentración de Metronidazol

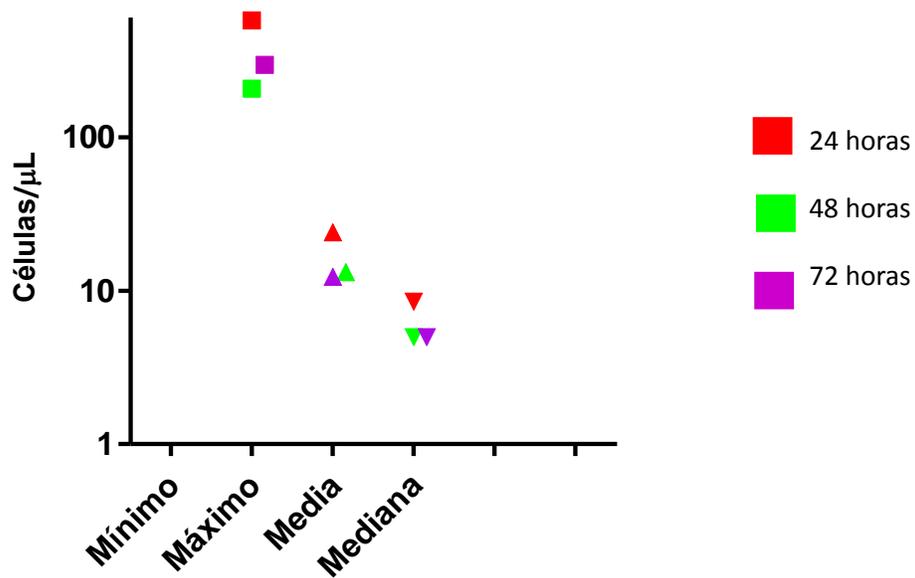


Figura 58.- Gráfica de datos estadísticos de supervivencia de organismos parasitarios contra concentración de Metronidazol en escala logarítmica. Debido a la escala logarítmica, se omiten 3 datos

CIM= 125μg/mL

Discusión

Blastocystis spp es un parásito que ha estado cobrando importancia a nivel clínico y su diagnóstico va tomando cada vez más relevancia, así que se han diseñado y utilizado herramientas cada vez más efectivas para su estudio y diagnóstico. Estos métodos varían en complejidad y en costo, permitiendo obtener un diagnóstico acertado para este parásito; aunque, debido a que los médicos aún no lo consideran como un agente patógeno, estas herramientas no son usadas para realizar el diagnóstico de esta parasitosis, apegándose al método tradicional de diagnóstico, que es la observación al microscopio.

Como ya se ha mencionado antes, la microscopía óptica es muy útil y eficaz para la detección del parásito en heces; sin embargo, de acuerdo a la recomendación de varios autores, el cultivo permite obtener un diagnóstico confirmatorio, siendo una prueba “de oro” para encontrar la presencia del parásito, siendo incluso más económico que los métodos moleculares y con buena sensibilidad.^{3,5,6,11,11,17,40, 68,71,83,95} Esto llega a ser particularmente importante, pues *Blastocystis* spp puede llegar a confundirse con restos de alimentos, con gotas de grasa o incluso con ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* de acuerdo a algunas referencias.^{2,3, 53, 96} Además de que en algunos estudios se ha comprobado que llega a ser más efectivo que sólo el diagnóstico a través del microscopio y con tinciones como la tricrómica e incluso obteniendo buenos resultados frente a técnicas moleculares, siendo este más económico.^{95, 97} También se ha visto que el diagnóstico confirmatorio utilizando cultivos xénicos y axénicos permite aumentar la precisión del diagnóstico de manera sencilla y económica, pues los cultivos se pueden elaborar con materiales de bajo costo, y sin el uso de una cámara anaeróbica.¹¹

Esta situación nos llevó a plantear la realización de la estandarización de un medio de cultivo sencillo y económico, que nos pudiera auxiliar en el diagnóstico de *Blastocystis* spp; también se decidió plantear la estandarización de la prueba de sensibilidad a antiparasitarios con base en los reportes que se han publicado sobre sensibilidad a dichos fármacos, principalmente el metronidazol, que es el tratamiento de primera línea.^{1,2,5,6,7,11,}

^{52,90,92,94} El poder reportar si existe sensibilidad a tratamientos farmacológicos permitiría un manejo adecuado del paciente.

El proceso de la estandarización tomó en cuenta trabajos de investigación en donde los investigadores utilizaron diferentes medios y formas para evaluar el crecimiento y la resistencia a los antiparasitarios. Esto sirvió de base para plantear un diseño que fuera económico y sencillo de desarrollar, puesto que en los laboratorios clínicos generalmente no se hacen estas pruebas debido al costo elevado que generalmente presentan. Estos ensayos se realizaron y se adaptaron al laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, ya que *Blastocystis* spp es el parásito más frecuentemente reportado en muestras de heces.

Se decidió emplear el medio Suero salino de Barret debido a la facilidad que este presenta en su preparación, así como del costo económico que tiene el elaborarlo, pues sólo se necesita solución salina fisiológica y suero fetal bovino; la única modificación realizada para este trabajo fue la implementación del suero fetal bovino en vez de suero humano, para evitar interferencias de este en el crecimiento de parásito.⁸⁵ Aún así, se puede utilizar el suero humano después de realizar un proceso de desnaturalización de proteínas, mismas que podrían interferir en el desarrollo del parásito; esto ayudará a reducir costos de realización de la prueba. Para estandarizar el medio, se utilizaron diferentes concentraciones a fin de lograr un desarrollo óptimo de los parásitos. El volumen total del medio se decidió mantener en 1.5mL para un manejo más sencillo de los cultivos.

Las pruebas realizadas para este fin mostraron que, de acuerdo a la figura 28, todos los cultivos a diferentes concentraciones de suero presentaron desarrollo de varias de las formas parasitarias de *Blastocystis* (vacuolar, multivacuolar, granular y ameboides), sin observar variación a las 24 horas; la diferencia que presentaron con respecto del control fue que a partir de las 48 horas, la cantidad de parásitos declinó rápidamente. La influencia de la concentración de suero se pudo observar a partir de las 48 horas, con un crecimiento notorio en los cultivos con mayor cantidad de suero (20 y 40% de suero), mientras que el cultivo con 10% presentó un crecimiento moderado y el cultivo con 5% empezó a declinar. A las 72 horas se empezó a ver una reducción del crecimiento de los cultivos a excepción del cultivo con 40%; el cultivo con 5% mostró decrecimiento y los cultivos con 10 y 20% se

mantuvieron al mismo nivel de desarrollo. A las 144 horas se observó que todos los cultivos estaban decreciendo en concentración parasitaria. Se decidió evaluar a los cultivos durante este periodo de tiempo, ya que se tiene reportado que el cultivo puede durar hasta 96 horas e incluso hay quienes dicen que dura más de una semana.

A los resultados obtenidos de esta parte de la experimentación se les realizó un análisis de varianza de un factor con GraphPad Prism V.6, obteniendo un valor de $P < 0.0001$, lo que nos dice que la diferencia entre medias es significativa con la siguiente distribución de datos:

Tabla 11.- Estadística descriptiva del desarrollo de *Blastocystis* spp a diferentes concentraciones de SFB

Estadística descriptiva	24 h	48 h	72 h	144 h
Mínimos	3	1	0	0
Máximos	45	230	190	117
Media	15.45	30.48	29.70	25.18
Mediana	14	13.50	7.5	6
IC95% Bajo	12.64	14.66	14.76	14.11
IC95% alto	18.26	46.29	44.64	36.24

Estos resultados nos indican que los diferentes grupos de valores que se presentan en el experimento, en las diferentes condiciones de medio de cultivo presentan una variación significativa, lo que nos indica una heterogeneidad en los resultados obtenidos, cuestión que nos ayuda a validar el experimento.

Con base en estos resultados, se determinó utilizar la concentración de suero fetal bovino de 10%, puesto que aunque no fue la concentración que permitiera la mayor proliferación de parásitos, sí logro un buen desarrollo, comparable al cultivo con 20% de suero; esto en un esfuerzo por aprovechar el medio suero salino, permitiendo así la elaboración de más

cultivos. Debido a la elevada cantidad de suero utilizada en el cultivo de concentración 40%, en comparación con el buen resultado obtenido con el medio de cultivo al 10%, se optó por no utilizar la concentración de SFB del 40%. También, a partir de este ensayo se determinó que el tiempo ideal para la revisión de los cultivos de *Blastocystis* spp es de 48 horas.

El medio de cultivo utilizado en estas pruebas fue xénico, logrando obtener buenos resultados en el desarrollo de formas parasitarias de *Blastocystis* spp, las cuales se pueden observar en las imágenes mostradas anteriormente. En ellas se aprecian diferentes fases del parásito, lo cual es un indicio de buen desarrollo de este organismo en el medio propuesto. Fue posible la apreciación de formas vacuolares principalmente; las formas multivacuolares se observaron con menor frecuencia; las formas granulares comenzaron a aparecer después de aproximadamente una semana de que el parásito fue inoculado en un cultivo, indicando, como la literatura describe, que el cultivo estaba envejecido⁹⁸; las formas ameboides fueron las que se identificaron en menor proporción en los cultivos. Los hallazgos más relevantes en los cultivos fueron las distintas formas de reproducción, principalmente por fisión binaria, aunque se ha constatado con las imágenes de referencia que también se observó reproducción por fisión múltiple, plasmotomía, esquizogonia y posiblemente endodiogonia, como lo podemos observar en las figuras 32, 33, 39, 40 y 42 (A y B). Encontrar estas formas reproductivas nos indicó que el cultivo fue exitoso al favorecer las condiciones que permitieron a estos parásitos reproducirse y adoptar diferentes fases (vacuolar, multivacuolar, ameboides y granular).

Un aspecto importante, considerado por varios investigadores al momento de realizar un medio de cultivo para un organismo en particular, es la axenicidad de este cuando se desea evitar la interferencia que otros microorganismos pudieran generar al crecimiento del organismo que se desea reproducir. En nuestro caso, se eligió utilizar un medio xénico para el cultivo, porque se ha reportado que permite el crecimiento de *Blastocystis* spp además de que la presencia de bacterias favorece el desarrollo de diferentes fases del parásito, ya que se ha reportado que son una fuente de alimento.⁹⁹ Por otro lado, para obtener un cultivo axénico, es necesario incorporar antibióticos y antimicóticos al medio de

cultivo, lo que interfiere en el caso de que se desee probar la sensibilidad a antiparasitarios, como en el presente estudio.

De acuerdo a la recomendación por la literatura y con base a los resultados obtenidos presentados en la tabla 6, se empleó el medio de suero salino de Barret con la concentración de suero al 10%. Se realizaron diferentes cultivos de muestras positivas a *Blastocystis* spp (diagnosticadas por microscopia), a los cuales se les dio seguimiento, realizando pases cada 96 hrs. para mantener a los cultivos viables.^{73, 97, 81, 100} Se obtuvieron 193 cultivos, con un promedio de viabilidad de 7 días. Se realizaron pases a cada cultivo cada 3-5 días, de acuerdo a lo sugerido por Kukoschke y Müller⁸⁴, permitiendo la continuidad de las cepas de *Blastocystis* spp hasta un máximo de 31 días. Esto podría ser útil en el futuro, si se desea hacer la subtipificación de los parásitos, entre otros estudios que pudieran surgir, manteniendo las cepas de manera económica; además de que se puede conservar a los parásitos como control positivo para otras evaluaciones y experimentaciones.

El siguiente paso fue determinar el tiempo óptimo de desarrollo del parásito que requerimos para observar a *Blastocystis* spp. Para llevar a cabo esta estandarización, se realizó una prueba cuantitativa para evaluar al crecimiento de los cultivos: Este criterio nos permitió, de manera sencilla, darle seguimiento al desarrollo del parásito con respecto al tiempo. En base a lo obtenido, se logró observar que los cultivos presentaron el mayor crecimiento entre las 48 y las 96 horas, concordando con lo reportado en otros artículos.^{40, 81, 95, 101}

Los cultivos se revisaron cada tercer día. De acuerdo a nuestra experiencia, es importante la revisión de los cultivos a las 48 horas, debido a que fue en este período en donde se pudo conocer si el cultivo permitió el desarrollo óptimo del parásito; para esto se realizó un examen directo con SSF y lugol a este tiempo, para confirmar la presencia o ausencia del parásito.⁸¹ También se realizó la evaluación utilizando el colorante eosina como colorante vital, permitiéndonos determinar la viabilidad de los parásitos en el cultivo, cuando las estructuras parasitarias se encuentran íntegras y por lo tanto viables, no penetra el colorante eosina y se observan incoloras y refringentes; por el contrario cuando toman el color rosa, significa que la célula no es viable. Si a las 72 horas no se observaron

estructuras parasitarias, se desechó el medio de cultivo. Para una mejor observación de los cultivos, se realizaron de dos a tres subcultivos, utilizando las mismas condiciones del medio; de esta manera los nuevos cultivos se observan con menos artefactos y restos fecales, permitiendo así una mejor observación.

Para la estandarización del sistema de evaluación de sensibilidad a antiparasitarios, se revisaron las propuestas que hay en la literatura, observando que se puede llevar a cabo tanto en medio sólido como en líquido. Esta parte experimental se basó en la metodología de Silva-Díaz et al.¹⁰² Por cuestiones prácticas, se decidió realizar en medio líquido, utilizando sólo un fármaco a la vez para fines de estandarización; en este caso fue el metronidazol, que es el imidazol más utilizado para tratar infecciones por *Blastocystis* spp.

El sistema se evaluó durante 72 horas, con una lectura cada 24 horas, para determinar la sensibilidad del parásito al fármaco en relación al tiempo. La evaluación de estos sistemas de cultivo se realizó cuantificando al microorganismo en el hemocitómetro y midiendo viabilidad con el colorante eosina, como ya se ha descrito previamente. Se consideró como sensible la concentración con desarrollo menor al control negativo.

A los resultados obtenidos de esta parte de la experimentación se les realizó un análisis de varianza de dos colas con GraphPad Prism 6, obteniendo un valor de P: <0.0001 con la siguiente distribución de datos:

Tabla 13.- Estadística descriptiva del desarrollo de organismos parasitarios contra concentración de Metronidazol.

Estadística descriptiva	24 h	48 h	72 h
Mínimos	0	0	0
Máximos	577	207	296
Media	24.08	13.66	12.28
Mediana	8.5	5	5
IC95% Bajo	11.46	7.998	6.233
IC95% alto	36.70	19.32	18.33

Se puede observar que los diferentes grupos de valores que se presentan en este experimento, a diferentes concentraciones del antiparasitario, presentan una variación significativa, que indica que estos resultados presentan diferencias en los diferentes grupos, cuestión que ayuda a confirmar la validez del experimento.

Los resultados que arrojaron las pruebas de sensibilidad muestran un decrecimiento en el desarrollo entre las diferentes concentraciones de los cultivos, habiendo una reducción gradual en el desarrollo de *Blastocystis* spp en los diferentes cultivos al aumentar la concentración del antiparasitario. En cada prueba de sensibilidad al metronidazol, se observaron resultados variables con la misma tendencia a la disminución del desarrollo, aunque hubo cultivos de *Blastocystis* spp que lograron sobrevivir a concentraciones elevadas de antiparasitario. Incluso en el caso de la concentración más elevada, no se logró erradicar al parásito al 100%, manteniendo su presencia en los cultivos al final de la duración del experimento.

La CIM para metronidazol (es decir, la menor concentración en donde se aprecia inhibición parasitaria) fue de 125 µg/mL, lo que coincide con lo reportado por Roberts, aunque corresponde a la menor concentración empleada en este ensayo y es posible que la CIM se encuentre por debajo de 125 µg/mL; por lo que se recomienda en un estudio posterior incluir al menos las concentraciones de 64 y 32 µg/mL. Se tiene en consideración el mecanismo de acción del Metronidazol, que provoca apoptosis a *Blastocystis* spp, causando la generación de vesículas apoptóticas que puedan inducir estallido de la estructura parasitaria. Las células que fueron contabilizadas no sufrieron del fenómeno de apoptosis.^{52, 92, 93} Una observación importante en estos cultivos es la alteración que llegaron a presentar los parásitos. Aunque hubo cultivos incubados con Metronidazol, en donde *Blastocystis* spp mantuvo su forma íntegra, en otros casos se observaron alteraciones en la morfología del parásito, como ruptura de su pared, apoptosis o reducción de tamaño. También se observaron formas granulares, lo cual está registrado en la literatura, que nos menciona a este como un posible mecanismo de defensa y de reproducción para permitir la subsistencia del organismo.^{2, 5, 21, 93}

El propósito de este trabajo fue implementar una metodología aplicable a un laboratorio de clínico para el estudio de la susceptibilidad de *Blastocystis* spp, que contribuya al estudio de los perfiles de susceptibilidad a antiparasitarios , lo que puede ser aplicable en el campo clínico para la elección de tratamiento y dosis adecuados, sobre todo en pacientes con infecciones por *Blastocystis* spp que no muestren respuesta al tratamiento de primera elección, y finalmente será posible documentar y hacer el seguimiento de los eventos de resistencia que se logren identificar en el futuro. Esta metodología es en general sencilla, económica y reproducible, lo que facilita su implementación en laboratorios clínicos y de investigación.

Una desventaja observada es el tiempo necesario para realizar el cultivo y la prueba de sensibilidad, debido a que se requiere esperar al menos 48 horas para poder trabajar con un cultivo de *Blastocystis* spp.

Es importante hacer mención que sólo se realizó la estandarización de la prueba de sensibilidad a antiparasitarios con Metronidazol, dejando la puerta abierta para incluir otros fármacos en esta metodología, a fin de conocer el patrón de susceptibilidad a antiparasitarios de los aislamientos de nuestra población pediátrica, y contribuir al estudio de esta parasitosis.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que la metodología propuesta permitió el desarrollo de formas diversas de *Blastocystis* spp, así como de células hijas, en el medio de cultivo xénico suero salino de Barret; permitió evidenciar la resistencia o sensibilidad del parásito frente a un antiparasitario; además de que el método de cultivo propuesto puede ser una herramienta útil para apoyar al diagnóstico de esta parasitosis. Esta metodología es fácilmente reproducible, por lo que facilita su implementación en diferentes laboratorios, tanto a nivel clínico como a nivel de investigación.

Conclusiones

- Se logró realizar la estandarización del medio de cultivo xénico suero-salino de Barret para el cultivo de *Blastocystis* spp, con 1.5mL de medio con SFB 10% a 48 hrs de cultivo.
- Se realizó el diseño del modelo *in vitro* para evaluar la sensibilidad a antiparasitarios de *Blastocystis* spp.
- Por medio del modelo estandarizado, se logró evaluar la sensibilidad a metronidazol de *Blastocystis* spp, a partir de aislamientos de pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez, en donde se una CIM de 125 µg/mL

Perspectivas

Para continuar lo aportado con este trabajo, será necesario incluir otros fármacos en la prueba de sensibilidad para *Blastocystis* spp, reportados en la literatura como indicados para tratar la blastocistosis, y ampliar el rango de concentraciones de los fármacos.

Asimismo se espera que el medio de cultivo empleado pueda ser utilizado en investigaciones futuras como una alternativa que permita el aislamiento y mantenimiento del parásito, especialmente si se desea realizar una genotipificación para determinar los ST del microorganismo y con ello estudiar la prevalencia de los ST de *Blastocystis* spp en México y su probable asociación con los patrones de susceptibilidad y resistencia a antiparasitarios.

También se pretende implementar esta metodología de susceptibilidad antiparasitaria como una prueba que oriente al clínico en la toma de decisiones en los pacientes que presenten recurrencia de la infección o largos periodos de tratamiento.

Referencias:

- 1.-Vichido-Luna, M.; Toro-Monrajaz, E.; Montijo-Barríos, E.; Huante-Anaya, A.; Cervantes-Bustamante, R.; Ramírez-Mayans, J. (2016). *Blastocystis hominis*, un agente patógeno controversial en la génesis de enfermedades gastrointestinales y alérgicas. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 25 (3), pp 78-83.
- 2.- Tasic, N.; Milenkovic, T.; Bujic, V.; Zdravkovic, D.; Tasic, A. (2016). *Blastocystis hominis*: A mysterious and commonly disregarded parasite. *Facta Universatis*. 18 (2), pp: 39-47.
- 3.- Sadaf, H.; Khan, S.; Urooj, K.; Asma, B.; Ajmal, S. (2013). *Blastocystis hominis*-Potencial diahorreal agent: A review. *International Research Journal of Pharmacy*, 4 (3), pp: 1-5.
- 4.- Grecu, D.; Neagu, A.; Hărmănescu, E.; Moglan, I. (2013). *In vitro* division modalities developed by *Blastocystis hominis* examined with the acridine orange stain. *Analele Științifice ale Universității „Alexandru Ioan Cuza” din Iași, s. Biologie animală*, Vol. LIX, pp: 13-17
5. – Del Coco, V.; Molina, N.; Basualdo, J.; Córdoba, M. (2017). *Blastocystis* spp.: Avances, controversias y desafíos futuros. *Revista Argentina de Microbiología*, 49 (1), pp: 110-118.
6. – Coyle, C.; Varughese, J.; Weiss, L.; Tanowitz, H, (2011) *Blastocystis*: To Treat or Not to Treat... *Clinical Infectious Diseases*, 54 (1), pp: 105-110.
- 7.- Ismail, S.; Ali, I.; Fahmy, Z.; Azmy, M.; Magdy, M. (2016). Susceptibility of *Blastocystis hominis* to monolaurine (Lauric Acid), lactoferine (*Lactobacillus acidophilus*) and metronidazole: An *in vitro* and *in vivo* studies. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 10 (21), pp: 14-25
- 8.- Boreham, P.; Stenzel, D. (1993). *Blastocystis* in Humans and Animals: Morphology, Biology and Epizootiology. *Advances in Parasitology*, Vol. 32 Academic Press. Pág. 11,12,15,16,19,20,23,29,40,54
- 9.- Cazorla-Perfetti, D. (2014) ¿*Blastocystis* sp. o *B. hominis*? ¿Protozoario o chromista? *Saber*, Universidad de Oriente, Venezuela, 26 (3), pp:343-346.

- 10.- Vargas-Sánchez, G.; Romero Valdovinos, M.; Ramírez-Guerrero, C.; Vargas-Hernández, I.; Ramírez-Miranda, M.; Martínez-Ocaña, J.; Valadez, A.; Ximénez, C. López-Escamilla, E.; Hernández-Campos, M.; Villalobos, G.; Martínez-Hernández, F.; Maravilla, P. (2015). *Blastocystis* Isolates from Patients with Irritable Bowel Syndrome and from Asymptomatic Carriers Exhibit Similar Parasitological Loads, but Significantly Different Generation Times and Genetic Variability across Multiple Subtypes. PLoS ONE 10(4): e0124006. doi:10.1371/journal.pone.0124006
- 11.-Boroom, K.; Smith, H.; Nimri, H.; Nimri, L.; Viscogliosi, E.; Spanakos, G.; Parkar, U.; Li, L.; Zhou, X.; Ok, Ü.;Leelayoova, S.; Jones, M. (2008).Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis* and asymptomatic infection. Parasites & Vectors, Vol. 1(40), pp:1-16
- 12.- Muñoz, V.; Frade, C. (2005). *Blastocystis hominis*: Parásito enigmático. Cuadernos del Hospital de Clínicas. 50 (1), pp: 79-87.
- 13.- Calvano, T.; Blatz, P.; Vento, T.; Wickess, B., Sutton, D.; Thompson, E., White, C.; Renz, E.; Hospenthal, D. (2011).*Pythium aphanidermatum* Infection following Combat Trauma. J Clin Microbiol. Vol. 49(10), pp: 3710-3713. doi:10.1128/JCM.01209-11
- 14.-Romero, J.; Martínez, L.; Romero, J. (2018). *Blastocystis* sp.:¿Comensal o patógeno? Revista de enfermedades infecciosas en Pediatría. Vol. XXX (123), pp: 1243-1248.
- 15.- Lepczyńska, M.; Bialkowska, J.; Dzika, E.; Piskorz-Ogórek, K.; Korycińska, J. (2017) *Blastocystis*: How do specific diets and human gut microbiota affect development and pathogenicity?.Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 36(1), pp:1531-1540
- 16.-Salinas, J.; Vildozola, H. (2007). Infección por *Blastocystis*. Rev Gastroenterol Perú, 27, pp: 264-274.
- 17.- Zapata-Valencia, J.; Rojas-Cruz, C. (2012). Una actualización sobre *Blastocystis* sp. Revista Gastrohnutp. 14(3), pp:94-100
- 18.-Fonte, L.; Fong, A.; Méndez, Y.; Moreira, Y. (2014). Patogenicidad de *Blastocystis* sp. Evidencias y mecanismos. Revista Cubana de Medicina Tropical, 66 (3), pp: 312-321.
- 19.- Alfellani, M.; Stensvold, R.; Vidal-Lapiedra, A.; Onuoha, E.; Fagbenro-Beyioku, A.; Clark, C. (2013).Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Tropica, 126, pp;11-18.
- 20.-Salinas, J.; Vildozola-González, H. (2007). Infección por *Blastocystis*. Rev Gastroenterol Perú, 27, pp:264-274.

- 21.- Cruz, V.; Plancarte, A.; Morán, C.; Valencia, S.; Rodríguez, G.; Vega, L. (2003). *Blastocystis hominis* among food vendors in Xochimilco markets. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 45 (1-2), pp: 12, 15.
- 22.- Rodríguez, E.; Mateos, B.; González, J.; Aguilar, Y.; Alarcón, E.; Mendoza, A.; Mier, M., Mora, M., Bernal, R. (2008). Transición parasitaria a *Blastocystis hominis* en niños de la zona centro del estado de Guerrero, México. *Parasitol Latinoam*. 63, pp: 20-28.
- 23.-Salgado-López, J.; Roríguez-Bataz, E. (2016). Identificación molecular y análisis filogenético de *Blastocystis spp*. *Tlamati Sabiduria*, 7(2), pp: 1-10.
- 24- Ramírez-Miranda, M.; Hernández-Castellanos, R.; López-Escamilla, E.; Moncada, D.; Rodríguez-Magallán, A.; Pagaza-Melero, C.; González-Angulo, A., Flisser, A., Kawa-Karasik, S.; Maravilla, P. (2010). Parasites in Mexican patients with irritable bowel syndrome: a case-control study. *Parasites & Vectors*.3:96
- 25.- Amim, O. (2006.) The epidemiology of *Blastocystis hominis* in the United States. *Research Journal of Parasitology*. Volume 1(1), pag:1-10.(En línea) Consultado el 1 de noviembre de 2018 en: <https://scialert.net/fulltextmobile/?doi=jp.2006.1.10>
- 26.- Noradilah, S., Moktar, N., Anuar, T., Lee, I., Salleh, F., Manap, S., Mohtar, N., Azrul, S., Abdullah, W., Nordin, A., Abdullah, S. (2017). Molecular epidemiology of blastocystosis in Malaysia: does seasonal variation play an important role in determining the distribution and risk factors of *Blastocystis* subtype infections in the Aboriginal community? *Parasites & Vectors*. Vol. 10(360). DOI 10.1186/s13071-017-2294-2
- 27.- Noradilah, S.; Lee, I., Anuar, T., Salleh, F., Manap, S., Mohtar, N., Azrul, S., Abdullah, W.; Moktar, N. (2016). Ocurrance of *Blastocystis* sp. In water catchments at Malay villages and Aboriginal settlement during wet and dry seasons in Peninsular Malaysia. *PeerJ* 4:e2541; DOI 10.7717/peerj.2541
- 28.-Mohamed, M.; Khan, A.; Abdalsalam, A.; Saad, E. (2010). Seasonal prevalence of *Blastocystis hominis* in Wadi Al-Shati province, southwest, Libya. *Sebha Medical Journal*. Vol 9(2), pp:39-42.
- 29.-Aguirre, A. (2003). Aportaciones sobre la ultraestructura de *Blastocystis hominis*. Ensayo Bibliográfico. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.
- 30.- Carrero, S.; Carrero, M.; Pérez, M.; Carrero, J. (1996). Prevalencia de *Blastocystis hominis* en pacientes sintomáticos. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes*, 5(1-4), pp: 48-55.

- 31.- Villar, J.; Carbajal, J.; Lanuza, M.; Navarro, M.; Borrás, R. (1999). Identification of surface proteins of trophic and cyst forms of *Blastocystis hominis* by biotin labeling. *Folia Parasitologica* 46, pp: 103-106
- 32.- Nasirudeen, A.; Tan, K. (2004). Isolation and characterization of the mitochondrion-like organelle from *Blastocystis hominis*. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 58, pp. 101-109.
- 33.- Wawrzyniak, I.; Roussel, M.; Diogon, M.; Couloux, A.; Texier, C.; Tan, K.; Vivares, C.; Delbac, F.; Wincker, P., Alaoui. (2008). Complete circular DNA in the mitochondria-like organelles of *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitology*. Vol. 38, pp.: 1377-1382
- 34.-Amaya, A.; Trejo, J.; Morales, E. (2015). *Blastocystis spp.*: revisión literaria de un parásito intestinal altamente prevalente. *Rev Univ Ind Santander Salud*, 47 (2), pp: 199-208.
- 35.- Chandramathi, A.; Suresh, K.; Sivanandam, S.; Kuppusamy, U. (2014). Stress exacerbates infectivity and pathogenicity of *Blastocystis hominis*: *In Vitro* and *In Vivo* evidences, *PLoS ONE*, 9(5): e94567. doi:10.1371/journal.pone.0094567
- 36.- Marcos, L; Canales, M.; Terashima, A. (2011). *Blastocystis sp.* Epidemiology and evidences of its pathogenic role. *Rev Peru parasitol.* 19(1), pp 317-e25.
- 37.- Popruk, S.; Udondom, Ru.; Koombapong, K.; Mahittikorn, A.; Kusolsuk, T.; Ruangstittichai, J.; Palasuwan, A. (2015). Subtype Distribution of *Blastocystis* in Thai-Myanmar Border, Thailand. *Korean J Parasitol*, 53(1), pp:13-19
- 38.- Wang, W.; Cuttell, L.; Bielefeldt-Onmann, H.; Inpankaew, T.; Owen, H.; Traub, R. (2013). Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings *Parasites & Vectors*, 6(215), pp: 1-5
- 39.- Skotarczak, B. (2018). Genetic Diversity and pathogenicity of *Blastocystis*. *Ann Agric Environ Med*, 25 (3), pp: 411-416.
- 40.- Barua, P.; Khanum, H.; Haque, R.; Najib, F.; Kabir M. (2015). Establishment of *Blastocystis hominis* in-vitro Culture Using Fecal Samples from Infants in Slum Area of Mirpur, Dhaka, Bangladesh. *Acta Medica International*, 2 (1), pp: 40-46
- 41.-Romero, R. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana*. México: Editorial Médica Panamericana. Pág. 1408

- 42.- Angelov, I.; Lukanov, T.; Tsvetkova, N.; Petkova, V.; Nicoloff, G. (2008). Clinical, immunological and parasitological parallels in patients with Blastocystosis. Journal of IMAB-Annual Proceeding, 1, pp: 55-58
- 43.-Tan,K.(2008) New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. Clin Microbiol Rev.;21, pp.:639-65.
- 44.- Tan, T; Suresh, K; Smith, H. (2008) Phenotypic and genotypic characterization of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenicpotential. Parasitol Res; 104, pp.:85-93.
- 45.- Hussein, E.; Hussein, A.; Eida, M.; Atwa, M. (2008) Pathophysiological variability of different genotypes of human *Blastocystis hominis* Egyptian isolates in experimentallyinfected rats. Parasitol Res; 102, pp.:853-60.
- 46.- Meloni, D; Sancier, G; Poirier, P; El Alaoui, H; Chabé, M; Viscoglios, E. (2011)Molecularsubtyping of *Blastocystis* sp. Isolates from symptomatic patients in Italy. Parasitol Res.109, pp:613-619.
- 47.- Yoshikawa, H.; Abe, N.; Iwasawa, M.; Kitano, S.; Nagano, I.; Wu, Z.*et al.*(2000) Genomicanalysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health carefacilities. J Clin Microbiol;8, pp.:1324-1330.
48. – Tse, SK.; Chadee, K. (1992) Biochemical characterization of rat colonic mucins secretedin response to *Entamoeba histolytica*. Infect Immun. 1992;60, pp:1603-1612.
- 49.- Thomsen, L.; Knudsen, K.; Hedemann, M.; Roepstorff, A. (2006) The effect of dietarycarbohydrates and *Trichuris suis* infection on pig large intestine tissue structure, epithelial cell proliferation and mucin characteristics. Vet Parasitol.;142, pp:112-122.
- 50.- Iguchi, A.; Yoshikawa, H.; Yamada, M.; Kimata, I.; Arizono, N. (2009) Expression of interferon gamma and proinflammatory cytokines in the cecal mucosa of rats experimentally infected with *Blastocystis*sp. strain RN94-9. Parasitol Res;105, pp:135-140
- 51.-Iguchi, A., Yoshikawa, H., Kimata, I., Arizono, N. (2009). Expression of Interferon gamma and proinflammatory cytokines in the cecal mucosa of rats experimentally with *Blastocystis* sp. Strain RN94-9. Parasitol Res. Vol. 105 (1), pp:135-140. doi: 10.1007/s00436-009-1373-5.
- 52.- Sekar, U.; Shanthi, M. (2013). *Blastocystis* Concensus of treatment and controversies. Trop Parasitol. 3 (1), pp: 35-39.

- 53.- Wawrzyniak, I.; Poirier, P.; Viscogliosi, E.; Dionigia, M.; Texier, C.; Delbac, F.; Alaoui, E. (2013). *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Ther Adv Infect Dis*, 1 (5), pp: 167-178.
- 54.- Puthia, M.; Vaithilingam, A.; Lu, J.; Tan, K. (2005) Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitol Res*;97, pp:386-389.
- 55.- Nagel, R., Traub, R.; Kwan, M.; Bielefeldt, Ohmann, H. (2015). *Blastocystis* specific serum immunoglobulin in patients with irritable bowel syndrome (IBS) versus healthy controls. *Parasites & Vectors*. Vol. 8 (453). DOI 10.1186/s13071-015-1069-x
- 56.- Roberts, T.; Stark, D.; Harkness, J.; Ellis, J. (2014). Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis sp.* *Gut Pathogens*, 6 (7), pp: 1-9
- 57.- Poirier, P., Wawrzyniak, Vivares, C.; Delbac, F.; Alaoui, H. (2012). New insights into *Blastocystis* spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog*. Vol. 8(3): e1002545. doi:10.1371/journal.ppat.1002545
- 58.- Silo, S.; Puthia, M.; Lee, A.; Lu, J.; Tan, K. (2006). Protease activity of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res*. Vol. 99, pp.: 126-130.
- 59.- Olivo A, Romero M, Gudiño A. Findings related to IL-8 and IL-10 gene polymorphisms in a Mexican patient population with irritable bowel syndrome infected with *Blastocystis*. *Parasitol Res*. 2012;110: 2830 DOI 10.1007/s00436-012-2830-0.
- 60.- Oppenheim, J.; Zachariae, C.; Mukaida, N.; Matsushima, K. (1992) Properties of the novel proinflammatory supergene intercrine cytokine family. *Annu Rev Immunol*. 1 (9), pp:617-648.
- 61.- Charo, I; Ransohoff, M. (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*;354, pp:610-621.
- 62.- Fabian I, Kletter Y, Mor S, Geller-Bernstein C, Ben-Yaakov M, Volovitz B, *et al.* (1992) Activation of human eosinophil and neutrophil functions by haematopoietic growth factors: comparisons of IL-1, IL-3, IL-5 and GM-CSF. *Br J Haematol*; ;80, pp:137-143.
- 63.- Elwakil H, Hewedi I. (2010) Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. *Parasitol Res*;107, pp:685-689.
- 64.- Pavanelli, M.; Kaneshima, E.; Uda, C., Colli, C.; Falavigna-Guilherme, A.; Gomes, M.

- (2015). Pathogenicity of *Blastocystis spp* to the Gastrointestinal tract of mice: relationship between inoculum size and period of infection. Rev. Inst. Trop. Sao Paulo. 57(6), pp: 467-472.
- 65.- Valsecchi, R.; Leghissa, P.; Greco, V. (2004) Cutaneous lesions in *Blastocystis hominis* infection. Acta Derm Venereol; 84, pp: 322–323.
- 66.- Yavasoglu, I.; Kadikoylu, G.; Uysal, H., Ertug, S.; Bolaman, Z. (2008) Is *Blastocystis hominis* a new etiologic factor or a coincidence in iron deficiency anemia? Eur J Haematol; 81, pp:47–50.
- 67.-Nagel, R. (2015) Are Blastocystis species relevant to humans? The University of Queensland, Australia, pp:3-5
- 68.- Nourison, C.; Scanzi, J.; Pereira, B.; NkoudMongo, C.; Warrzyniak, I.; Cian, A., Viscongiosi, E.; Livrelli, V.; Delbac, F.; Dapoigny, M.; Poirier, P. (2014). *Blastocystis* Is Associated with Decrease of Fecal Microbiota Protective Bacteria: Comparative Analysis between Patients with Irritable Bowel Syndrome and Control Subjects. PLoS ONE, Vol. 9(11), pp. 1-9, e111868. doi:10.1371/journal.pone.0111868
- 69.- Rostami, A.; Riahi, S.; Haghighi, A.; Saber, V.; Armon, B.; Seyyedtabaei, S. (2017). The role of *Blastocystis* sp. And *Dientamoeba fragilis* in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. Parasitol Res (2017), 116, pp:2361-2371.
- 70.- Stark, D., Van Hal, S., Marriott, D., Ellis, J., Harkness, J.(2007) Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. Int J Parasitol; 37, pp:11–20.
- 71.- Zhang, X.; Qiao, J.; Da, R.; Zhao, L.; Wei, C. (2012). *In vitro* culture of *Blastocystis hominis* in three liquid media and its usefulness in the diagnosis of *Blastocystis*. International Journal of Infectious Diseases, 16, pp: e23-e28
- 72.-Darabian, A.; Berenji, F.; Ganji, A.; Fata, A., Jarahi, L. (2016). Association between *Blatocystis hominis* and irritable bowel syndrome (IBS). Inte J Med Res Health Sci, 5(9), pp:102-105
- 73.- Dogruman.AI, F.; Kustimur, S.; Yoshikawa, H., Tuncer, C.; Simsek, Z.; Tanyuksel, M.; Araz, E.; Boorum, K. (2009). *Blastocystis* subtypes in irritable bowel disease in Ankara, Turkey. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 104(5), pp. 724-727.

- 74.- Kumasaramy, V.; Kuppusamy, U.; Jayalakshmi, P.; Samudi, C.; Ragavan, N.; Kumar, S. (2017). Exacerbation of colon carcinogenesis by *Blastocystis sp.* PLoS ONE, 12 (8): e0183097.
- 75.-Colmenares, N.; Medina, C.(2014). infección por *Blastocystis sp* en el hombre: Mecanismos patógenos. Boletín Médico de Posgrado. UCLA Decanato de Ciencias de la Salud. Barquisimeto- Venezuela. Vol. XXX (4), pp: 326-335.
- 76.- Eme, L.; Gentekaki, E.; Curtis, B.; Archibald, J.; Roger, A. (2017). Lateral Gene Transfer in the Adatation of the anaerobic parasite Blastocystis to the gut. Current Biology. Vol. 20, pp807-820. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.003>
- 77.-Beiromvand, M.; Hashemi, S.; Arjmand, Reza.; Sadjadei, N.; Hardanipasand, L. (2017). Comparative Prevalence of *Blastocystis* in Patients with the Irritable Bowel Syndrome and Healthy Individuals: A Case Control Study. Jundishapur J Microbiol, 10(6): e13572.
- 78.- Martínez-Barbabosa, I.; Gutiérrez-Quiroz, M.; Ruiz-González, L.; Ruiz-Hernández, A.; Gutiérrez-Cárdenas, E.; Gaona, E. (2010). *Blastocystis hominis* y su relación con el estado nutricional de escolares en una comunidad de la sierra de Huayacocotla, Veracruz, México. Rev Biomed, 21, pp: 77-84.
- 79.-Devera, R.; Blanco, Y.;Requena, I.; Velázquez, V. (2006). Diagnóstico de *Blastocystis hominis*: bajo rendimiento de los métodos de concentración de formol éter y sedimentación espontánea. Rev Biomed, 17, pp: 231-233.
- 80.- Tapia-Romero, R.; Martínez-Méndez, L.; Dávila-Solis, B.; López-Martínez, B.; Parra-Ortega, I. (2015). Transición parasitaria: experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel (1990-2010) Boletín Médico del Hospital Infantil de México. 72(3), pp:174-180.
- 81.- Zerpa, R.; Espinoza, Y.; Huiza, A. (2012). Prueba de susceptibilidad antiparasitaria *in vitro* para *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica*-*E. dispar*, *Balantidium coli*. Anales de la Facultad de Medicina, 73 (1), pp: 47-49
- 82.-Cañete, R.; Rodríguez, P. (2012). Infección por *Blastocystis sp.*: revisión de la literatura. Rev. Méd Electrón, 34 (5). Consultado en <http://www.revmatanzas.sld.cu/revista%20medica/ano%202012/vol5%202012/tema05.htm> el 05/06/2018
- 83.- Termmathurapoj, S.; Loelayoova, S.; Aimpun, P.; Thathaisong, U.; Nimmanon, T.; Taamasri, P.; Mungthin, M. (2004). The usefulness of short-term *in vitro* cultivation for the

detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. Parasitol Res, 93, pp: 445-447.

84.-Kukoscke, K.; Müller, H. (1991).SDS-PAGE and immunological analysis of different axenic *Blastocystis hominis* strains. J. Med Microbiol. 35, pp:35-39.

85 .- Barret, H. (1921) A method for the cultivation of *Blastocystis*. Ann Trop Med Parasitol. VBoI 15: 113-116

86.-Leelayoova, S.; Taamasri, P.; Rangsin, R.; Naaglor, T.; Thathaisong, U.; Mungthin M. (2002). In-vitro cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 96, pp: 803-807.

87.-Jones, W. (1946). The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*; with a method for evaluating the anti-amoebic properties of new compounds. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 40: 130-140.

88.- Ortigoza, S.; Cruz, M.; Hernández, M.; Castañeda, M.; Castro, M.; González, M. (2011). Medio de cultivo alternativo para el diagnóstico de *Blastocystis hominis*. Peruvian Journal of Parasitology. 19 (2), pp: 52-59.

89.- Micheloud, D.; Jensen, J.; Fernandez, E.; Carbone, J. (2007). Angioedema crónico e infección por *Blastocystis*. Rev Gastroenterol Perú. 27, pp:191-193

90.-Eida, O.; Hussein, E.; Eida, A.; El-Moamly.; Salem, A. (2008). Evaluation of the nitric oxide activity against *Blastocystis hominis in vitro* and *in vivo*. Journal of the Egyptian Society of Parasitology, 38 (2), pp:521-536

91.- Kurt, Ö.; Al, F.; Tanyuksel, M. (2016). Eradication of *Blastocystis* in humans: Really necessary for all? Parasitology International. Vol. 66, pp: 797-801.

92.- Roberts, T.; Bush, S.; Ellis, J.; Harkness, J.; Stark, D. (2015). *In Vitro* Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Blastocystis* Antimicrob Agernts Chemother, 59 (8), pp: 4417-4423.

93.- Higueta, L. (2016) Blastocistosis. Aprende en Línea. Plataforma Académica para Pregrado y Posgrado. Programa Integración de Tecnología a la Docencia. Vicerrectoría de Docencia, Universidad de Antioquía. En: <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=101082> el 12/06/2018

94.- Batista, L.; Pérez-Jove, J.; Rosinach, M.; Gonzalo, V.; Saiz, E.; Loras, C.; Forné, M.; Esteve, M.; Fernández-Bañares, F. (2017). Low efficacy of Metronidazole in the

eradication of *Blastocystis hominis* in Symptomatic patients: Case series and systematic literature review. Gastroenterol Hepatol, 40(6), pp 381-387.

95.- Padukone, S.; Mandal, J.; Parija, S. (2018).Detection of *Blastocystis* in clinical stool specimens using three diferent methods and morphological examination in Jones' médium. Trop Parasitol, 8(1), pp: 33-40.

96.- Burstein-Alva, S. (2005). Ciclosporosis: Una parasitosis emergente (II). Diagnóstico Microbiológico mediante una nueva técnica de coloración. Rev Gastroenterol.Perú; 25, pp: 336-340.

97.-Elghareeb, A.; Younis, M.; Fakahany, A.; Nagaty, I.; Nagib, M. (2015)Laboratory diagnosis of *Blastocystis spp.* in diarrheic patients. Trop Parasitol. 5(1), pp 26-41.

98.- Zierdt, C. (1973). Studies of *Blastocystis hominis*.Journal of Eukariotic Microbiology. 20(1), pp: 114-121.

99.- Clark, C.; Stensvold, C. (2016). *Blastocystis*: Isolation, Xenic cultivation and Cryopreservation. Current Protocols in Microbiology; 43(1), pp: 20A.1.1-20A.1.8

100.- Comparación de la eficacia de tres medios de cultivo *in vitro* para el desarrollo de *Blastocystis spp.* Rev Inv Vet Perú; 24(4), pp: 480-488

101.-Coskun, A.; Malatyali, E.; Ertabaklar, H.; Yasar, M.; Karaoglu, A.; Ertug, S. (2016). *Blastocystis* in ulcerative colitis patients: Genetic diversity and analysis of laboratory findings. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine; 9(9), pp: 916-919.

102.-Silva-Díaz, H.; Flores – Esqueche, L.; Llatas-Cancino, D.; Guevara, G.; Silva García, T. (2016). Frecuencia y susceptibilidad antiparasitaria *in vitro* de *Blastocystis hominis* en pacientes admitidos en el Hospital regional Lambayeque, Perú. Rev. Gastroenterol Peru, 36(3), pp: 197-202