

Morfología y respuesta de anticuerpos IgM e IgG anti-*Blastocystis sp.* en pacientes con síntomas gastrointestinales

Emilia Elena Barrios^{1,2}, Deyanira Guevara¹, Olga Ojeda¹, Viana Pinto¹, Wolfan Araque¹, Víctor Delgado¹, María Gabriela Barrios¹

¹ Laboratorio de Helminología del Instituto BioMolP. Universidad de Carabobo, Valencia, Venez

² Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional, Escuela de Bioanálisis-sede Carabobo., Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.

Correspondencia: Emilia Barrios.

E-mail: barrios.emilia@gmail.com.

Recibido: Abril 2013 **Aprobado:** Septiembre 2013

RESUMEN

Es importante definir criterios diagnósticos que permitan dilucidar el papel patógeno de *Blastocystis sp.* Se evaluó morfología y se estimó el diámetro de las formas, número de parásitos por campo y por gramo de heces y los anticuerpos IgM e IgG anti-*Blastocystis sp.* mediante ELISA, en sujetos con sintomatología general y portadores sanos. Se encontró 77% de muestras positivas para *Blasctocystis sp.*, 52% provenientes de pacientes con síntomas como flatulencia 6 (24%), dolor abdominal 5 (20%), náuseas 2 (8%), diarrea 6 (24%) y estreñimiento 6 (24%). Los rangos de parásitos por campo más frecuente en sintomáticos fueron 0-3 (74%) y 10-12 (26%), mientras que 100% de los pacientes asintomáticos presentaron *Blastocystis sp.* en el rango 0-3. Los pacientes asintomáticos presentaron menor número de parásitos por gramo de heces, en el rango de 0-3 y el rango 7-10 con altas cargas parasitarias solo fue observado en sintomáticos. Se encontró menor cantidad de formas granulares en ambos grupos, en el rango 0-3 en sintomáticos: 85% vacuolares y 15% granulares; 76% vacuolares y 24% granulares, en asintomáticos. En el rango 10-12, 98% vacuolares y 2% de granulares, en sintomáticos. El diámetro promedio de las formas vacuolares fue $11,9 \pm 2 \mu\text{m}$ en los pacientes sintomáticos y $7,9 \pm 3,7 \mu\text{m}$ en asintomáticos. En los granulares fue $9,3 \pm 2,3 \mu\text{m}$ en sintomáticos y $8,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ en asintomáticos.

Observándose diferencias significativas entre las formas vacuolares de ambos grupos ($P=0,000026$), pero no en los granulares ($P=0,346$). El 3,5% de los pacientes sintomáticos presentaron anticuerpos IgG anti-*Blastocystis sp.* El estudio morfológico empleado contribuyó en la optimización del diagnóstico, mientras que las técnicas inmunoenzimáticas resultaron de baja sensibilidad.

Palabras clave: *Blastocystis sp.*, morfología, morfometría, ELISA.

ABSTRACT

Morphology and response of IgM and IgG anti-*Blastocystis sp.* in patients with gastrointestinal symptoms.

It is important to define diagnostic criteria to elucidate the pathogenic role of *Blastocystis sp.* Morphology was assessed and diameter of the shapes, number of parasites per field and per gram of faeces and *Blastocystis sp.* IgM and IgG antibodies was estimated by ELISA in subjects with constitutional symptoms and healthy carriers. Seventy percent *Blasctocystis sp* positive samples were found, 52% from patients with symptoms such as flatulence 6 (24%), abdominal pain 5 (20 %), nausea 2 (8%), diarrhea 6 (24%) and constipation 6 (24%). Ranges of parasites per field found more frequently in symptomatic patients were 0-3 (74%) and 10-12 (26%), while 100% of asymptomatic patients had *Blastocystis sp.* in the range 0-3. Asymptomatic patients showed lower number of parasites per gram feces in the range of 0-3 and the 7-10 range with high parasitic load was only observed in symptomatic. Less granular forms in both groups was found, in the range 0-3 in symptomatic patients: 85% vacuolar and 15% granular; 76% vacuolar and 24% granular in asymptomatics. In the range 10-12, 98% vacuolar and 2% granular in symptomatic patients. The average diameter of the vacuolar forms was $11.9 \pm 2 \mu\text{m}$ in symptomatic patients and $7.9 \pm 3.7 \mu\text{m}$ in asymptomatics. In the granular form was $9.3 \pm 2.3 \mu\text{m}$ in symptomatic and $8.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$ in asymptomatics. Significant difference was found among vacuolar forms of both groups ($P=0.000026$), but not in the granular form ($P=0.346$). Only 3.5 % of symptomatic patients had IgG antibodies to *Blastocystis sp.* The morphological study employed contributed to the diagnosis optimization while immunoenzymatic techniques were of low sensitivity.

Key words: *Blastocystis sp.*, morphology, morphometry, ELISA.

INTRODUCCIÓN

El protozooario polimórfico *Blastocystis* sp., se ubica dentro del grupo de parásitos considerados emergentes o re-emergentes. Su ubicación taxonómica difícil de definir hasta ahora, lo ubica como el único parásito humano del Reino Cromista (1). Es el agente causal de la Blastocistosis o enfermedad de Zierdt-Garavelli, infección cosmopolita de prevalencia creciente, descrita en el humano y otros vertebrados (2-4).

El parásito presenta una prevalencia del 50% en países en vías de desarrollo, asociada a las condiciones climáticas e higiénicas- sanitarias (5-7). En Venezuela este protozooario se ha ubicado como el parásito de mayor prevalencia, la cual corresponde al 60% de la población en general (8), mientras que en regiones del estado Bolívar la prevalencia alcanza cifras de 76,2% (9). En cuanto a su relación con sintomatología, este parásito es encontrado en 61,6% de los pacientes sintomáticos y 41,6% de los asintomáticos, con una incidencia mayor en el grupo etario comprendido entre los 19 y 30 años de edad (10).

A pesar de la alta prevalencia de este parásito, no existen criterios que lo ubiquen como un patógeno intestinal, ya que algunos autores lo consideran como un comensal, por tal razón se ha intentado definir algunos criterios para orientar su ubicación como agente patógeno, estos son: (a) Numerosas formas parasitarias en muestras fecales (11), (b) Presencia de formas vacuolares grandes en las heces del paciente (12), (c) Ausencia de otras causas (funcionales, otros parásitos, bacterianas, micóticas y virales) y (d) Desaparición de los síntomas después del tratamiento antiparasitario específico.

De igual manera, la ubicación taxonómica de este parásito ha sido un tema controversial; en 1911 Alexieff lo denominó *Blastocystis enterocola*, luego Brumpt en 1912 le dio el

nombre de *Blastocystis hominis* y lo describe como una levadura no patógena, posteriormente en estudios realizados por Zierdt (1967) sobre la morfología y fisiología del parásito fue clasificado como un protozooario perteneciente al *Phylum Sarcomastigophora*, *Orden Amoebida*. Luego en 1988, Zierdt basándose en las características del parásito, lo clasificó en el Reino *Protista*, Subreino *Protozoo*, *Phylum Sarcomastigophora*, *Subphylum Sarcodina*, *Superclase Rhizopoda*, *Subclase Gymnamoeba*, *Orden Amoebida* y crea un nuevo sub-orden *Blastocystina*. Finalmente, estudios más recientes de análisis filogenético del ARN ribosomal del microorganismo, concluyen que debe ser incluido con los *Stramenopiles*, un complejo grupo que incluye las algas marrones, diatomeas y otros protistas uni y multicelulares (13,14).

En cuanto al mecanismo de transmisión de la Blastocistosis, se ha sugerido que ocurre de hombre a hombre a través del agua de bebida, frutas y hortalizas contaminadas con excrementos lo cual corresponde a una vía de transmisión fecal-oral, también se plantea la transmisión oral-genital u oral-anal (7).

La identificación de este microorganismo a nivel de laboratorio clínico se realiza a través de una preparación húmeda con Salina y Lugol y esta corresponde a la técnica de mayor sensibilidad en el diagnóstico e identificación del parásito (15). A pesar de que en la literatura se describen hasta seis morfologías del parásito, las formas más relevantes observadas con estas técnicas corresponden a la forma vacuolar, granular, ameboide y quística (16).

La forma vacuolar es observada hasta en un 98% de los casos, en heces frescas y constituye la principal forma diagnóstica (16,17); sin embargo, otras técnicas tales como coloraciones de Giemsa, Hematoxilina – eosina, tinción con Wrigth y tinción tricrómica permiten realizar una evaluación más detallada del parásito y hacer un diagnóstico más confiable (15).

El papel de *Blastocystis sp.* como patógeno es controversial, debido a que muchos de los pacientes a los cuales se les determina la existencia de éste protozooario presentan sintomatología que se caracteriza por manifestaciones gastrointestinales y generales, todas inespecíficas, las cuales parecen estar asociadas a los siguientes factores: (a) Número de parásitos, (b) Inmunosupresión y pacientes inmunocomprometidos, (c) Relación con otras enfermedades, entre las cuales se han descrito diarrea, dolor abdominal, malestar o molestias intestinales, náuseas, inflamación y flatulencia excesiva, cólico, estreñimiento, mareos, pérdida de peso, prurito perianal, tenesmo, vértigo y anorexia, fiebre, esteatorrea y leucocitos en heces, hepatoesplenomegalia (en casos severos y con complicaciones de otra índole), rash cutáneo y colitis, entre otros (18). Adicionalmente, el parásito se ha aislado de pacientes que padecen de síndrome diarreico, artritis reactiva y manifestaciones alérgicas. Sin embargo, otros pacientes no presentan sintomatología alguna. Por esta razón aún existe la incertidumbre de considerar a este microorganismo como un patógeno gastrointestinal (3)

El comportamiento oportunista de *Blastocystis sp.* es palpable en pacientes con compromiso del sistema inmune, en los cuales la emisión de formas parasitarias a través de las heces es mayor y la sintomatología intestinal y extraintestinal es grave. No obstante, también en pacientes inmunocompetentes se han encontrado infecciones sintomáticas con gran emisión de formas parasitarias. Por tal razón, algunos investigadores sugieren que pudieran existir distintas variantes del parásito que determinan la patogenicidad (19), posiblemente asociadas a enzimas producidas por el parásito (20).

Los hallazgos anteriores evidencian la necesidad de caracterizar morfológicamente aislados de *Blastocystis sp.* en pacientes con

sintomatología y portadores sanos, a fin de optimizar el diagnóstico de rutina por técnicas coproparasitológicas de fácil ejecución en función del comportamiento patogénico o comensal del parásito, identificando y cuantificando las morfologías predominantes en cada grupo de pacientes. Así como el empleo de formas parasitarias aisladas de pacientes sintomáticos y asintomáticos como fuente de antígenos que permitan establecer una relación entre criterios morfológicos y respuesta serológica, información de utilidad en el desarrollo futuro de técnicas serológicas que permitan discriminar los aislados patógenos de *Blastocystis sp.* de los que no lo son. El objetivo fue evaluar la morfología y serología de *Blastocystis sp.* aislado de pacientes sintomáticos y asintomáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación, aislamiento y concentración de *Blastocystis sp.* A los pacientes seleccionados para el estudio se les informó de los objetivos de la investigación a fin de que manifestaran por escrito su conformidad de participar en el estudio, lo cual hicieron por escrito en un formato de consentimiento informado, como dictan las pautas bioéticas. Se aplicaron las técnicas parasitológicas, Salina, Lugol, Kato, Baerman y Kinyoun para el descarte de huevos, larvas y coccidios, respectivamente en heces y simultáneamente se les hizo a los pacientes una punción venosa para extraer suero destinado a la diagnóstico serológico de *Blastocystis sp.* mediante ELISA.

Las muestras de heces positivas únicamente para *Blastocystis sp.* se les realizó un conteo de formas parasitarias por campo, utilizando el objetivo de 40 X. La muestra se pesó y se eliminaron los detritus celulares por tamizaje a través de gasa, seguido de resuspensión en Solución Salina Isotónica (SSI 0,85% p/v), y se realizaron tres lavados de 10 min a 3500 rpm y dos lavados con SSI con antibióticos (100 µg

de estreptomicina/mL y 100 UI de penicilina /mL de SSI) para la eliminación de bacterias.

Al finalizar los lavados, el sedimento se resuspendió con SSI y se le realizaron contajes diferenciales con respecto a las morfologías de *Blastocystis sp.* encontradas en 20 μ L de la resuspensión, empleando objetivo de 40X, para establecer una relación del número de parásitos con el volumen conocido, y con el peso de la muestra de heces. Otra gota de la suspensión se empleó para medir el diámetro de las distintas morfologías del parásito, empleando un micrómetro ocular.

Con la finalidad de purificar los *Blastocystis sp.*, la suspensión total de las heces, se colocó en tubos cónicos con ficol (0,5% p/v)-diatrizoato de sodio (16% p/v), a partes iguales y se centrifugó por 30 minutos a 4°C a 3000 rpm. El contenido de los anillos formados en la interfase de los líquidos, se les realizó dos lavados con SSI de 10 minutos a 1500 rpm. Una gota de esta suspensión se colocó sobre una lámina portaobjetos y se fijó con metanol para realizar la coloración May Grünwald-Giemsa aplicando ciertas modificaciones (21). Para ello, se añadieron unas gotas de May-Grünwald Eosina al 1% a la lámina previamente fijada por 20 minutos y Giemsa diluída 1:5 en agua destilada por 20 minutos.

Respuesta serológica anti-*Blastocystis sp.*

Esta se hizo empleando homogenatos crudos de *Blastocystis sp.* purificados mediante gradiente de ficol-diatrizoato de heces de pacientes infectados. Para la preparación de los antígenos 1×10^6 parásitos fueron homogenizados en un homogenizador de teflón con 100 μ L de agua (4 h en baño frío), hasta más de 90% de lisis, la fracción soluble se separó por centrifugación a 14.000 rpm por 2 h a 4 °C (20). Al sobrenadante con la fracción soluble o antígeno soluble de *Blastocystis sp.* (ASB), se le determinó la concentración de proteínas (22) y se sensibilizaron placas de ELISA con 20 μ g de proteínas por pozo por 12 horas a temperatura ambiente. Seguido de

lavados con PBS y adición de 50 μ L de los sueros de pacientes y controles sanos e incubación por 1 hora a 37°C. Luego, se agregó el anticuerpo secundario, IgM o IgG anti-humana conjugada a peroxidasa por 1 hora a 37°C y ocurrida la reacción de peroxidación, se adicionó peróxido más orto-fenil endiamina diluida en tampón fosfato citrato pH 5. La reacción colorimétrica fue leída en un lector multiscan a 405 nm.

Análisis de los datos. La proporción de pacientes sintomáticos y asintomáticos evaluados en el estudio y los signos y síntomas predominantes en cada grupo se expresaron en porcentaje. Los *Blastocystis sp.* en las muestras de heces se expresaron como el promedio $\pm$ la desviación estándar de parásitos por gramo de heces. La semi-cuantificación del número de parásitos por campo en rangos de 0-1/0-3, 1-2/1-3 y 2-3/4-5, detallados al microscopio con objetivo de 40X. El recuento diferencial de formas vacuolares y granulares se expresó como el promedio del porcentaje, y el promedio del diámetro en micrómetros (μ m). La comparación de las morfologías y morfometrías en el grupo de pacientes con sintomatología, en relación a los portadores sanos se hizo empleando la prueba T de Student, considerándose una $P \geq 0,05$ como estadísticamente significativa. Los resultados de la respuesta de anticuerpos IgM e IgG se expresaron en porcentaje de sueros positivos, obtenidos a partir del punto de corte calculado a partir del promedio $\pm$ 2x desviación estándar en sueros positivos.

RESULTADOS

Inicialmente fueron analizadas 119 muestras, de las cuales el 77% fueron positivas únicamente para *Blastocystis sp* y de éstas se emplearon 48 adecuadas en cantidad para el contaje. Las muestras positivas provenientes de pacientes sintomáticos fueron 25 (52%). Entre los síntomas estuvieron: flatulencia 6 (24%), estreñimiento 6 (24%), diarrea 6 (24%), dolor abdominal 5 (20%) y náuseas 2 (8 %).

Dos de los pacientes presentaron dolor de cabeza asociado con otros síntomas, entre ellos flatulencia y diarrea. En cuanto a la consistencia de las heces, en los pacientes sintomáticos se presentaron 12% de heces blandas, mientras que en los pacientes asintomáticos fueron blandas el 4,3%. Lo anterior refleja una tendencia a una relación entre consistencia de las heces y presencia del parásito.

Al estimar el número de parásitos por campo se encontró que los rangos más frecuentes en pacientes sintomáticos fueron los rangos 0-5 (74%) y 6-12 (26%). Mientras que en los asintomáticos el 100% de los parásitos se encontró en un rango de 0-3. Al relacionar la carga parasitaria con el número de parásitos por campo, se observó que en el rango de 0-3 el número de parásitos por gramo de heces fue 514142 ± 260870 en sintomáticos, y 192922 ± 115826 en asintomáticos, lo que corresponde a un número de 2,7 veces más parásitos en sintomáticos con respecto a asintomáticos. Mientras que el rango 6-12 parásitos por campo solo se observó en pacientes sintomáticos y correspondió a 839618 ± 418228 parásitos por gramo de heces y corresponde a 4,4 más carga parasitaria en comparación con la carga en el rango 0-3 de pacientes asintomáticos (Tabla 1).

Tabla 1. Número de *Blastocystis sp.* por campo y gramos de heces en pacientes sintomáticos y asintomáticos

Parásitos / campo	Parásitos / g	Pacientes
0 - 3	514142 ± 260870 192922 ± 115826	sintomáticos asintomáticos
6 -12	839618 ± 418228	sintomáticos

En la identificación de las morfologías de *Blastocystis sp.* en heces, se observó una menor cantidad de formas granulares en relación con las vacuolares, en ambos grupos

de pacientes donde los rangos 0-5 mostraron un promedio de 421596 (82%) de formas vacuolares y 92546 (18%) de formas granulares en los pacientes sintomáticos. En el mismo rango, los pacientes asintomáticos presentaron 146621 (76%) de formas vacuolares y 16792 (24%) formas granulares. Esto demuestra que en los pacientes asintomáticos y sintomáticos existe similitud en cuanto al predominio de las formas vacuolares. En el rango 6-12, presentes sólo en sintomáticos, se observó de manera similar, un predominio de vacuolares, 822826 (98%) de vacuolares y 16792 (2%) de formas granulares (Tabla 2).

En el presente trabajo se encontró un predominio de formas vacuolares en pacientes con síntomas y sin síntomas, pero interesantemente, en los pacientes sintomáticos en el rango 10-12, se observó la forma vacuolar casi exclusivamente.

Morfometría. El diámetro promedio de los *Blastocystis sp.* de las formas vacuolares fue $11,9 \pm 2 \mu\text{m}$ en los pacientes sintomáticos y $7,9 \pm 3,7 \mu\text{m}$ en asintomáticos. Mientras que en las formas granulares fue de $9,3 \pm 2,3 \mu\text{m}$ en sintomáticos y $8,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ en asintomáticos (Tabla 2). Observándose diferencias estadísticamente significativas entre las formas vacuolares de ambos grupos ($P=0,000026$), pero no en los granulares ($P=0,346$).

Tabla 2. Morfología y morfometría de *Blastocystis sp.* en pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Pacientes	<i>Blastocystis sp.</i> x C (%)*		X $\pm$ DE (μm)** vacuolares / granulares
	vacuolares	granulares	
Sintomáticos			
0 - 5 x C	82	18	$11,9 \pm 2 / 9,3 \pm 2,3$
6 - 12 x C	98	2	
Asintomáticos			
0 - 5 x C	76	24	$7,9 \pm 3,7 / 8,2 \pm 0,1$

Blastocystis sp. x C (%)*= número de parásitos por campo y porcentaje de formas.

X $\pm$ DE (μm)*= diámetro de las formas vacuolares y granulares expresadas por promedio $\pm$ DE en μm .

Serología. En el estudio serológico se emplearon 35 pacientes con sintomatología intestinal, de los cuales 21 (60%) resultaron positivos para IgM, y solo 6 (17,1%) para IgG. Mientras que los pacientes sin sintomatología no presentaron títulos de anticuerpos por encima del punto de corte, establecido en 0,196 (IgM) y en 0,100 (IgG).

DISCUSIÓN

Previamente se ha demostrado la relación entre la presencia de *Blastocystis sp.* y sintomatología gastrointestinal, así como del predominio de síntomas como flatulencia, dolor abdominal y diarrea (16).

Al analizar los resultados obtenidos en los conteo por campo y por heces, se encontró tendencia a la concordancia entre el reporte de parásito por campo y la carga parasitaria del paciente, por tanto es recomendable que de forma rutinaria se reporte tal valor, corroborando lo encontrado por otros autores, que señalan que existe relación entre la presencia de cinco *B. hominis* por campo y sintomatología intestinal, por lo que concluyen que no es necesario grandes cantidades del protozooario para ocasionar sintomatología, pero sí para que esta sea más severa se (9-11). Sin embargo, los valores deben ser analizados en forma cuidadosa, porque se observó que en los pacientes asintomáticos también existe una carga parasitaria alta en el rango de 0-3, aunque menor a la de los pacientes sintomáticos, lo que pudiera indicar que el número de parásitos podría no ser predictivo del desarrollo de síntomas en los pacientes en ese rango, como se ha demostrado previamente, ya que pacientes con baja carga parasitaria pueden presentar síntomas gastrointestinales, lo que indica que la presencia de infecciones leves no excluye la posibilidad de presentar sintomatología (14) y que podría relacionarse a otros factores independientes del número de parásitos, como son el tipo de morfología o la capacidad del parásito para producir sintomatología (16).

Resulta interesante que el rango 10-12 solo se observó en los pacientes sintomáticos, lo que pudiera indicar que a medida que aumenta la carga parasitaria se evidencia una relación directa entre los conteos por campo y la carga parasitaria.

Desde un punto de vista práctico, en la rutina del laboratorio clínico, la aparente concordancia entre el conteo por campo y la carga parasitaria por gramo de heces es un aporte importante, puesto que los conteos por campo y por gramo de heces más altos, no fueron observados en sujetos sin sintomatología y podrían tener utilidad como criterio de patogenicidad de éste protozooario tan controversial.

Tal como ha sido reportado previamente por otros autores, que consideran que la presencia de formas vacuolares se encuentra siempre asociado a sintomatología (1).

En relación a morfologías de *Blastocystis sp.* en las heces existen opiniones encontradas, recientemente se demostró que las formas ameboides aisladas de heces de pacientes sintomáticos mantenidas en cultivo poseen capacidad de multiplicación y signos de actividad metabólica, por lo que los autores proponen que esta morfología debe ser considerada como un indicativo de patogenicidad (7,16), en especial si se presentan cinco o más parásitos por campo, en ausencia de otro patógeno que pueda ser responsable de las manifestaciones clínicas (16, 18, 19).

Resultados en relación al tamaño del diámetro, corroboran uno de los criterios de patogenicidad de *Blastocystis sp.* referente a que los pacientes asintomáticos presentan formas vacuolares de aproximadamente 10 μ m (23).

Se demostró una alta respuesta de anticuerpos anti-IgM y escasa respuesta anti-IgG sérica, en pacientes diagnosticados positivos mediante coprología (24). En contraste, a lo encontrado

en el presente estudio, en otro estudio (25) donde fueron evaluados pacientes positivos para *Blastocystis sp.*, los pacientes sin sintomatología se observó ausencia de respuesta humoral (IgA, IgM e IgG), sin embargo, 86% de los pacientes sintomáticos presentaron anticuerpos IgG altos.

Se concluye, que el estudio de las morfologías, la cuantificación diferencial de formas por campo y la cuantificación del número de parásitos por campo en las heces en sujetos con y sin sintomatología, en ausencia de otros agentes patógenos contribuye en la optimización del protocolo de trabajo para el diagnóstico de *Blastocystis sp.* empleando las técnicas coproparasitológicas rutinarias de diagnóstico directo. Mientras que, las técnicas serológicas inmuno-enzimáticas resultan ser menos sensibles que las técnicas coproparasitológicas.

Agradecimiento. Este trabajo se realizó con el financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo a través del Proyecto de Inversión Menor CDCH-UC-AM # 0466-10.

REFERENCIAS

1. Salinas J, Vildozola H. Infección por *Blastocystis*. Rev Gastroenterol Perú 2007; 27(3):264-274.
2. Tan S, Singh H, Yap E. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spot in terra incognita. Int J Parasitol 2002; 32: 789-804.
3. Garavelli P, Scaglione L, Biccocchi R, Libanore M. Pathogenesis of blastocystosis. Lancet 1991; 338: 57.
4. Kozubsky L, Archelli S. Algunas consideraciones acerca de *Blastocystis sp.*, un parásito controversial. Acta Bioquím Clín Latinoam 2010; 44: 371-376.
5. Suresh K, Ng G, Ramachandran N, Ho L, Yap E, Singh M. *In vitro* encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. Parasitol Res 1993; 79: 456-460.
6. Arias J, Guzmán G, Lora-Suares F, Torres E, Gómez J. Prevalencia de protozoos intestinales en 79 niños de 2 a 5 años de edad de un hogar infantil estatal en Circasia, Quindío. Infectio 2010; 14: 31-38.
7. Zapata J, Rojas- Cruz C. Una actualización sobre *Blastocystis sp.* Rev Gastrohnup 2012; 14 (3): 94-100.
8. Pérez de Suárez E, Guzmán de Rondón C. La morfología del *Blastocystis hominis* en las heces y evaluación de métodos parasitológicos. Rev Biomed 1994; 226- 31.
9. Devera R, Angulo V, Amaro E, Finali M, Franceschi G, Blanco, Tedesco R, Requena I, Velásquez V. Parásitos intestinales en habitantes de una comunidad rural del Estado Bolívar, Venezuela. Rev Biomed 2006; 17:259-268.
10. Rondón L, Vargas M. *Blastocystis hominis*: Estudio propectivo, sintomatología y factores epidemiológicos asociados. Rev Gastroenterol 2003; 23: 29-35.
11. Zierdt C. *Blastocystis hominis*-Past and future. Clin Microbiol Rev 1991; 4: 61-79.
12. Doyle P, Helgason M, Mathias G, Proctor E. Epidemiology and pathogenecity of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol 1990; 28: 116-121.
13. Zierdt C, Rude W, Bull B. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. Am J Clin Pathol 1967; 48: 495-501.
14. Silberman J, Sogin M, Leipe D, Clark C. Human parasite finds taxonomic home. Nature 1996; 380-398.
15. Moe K, Singh M, Howe J, Ho L, Tan S, Ng G, Chen X, Yap E. Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. Parasitol Res 1996; 82: 439-444.
16. Cowden J, Hotez P. Guía para el manejo de protozoarios entéricos emergentes. Contemporary Pediatr 2001; 18:40-47.
17. Sánchez L, Barrios E, Sardiña A, Araque W, Delgado V. Infección experimental de aislados de humanos de *Blastocystis sp.* en ratones inmunosuprimidos de dexametaxona. Kasmera 2012; 40: 67-77.

18. Nimri L. Evidence of an epidemic of *Blastocystis hominis* infections in preschool children in northern Jordan. J of Clin Microbiol 1993; 31: 2706-2708.
19. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, Singh M, Wintjens R, Sogin ML, Capron M, Pierce R, Zenner L, Viscogliosi E. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. J Clin Microbiol. 2005; 43: 348-355.
20. Barrios EE, Hernández A, Peña N, Villanueva J, Pinto V, Delgado V, Araque W. *Blastocystis hominis*: patrones de isoenzimas en aislados humanos. Salus 2009 ; 13: 39-42.
21. Barrios E, Delgado V, Bujanda A, Araque W. Surface morphology and characteristics of the hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Planorbidae) from two geographic sources. Rev Latinoam Microbiol 2001; 43:114-118.
22. Spector T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. Analytical Biochemistry 1978; 86: 142-146
23. Devera R, Velázquez VJ, Vasquez M, Aracón B, Jimenez M. *Blastocystis hominis*: criterios de patogenidad. Saber, Universidad de Oriente 2000; 2: 23-28.
24. Zierdt CH, Zierdt WS, Nagy B. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection for serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. J Parasitol 1995; 81:127-129.
25. Mahmoud MS, Saleh WA. Secretory and humoral antibody responses to *Blastocystis hominis* in symptomatic and asymptomatic human infections. J Egypt Soc Parasitol 2003; 33: 13-30.