UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.

FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

"INFLUENCIA DE LAS ENTEROBACTERIAS EN LA PATOGENICIDAD DEL *Blastocystis sp*"

HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA "EVA SÁMANO DE LÓPEZ MATEOS".
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.

TESIS.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO.

PRESENTA.

ARTURO MARTÍNEZ COLÓN.

ASESOR
QFB Guadalupe Eréndira Orozco Mosqueda

CO-ASESORES
Dr. José Luis Martínez Toledo
QBP Guadalupe Bolaños Monroy.

MORELIA, MICHOACÁN, NOVIEMBRE DE 2010.

Dedicatoria.

A mi tía Aiza y primos (Rosy, Dany, Lucy, Jesús y Lupita)

A mis sobrinos Mauricio y Rubí.

A la QFB Ma. Luisa Nava Reyes.

Agradecimientos.

- **A mi Tía Aiza y primos (Rosy, Dany, Lucy, Jesús y Lupita):** A quienes de todo corazón les doy las gracias, por todo el apoyo incondicional que me brindan día a día, por creer en mí en cada momento y sobre todo por ser para mí una madre y hermanos que me guiaron para llegar al camino que siempre soñé, los quiero mucho.

- **A mí querido Mauricio y Rubí:** por todos esos momentos de alegría que me dan y por que los tengo siempre presentes, y que cada vez que me propongo algún proyecto se los dedico a ustedes.

- **A la QFB Ma. Luisa Nava Reyes:** por todas las palabras de ánimo que siempre me brinda, por su confianza, cariño y apoyo que siempre recibo desde que la conocí.

- **A la QFB Guadalupe Eréndira Orozco Mosqueda:** Por todo el empeño y dedicación puestos hacia mí y mi trabajo y por encaminarme hacia la Investigación con su gran sabiduría.

- **A mis amigos:** Por compartir momentos tan importantes, a veces fueron felices, en ocasiones no, pero ustedes siempre estuvieron ahí, para darme ánimos y apoyarme en cada decisión que yo tomará, gracias por todo y los llevaré siempre en mi corazón.

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN **1**
MARCO TEÓRICO **2**
1. HISTORIA DEL *Blastocystis sp*. **2**
2. CARACTERÍSTICAS DEL *Blastocystis sp*. **3**
2.1. TAXONOMÍA **4**
2.2. MORFOLOGÍA **6**
2.3. CICLO DE VIDA **11**
2.4. PATOGENICIDAD **13**
2.5. SÍNTOMAS CLÍNICOS **17**
2.6. DIAGNÓSTICO **18**
2.7. TRATAMIENTO **20**
2.8. PREVENCIÓN **23**
3. ENTEROBACTERIAS **24**
3.1. *Escherichia coli* **25**
3.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *E. coli* PATÓGENA **28**
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA **32**
JUSTIFICACIÓN **33**
OBJETIVOS **36**
HIPÓTESIS **36**
METODOLOGÍA **37**
CRITERIOS DE INCLUSIÓN **37**
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN **37**
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN **37**
MATERIAL Y MÉTODOS **38**
RESULTADOS **39**
DISCUSIÓN **46**
CONCLUSIONES **49**
RECOMENDACIONES **50**
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **51**
ANEXO I. INDICACIONES PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS **62**
ANEXO II. TÉCNICAS COPROPARASITOSCÓPICAS **63**
ANEXO III. COPROCULTIVO **71**

INTRODUCCIÓN.

Blastocystis sp es el parásito intestinal de mayor frecuencia en el humano, se ha determinado que tiene una prevalencia hasta del 60% en países en desarrollo [(1)]. Es causante de la blastocistosis, una enfermedad gastrointestinal inespecífica y por lo tanto difícil de erradicar.

Es un parásito cuya patogenicidad continúa en controversia, esto debido a que no se conocen exactamente los mecanismos de virulencia, mecanismos de transmisión, ni su papel como patógeno primario, estas características sobre el mismo, inducen controversia y por lo tanto han motivado investigaciones que traten de despejar las dudas existentes sobre este parásito [(2)].

Algunos autores sugieren que la simbiosis del *Blastocystis sp* con alguna enterobacteria le confiere la patogenicidad, pero aún, se desconoce el verdadero papel que tienen las enterobacterias en ella.

Su transmisión es probablemente vía fecal-oral. Aunque existen insuficientes reportes de casos clínicos, estudios epidemiológicos prospectivos y controlados. Esta carencia de información, ha dificultado determinar con claridad si *Blastocystis sp* es un patógeno primario [(2)].

Otros factores que han imposibilitado un análisis crítico de su patogenicidad incluyen: la naturaleza autolimitada de la infección, la respuesta errática al tratamiento específico, y la indagación incompleta de otros patógenos o causas alternativas de los síntomas [(3)], tales como: virus, bacterias u otros parásitos.

La manifestación o la ausencia de síntomas clínicos dependen de la interacción entre el huésped y el parásito. Aunque se asumía que *Blastocystis sp* era comensal, se ha propuesto que se puede convertir en patógeno de igual manera tanto para individuos inmunocompetentes como aquellos inmunocomprometidos [(4)].

MARCO TEÓRICO.

1. HISTORIA DEL *Blastocystis sp*:

La historia de *Blastocystis sp* ha sido controversial en cuanto a su clasificación taxonómica y a su definición como agente causal de diarrea.

La primera descripción del parasito fue realizada por Brittan [5] y Swayne [6] durante una epidemia de cólera en Londres en 1849; denominándolo "cuerpos del cólera" o "células anulares" y atribuyéndole la responsabilidad de esta. Sin embargo, esta información no es suficiente para atribuirles el descubrimiento del parásito [7].

En 1904 Prowazek, consideró a *Blastocystis sp* como una forma quística de un flagelado [4].

Cumpliendo criterios de nomenclatura, la primera descripción fue hecha por Alexeieff en 1911 llamándolo "*Blastocystis enterocola*", una levadura, aplicando la misma nomenclatura para designar organismos observados en heces de roedores, serpientes, pulgas y cucarachas [8]. En 1912, Brumpt [9] estudiando solo material humano presentó una breve descripción del germen al que llamó "*Blastocystis hominis*", considerándolo como una levadura intestinal inocua, importante por su posibilidad de ser confundida con *Entamoeba histolytica*.

En 1917 Alexeieff lo consideró un vegetal y la relacionó con *Blastomyces sp.* En 1924 Knowles y cols. colocaron a *Blastocystis sp* en el género *Saccharomyces,* en 1938 Ciferri y cols. lo consideraron dentro del género *Prototheca* (algas no pigmentadas) [4].

En 1967, Zierdt y cols. [10] renovaron el interés por el parásito, proporcionando evidencia para clasificarlo como un Protozoario (sub clasificación del reino Protista que incluye a la mayoría de parásitos humanos, amebas, flagelados, ciliados entre otros). Posteriormente ha tenido múltiples reclasificaciones dentro del subreino de los protozoarios [11].

En 1996 Silberman y cols. [12] utilizando secuencias del ARN ribosómico de *Blastocystis* lo ubican dentro del reino Cromista o Stramenopila un grupo de diversos organismos que incluye las algas marrones y diatomeas.

En un consenso publicado en 2007 se uniformiza la información de los subtipos descritos previamente concluyéndose la existencia de 9 subtipos y proponiéndose la eliminación del término "*Blastocystis hominis*" dando paso a utilizarse el término *Blastocystis sp*. Seguido de un subtipo del 1 al 9 en toda muestra aislada de aves y mamíferos [13]. Aunque algunos autores hacen referencia al Subtipo 10 (Stensvold et, al. 2009) [14].

Dicho cambio en la nomenclatura obedece a la baja especificidad del germen por su hospedero lo que hace inadecuada la nomenclatura relacionada a un sólo hospedero (en este caso el hombre: hominis) y en vista de la creciente evidencia a favor de la probable existencia de dos o más especies de *Blastocystis* [15].

2.- CARACTERÍSTICAS DEL *Blastocystis sp.*

Blastocystis sp es un microorganismo unicelular, eucariota, anaerobio estricto, perteneciente al reino Cromista y es frecuentemente hallado en el tracto gastrointestinal humano y animales [16].

Se distingue uno o más núcleos en este parásito, membrana plasmática y nuclear, carece de pared celular; contiene mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso. Su reproducción usualmente por fisión binaria aunque también lo hace por plasmotomía, endodiogenia y esquizogonia [17].

Crece en cultivo bajo condiciones anaeróbicas. Se cree que las variantes morfológicas (forma vacuolar, granular, ameboide multivacuolar, avacuolar y quística) dependen del medio ambiente (cambios osmóticos, drogas y estatus metabólico) [17].

2.1. TAXONOMÍA.

El estudio ultraestructural de Zierdt y cols. evidencia por primera vez que el organismo no era una levadura o un hongo, como previamente fue sugerido por Alexeieff y Brumpt, ni tampoco los quistes de otro organismo como *Trichomonas sp* como fue propuesto por Bensen, Bone y Prowaseck , Haughwout y James [10].

La siguiente tabla muestra la comparación que hace Zierdt, con el fin de distinguir al *Blastocystis sp* de una levadura común:

Blastocystis sp	**Levadura Común.**
No presenta pared celular, rodeado por una membrana delgada.	Presenta pared celular.
Crece ¨*in vitro*¨ sólo en cultivo mixto con bacterias.	Crece ¨*in vitro*¨ en ausencia de bacterias.
No crece en medios específicos para hongos.	Crece en medios convencionales para hongos.
Tiene afinidad por el pH neutro o ligeramente alcalino.	Prefiere pH ácido y es muy resistente a pH bajo.
Su reproducción es por fisión binaria y esporulación o ambas.	Se reproduce por gemación y esporulación o ambas.
Ingiere bacterias y otros materiales particulados.	No ingiere materiales particulados.
No hay evidencia de formación de micelios o de gemación ¨ *in vivo* ¨ e ¨ in vitro ¨.	Forma brotes ¨ in vivo ¨ y produce micelio ¨ *in vitro* ¨.
Muere a 4ºC en medio ligeramente hipotónico e hipertónico.	Resiste la temperatura de 4ºC y los medios ligeramente hipotónicos e hipertónicos.
Presenta extensión y retracción de pseudópodos.	No forma pseudópodos.
Temperatura óptima de crecimiento, 37ºC. No crece a temperatura ambiente	Temperatura óptima de crecimiento menor a 37ºC. Crece bien a temperatura ambiente

Boreham y Stenzel (1993), exhortan en la necesidad de ahondar en los estudios moleculares, y así evitar clasificaciones basadas únicamente en caracteres morfológicos [18].

Los primeros análisis moleculares que trataron de esclarecer la filogenia de *Blastocystis sp*, se deben a Johnson *et al*. (1989) quienes tras analizar parte de la secuencia del ARN de la subunidad menor ribosomal (ssARNr), y no encontrar relaciones monofiléticas con ningún eucariota, sugieren que debe ser considerado como una especie que no se puede ubicar exactamente en un taxón, opinión compartida por otros autores (Hollebeke y Mayberry, 1994). Nakamura *et al.* (1996), mediante el análisis de la secuencia aminoacídica del factor de elongación-1α (EF-1α), un gen altamente conservado y aplicado como marcador filogenético, confirman que *no se trata de un hongo* [19].

Silberman *et al.* (1996), al concluir la secuenciación génica de la ssARNr, demuestran que este organismo puede ser incluido entre los Stramenopiles aunque como un miembro inusual, ya que posee mitocondrias tratándose de un anaerobio estricto, y carece de flagelos, que se piensa pudo perder secundariamente, este grupo, incluye "protistas unicelulares y multicelulares de metabolismo heterótrofo o fotosintético" [12].

De acuerdo a la clasificación en seis reinos realizada por Cavalier-Smith en 1998 (citada por Tan *et al*., 2002) *Blastocystis* es agrupado en la siguiente descripción taxonómica [20]:

Reino:	Cromista.
Subreino:	Chromobiota.
Infrareino:	Heterokonta o Stramenopiles
Subphylum:	Opalinata
Clase:	Blastocystea
Género:	*Blastocystis.*

De los 10 subtipos que presenta *Blastocystis sp*; los humanos pueden ser hospederos de varios de éstos. Se localizan en animales como aves, primates y cerdos (subtipo 1), primates y cerdos (subtipo 2), roedores (subtipo 4), ganado y cerdo (subtipo 5) y aves (subtipo 6 y 7) [13].

El subtipo 3 es el genotipo más aislado en estudios epidemiológicos y probablemente es el único genotipo de origen humano [21]. Por análisis filogenético, los subtipos 8 y 9 son más similares a los subtipos 4 y 6 [22].

En un estudio de clasificación genotípica basado en reacción en cadena de polimerasa aplicada a *Blastocystis sp* aislado en 5 poblaciones humanas obtenidas en Japón, Pakistán, Bangladesh, Alemania y Tailandia se obtuvo que el subtipo 3 fue el más frecuente, variando entre 41,7% a 92,3% de los grupos analizados. Los siguientes subgrupos en frecuencia fueron subtipo 1, subtipo 4. Los subtipos 2, 5 y 7 fueron raramente hallados [23].

2.2 MORFOLOGÍA.

Los reportes de la morfología de *Blastocystis sp* han distinguido tres formas primordiales: ***vacuolar***, ***granular*** *y* ***ameboide***. Un gran número de reportes de *Blastocystis sp* en materia fecal y de biopsias del intestino del huésped han indicado que existen formas adicionales como la forma de ***quiste***, ***multivacuolar*** y la ***avacuolar***; en muestras procedentes de medios de cultivo se han reconocido además las formas de esquizonte y trofozoíto (multivacuolar) [24].

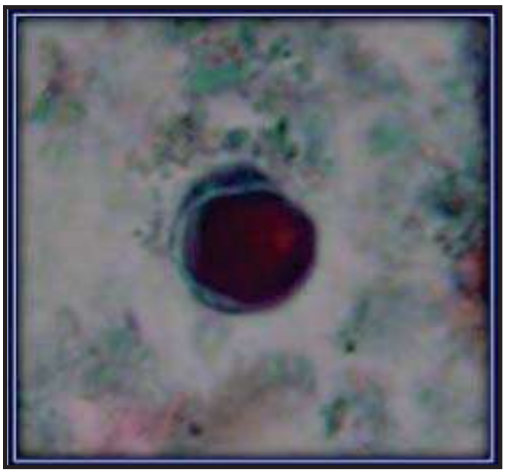
Estudios ultraestructurales recientes indican que existen una serie de variantes morfológicas de *Blastocystis*, en las que al parecer la forma de presentación depende del medio ambiente [25].

Factores físicos como cambios osmóticos, la presencia de ciertas drogas, y el estatus metabólico pueden influenciar la morfología del organismo in vivo e in vitro [26].

Forma Vacuolar.

Se ha demostrado que es la forma o morfotipo más predominante reportado en las heces, se caracteriza por tener una gran vacuola central que comprime el citoplasma (donde se encuentran los organelos como aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y ribosomas) y el núcleo hacia la periferia celular, esta vacuola es redonda u oval y mide de 10 a 30 µm [(27)].

También es conocida como cuerpo central vacuolado, la vacuola central parece tener una función de reserva y contiene material granular o floculante de densidad variable. Se han observado porciones de citoplasma invaginadas en la vacuola central, con material diverso y organelos que parecen mitocondrias dentro de estructuras rodeados de membrana [(28)].



Formas Vacuolares con Tinción Tricrómica
(Imagen cortesía de QFB Zahair León Balbanera. HIM)

Forma Granular.

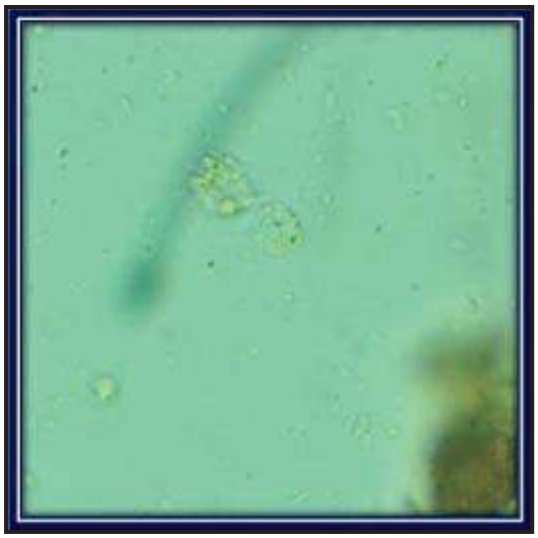
Posee una ultraestructura similar a la forma vacuolar, pero con variantes morfológicas y citoquímicas, las cuales están contenidas en la vacuola central. No parece ser un tipo celular diferente sino más bien una forma vacuolar con gránulos en

la vacuola central. Posee una gran cantidad de mitocondrias, lo que le confiere un aspecto granular [29].

Su diámetro oscila entre 3 y 80 µm con un rango medio de 15 a 25 µm. Existen diferentes tipos de gránulos en la forma vacuolar y granular, que pueden contener gránulos de diferentes tipos y composiciones, como son:

- Gránulos metabólicos situados en el citoplasma.
- Gránulos lipídicos localizados en la vacuola central.
- Gránulos reproductivos encontrados en la vacuola central.

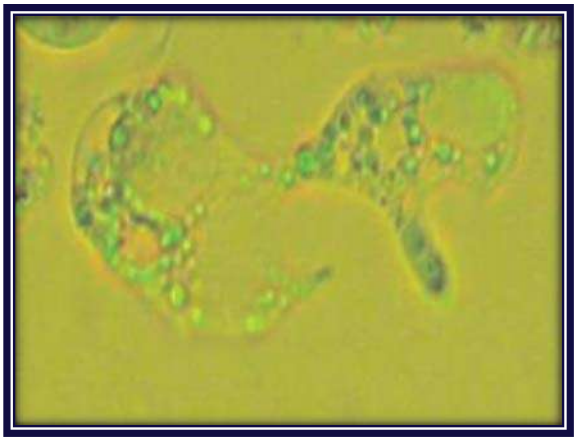
Sólo en la forma granular además de estos gránulos también se encuentra mielina en pequeñas vesículas denominadas gránulos cristalinos. Se ha propuesto que la vacuola central que contienen las formas vacuolares y granulares desempeña el papel de desarrollo y diferenciación morfológica en los gránulos reproductivos de las mismas formas, esto es que aquí se lleva a cabo la endodiogenia y la esquizogonia [30].



Forma Granular. HIM.

Forma Ameboide.

El estadio ameboide es observado más frecuentemente en cultivos viejos o luego de la administración de antibióticos. Mide de 3 a 8µm de diámetro con un contorno irregular, con 1 ó 3 núcleos y generalmente con estructuras semejante a pseudópodos, presenta gránulos refringentes que hasta la fecha no se sabe su función; puede fagocitar bacterias, estas se encuentran dentro del citoplasma y se sugiere que estas son las que dan o promueven el cambio a quiste [31].



Forma Ameboide. HIM.

Formas Multivacuolar.

Esta forma presenta múltiples vacuolas de diferentes tamaños halladas en materia fecal. Miden aproximadamente de 5 a 8 µm de diámetro siendo más pequeñas que las formas vacuolares y granulares; hasta la fecha no se ha determinado bien qué función tienen las vacuolas que se encuentran interconectadas o si están formando un nuevo complejo [32].

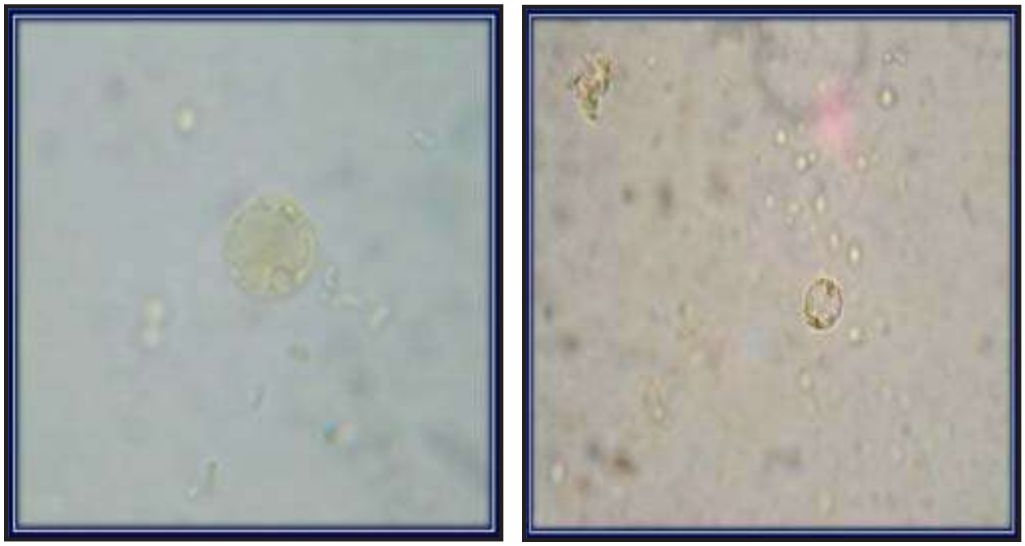
Contiene habitualmente 1 ó 2 núcleos, también presenta una banda densa en el extremo del núcleo; capa gruesa que rodea a todas las formas multivacuolares, se encuentra la presencia de bacterias. Estas bacterias están muy a menudo asociadas a

la superficie de *Blastocystis sp*, pero no se ha visto que haya un proceso de fagocitosis, se ha sugerido que estas bacterias junto con los cambios en el ambiente promueven el cambio de formas [32].

Forma Multivacuolar. HIM.

- **Forma Avacuolar.**

Esta forma mide aproximadamente 5µm de diámetro no contienen vacuola central, contiene de 1a 2 núcleos, presentan mitocondrias e inclusiones que están en el interior de la matriz citoplasmática [33].



Formas Avacuolares o anulares.HIM.

- **Forma Quística.**

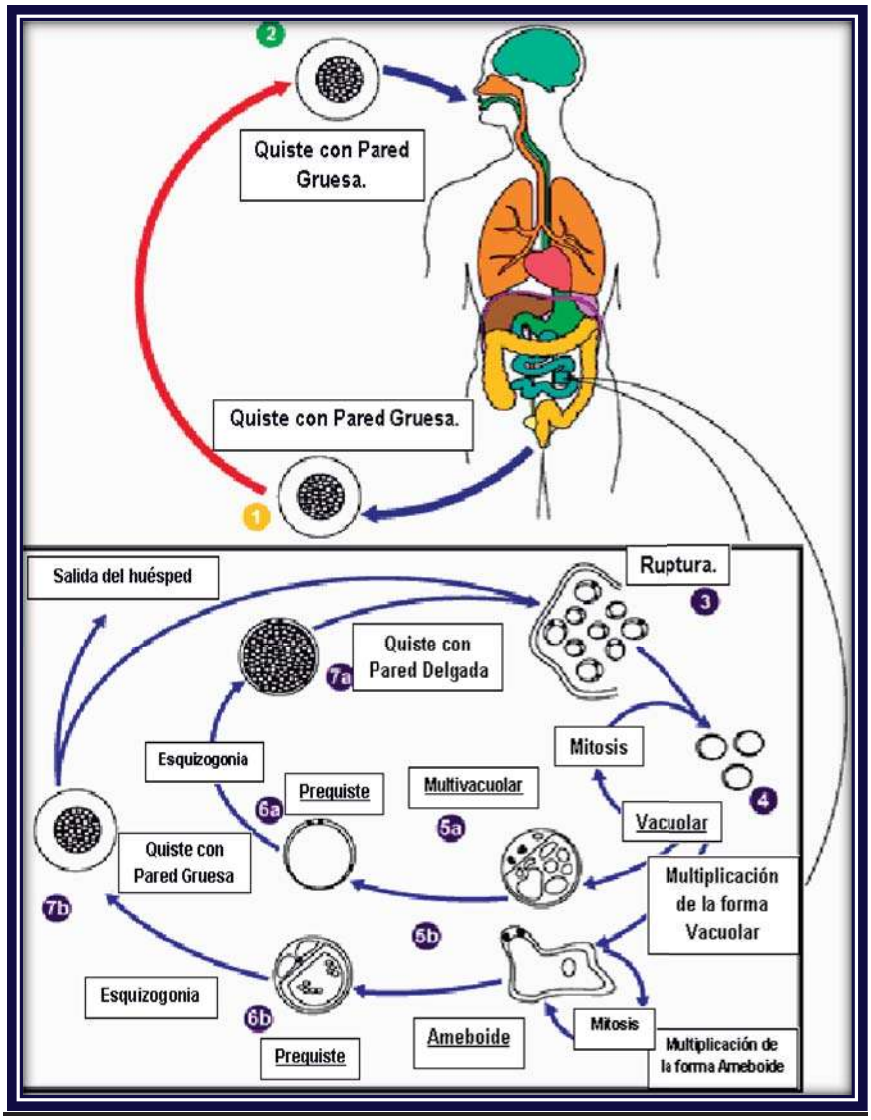
Los quistes son esféricos u ovoides, de tamaño pequeño (3 a 5 µm,) tienen una pared quística multilaminada y raramente aparecen en cultivos axénicos. El contenido celular interno incluye de uno a cuatro núcleos, múltiples vacuolas y depósitos lipídicos y glucogénicos.

La forma quística de *Blastocystis* probablemente confiera resistencia al medio externo como es el caso de varios protozoarios, aunque no ha sido confirmado experimentalmente [34].

Forma quística HIM.

2.3. CICLO DE VIDA.

El ciclo de vida del *Blastocystis sp,* así como su transmisión son desconocidos aún, y están bajo investigación, sin embargo, se han propuesto ciclos de vida para este parásito. La forma clásica encontrada en la materia fecal humana es el quiste, que varía enormemente en tamaño (6 a 40 µm)[1]. El **quiste con pared gruesa** presente en la materia fecal, se cree que es el responsable de la trasmisión a otras fuentes, posiblemente por la ruta fecal-oral, a través de la ingestión de agua o alimentos contaminados[2].



Tomado de:www.dpd.cdc.gov/dpdx

El quiste infecta células epiteliales del tracto digestivo y se multiplica de forma asexual (3, 4). Las formas **vacuolares**, dan origen a las formas **multivacuolares** 5a y forma **ameboide** 5b. La forma **multivacuolar** se desarrolla dentro del **prequiste** 6a para dar origen al **quiste con pared delgada** 7a, que se cree puede ser responsable de autoinfección. La forma **ameboide** da origen a los prequistes 6b, que se desarrollan dentro del quiste con pared gruesa por esquizogonia 7b. El **quiste con pared gruesa** es excretado en las heces 1 [35].

2.4 PATOGENICIDAD.

La patogenicidad de este parásito es debatida por múltiples razones, esta controversia radica en determinar si *Blastocystis sp* es un parásito comensal o un verdadero patógeno y por tanto causante de daño intestinal. La importancia de determinar su patogenicidad radica en que es reportado como el parásito de mayor prevalencia, tanto en muestras de heces de individuos sintomáticos como asintomáticos [36].

ROL PATÓGENO:

Múltiples estudios de experimentación tanto en cultivos celulares y en modelos animales, han revelado que el *Blastocystis sp* presenta un **rol patógeno** [37]. Algunos estudios de endoscopía o biopsias sugieren que la blastocistosis se agrava por algunos factores tales como:

- Alta presencia de formas de *Blastocystis sp*.
- Estado inmunológico del paciente (inmunocompetente o inmunocomprometido).
- Microorganismos pertenecientes a la flora intestinal o patógenos, asociados al *Blastocystis sp*.
- Algunos subtipos son más patógenos que otros.
- Edad del individuo que presenta el parásito [38].

a) Número de Parásitos:

Existen varios estudios que afirman que el *Blastocystis sp*, es patógeno cuando se demuestra la inexistencia de cualquier patógeno como bacterias, virus o parásitos, y aparece un número elevado de *Blastocystis sp* en la materia fecal, es decir, más de 5 parásitos por campo microscópico (5 / 40x)[39].

Sin embargo, diversos estudios no encuentran correlación entre el número de *Blastocystis sp* en heces y la aparición de enfermedad [40].

Asimismo, otros autores consideran a *Blastocystis* como un patógeno potencial, independientemente del recuento y del hospedador [41].

b) Estado inmunológico del paciente:

La infección por *Blastocystis sp* suele ser muy común en pacientes inmunocomprometidos y un estudio de diarrea crónica en niños demostró que solo aquellos con infección por virus de la inmunodeficiencia humana fueron infectados [40]. Sin embargo mayor información es necesaria respecto a la prevalencia y significancia de la infección por *Blastocystis* en pacientes inmunocomprometidos incluyendo aquellos infectados por VIH [42].

En individuos inmunocompetentes la infección se transcribe principalmente a un síndrome diarreico, el cual algunas veces se cura espontáneamente. En la mayoría de los individuos inmunocomprometidos la infección se presenta como diarrea crónica, grave compromiso del estado general y la eliminación de un número alto de *Blastocystis sp* en heces [43].

c) Asociación de Blastocystis sp con otros microorganismos:

Este parásito es frecuentemente asociado a otros patógenos infecciosos; algunos reportes han propuesto que más del 50% de individuos con *Blastocystis sp*, en heces tienen una etiología alternativa encontrada en las siguientes valoraciones, esto se determinó basándose en la frecuente asociación de *Blastocystis* con otros microorganismos [44]:

- Algunos investigadores creen que el hallazgo de *Blastocystis sp* se aprovecharía como un marcador para otros patógenos no identificados; por ejemplo, un estudio examinó hasta 6 muestras en 32 pacientes con exámenes de heces positivo para *Blastocystis sp* en los que se encontró otro patógeno de origen bacteriano en 27(84%). Cuando se estableció tratamiento para el patógeno diferente, los síntomas se resolvieron a pesar de la persistencia de *Blastocystis* en los posteriores análisis de heces [(45)].

- Sin embargo otro estudio de pacientes con diarrea en Nepal mostró que *Blastocystis sp* no fue un marcador de otros patógenos entéricos como las bacterias, los que fueron hallados en 68 y 71 por ciento de pacientes con *Blastocystis* y sin este, respectivamente [(46)].

Una posible explicación de la asociación de *Blastocystis* y otros patógenos consistiría en la más fácil identificación del parásito en deposiciones líquidas no formadas (probablemente ocasionadas por el patógeno acompañante) [(47)]. A su vez, un incremento en la flora bacteriana durante el episodio diarreico induciría el crecimiento de *Blastocystis sp* [(42)].

Diferentes estudios sospechan que *Blastocystis sp* podría tener una débil patogenicidad que contribuiría a la enfermedad, esto al detectarse niveles bajos de *Escherichia coli* y *Lactobacillus*, un pH fecal elevado y sobrecrecimiento de *Candida*, en casos crónicos de blastocistosis [(48)].

FACTORES DE VIRULENCIA.

Estudios "*in vitro*", demuestran que entre los factores de virulencia de *Blastocystis sp,* se encuentran las proteasas de cisteína, éstas se localizan en la vacuola central del parásito [(49)].

Las proteasas de cisteína están involucradas en procesos tales como: la invasión a la célula hospedera, evasión inmune, patogenicidad y virulencia [50].

En cuanto a la evasión de la respuesta inmune, las proteasas de cisteína se encargan de degradar a las inmunoglobulinas, principalmente a la IgA (encargada de defender la superficie de la mucosa intestinal), IgG y las anafilotoxinas C3a y C5a [51].

La degradación de IgA, y el daño a la mucosa intestinal, puede propiciar el crecimiento e invasión de patógenos vecinos [51].

EFECTOS CITOPÁTICOS EN LA CÉLULA HOSPEDERA.

Usando líneas celulares como la HT 29, las cuales son células del epitelio intestinal humano, que tienen por objetivo producir la secreción de componentes de IgA, y la línea T 84; no se observaron efectos citopáticos cuando se expusieron a *Blastocystis sp*. A las 6 horas de incubación se demostró que el *Blastocystis sp* no induce la producción de IL8, sin embargo, a las 24 horas de incubación, estas colonias de células epiteliales con *Blastocystis sp* inducen la producción de citocinas proinflamatorias como la IL8 y el factor estimulante para granulocitos y macrófagos [52].

Long y colaboradores, sugieren que *Blastocystis sp,* es capaz de modular la respuesta inmune del hospedero, y en un estado inicial de infección, este parásito puede regular la respuesta inmune del hospedero, para mejorar su supervivencia. Tal como ha sido demostrado en *Toxoplasma gondii* y *Cryptosporidium parvum* [53].

Estudios recientes han demostrado en *Blastocystis ratti* (subtipo 9), que la producción de proteasas de cisteína inducen la secreción de IL8 y de manera dependiente participa el NF-κβ [54].

2.5. SÍNTOMAS CLÍNICOS.

Los síntomas referidos a la infección gastrointestinal por *Blastocystis sp* en humanos son generalmente poco específicos e incluyen diarrea, dolor abdominal, nauseas y flatulencias, usualmente sin fiebre [55].

La enfermedad puede ser aguda o crónica pudiendo persistir la sintomatología por varios años. Diarrea líquida abundante ha sido reportada en algunos casos agudos [56].

Otras manifestaciones asociadas a la infección gastrointestinal por *Blastocystis sp* incluyen hemorragia rectal, leucocitos en heces, eosinofilia, hepatomegalia, esplenomegalia, rash cutáneo, angioedema y prurito [57].

Algunos reportes sugieren una correlación entre *Blastocystis* y el Síndrome de Intestino Irritable, aunque esta sugerencia no ha sido probada [58].

- **Infecciones Asintomáticas:**

La gran cantidad de controles asintomáticos que son positivos para *Blastocystis sp*, sugiere que el estadío de portador existe. Sin embargo esto no necesariamente descarta su potencial rol patógeno [59].

Otros protozoarios, incluyendo *Giardia*, son encontrados con frecuencia en pacientes asintomáticos pero son considerados patógenos cuando se asocian a síntomas clínicos. La misma potencialidad podría existir para *Blastocystis sp*. Es posible que individuos con inmunidad previa sean más propensos a una infección asintomática [60].

Otras causas sugieren que su efecto patológico dependería de factores del hospedero tales como alteración de la inmunidad o disturbios de la función gastrointestinal de otras causas .Se han descritos síntomas en pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos incluyendo pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y pacientes trasplantados [61].

Aunque hay reportes de casos de mayor patogenicidad en pacientes inmunosuprimidos, como aquellos con VIH y pacientes transplantados, no se ha observado una mayor severidad en los síntomas y actualmente el organismo *no es considerado como un patógeno oportunista* [62].

2.6. DIAGNÓSTICO.

Para el diagnóstico diferencial de *Blastocystis sp s*e pueden realizar múltiples técnicas, desde las habituales como la observación por microscopia (siendo sencillas, de bajo costo y fácil de realizar), tinciones, cultivo axénico, determinación de IgG, hasta aquellas menos utilizadas como el aspirado duodenal, endoscopía y biopsias.

- ✓ **Diagnóstico Microscópico:**

Para determinar la presencia de *Blastocystis sp* por este método *s*e puede realizar el *examen directo en fresco* que consiste en el estudio microscópico de las heces frescas en solución salina, yodo-lugol o azul de metileno, identificando las múltiples formas que presenta este parásito. La fase vacuolar puede estar presente hasta en el 97% de los casos en las heces, constituyendo la principal fase diagnóstica [63].

Los métodos de concentración por flotación o sedimentación, como el Faust o el Ritchie, también pueden utilizarse para diagnosticar al parásito, varios laboratorios han incorporando éstas técnicas mostrando una mayor sensibilidad para el diagnóstico de *Blastocystis sp* [64].

Cuando se tiene experiencia en la identificación de *Blastocystis sp,* se puede hacer el diagnóstico en muestras de materia fecal frescas, y se pueden confirmar con tinciones permanentes, como Tricrómico de Gomori y Nigrosina [65].

- ✓ **Cultivos para *Blastocystis sp*:**

A diferencia de las bacterias, el cultivo de protozoos intestinales es difícil, caro y complicado de mantener en un laboratorio de diagnóstico. Se ha visto que para cultivar *Blastocystis sp*, los medios axénicos o monoxénicos más favorables son el Jones, Boeck y el Drbohlav [66].

Los cultivos xénicos se definen como aquellos en los que el parásito crece en presencia de bacterias u otras células, para aprovechar la actividad metabólica de éstas y poder utilizar eficazmente los componentes incluidos en el medio de cultivo, a diferencia de los axénicos que no incluyen actividad metabólica adicional alguna, ya que no incorporan ni células procariotas ni eucariotas [67].

Recientemente se ha descrito un medio en agar sólido que aumenta la eficacia del crecimiento clonal de *Blastocystis sp.* Las colonias se exponen en la superficie del agar, lo cual facilita el recuento y la manipulación. Son colonias coloreadas que crecen a los 7 días post-inoculación, alcanzando un diámetro de 2 mm de diámetro. En medio sólido las colonias se muestran viables catorce días, por lo que los subcultivos se realizan cada dos semanas. Los clones se expanden en medio de cultivo líquido [68].

Blastocystis sp se caracteriza porque no puede ser axenizado directamente, primero se ha de establecer el cultivo con flora bacteriana compleja y no definida. La axenización de *Blastocystis sp* se ha conseguido con la adición de antibióticos, ya que la fragilidad de la célula impide el empleo de métodos físicos tales como la centrifugación o la filtración [69].

- ✓ **Técnicas Inmunológicas:**

Exámenes recientemente desarrollados para el diagnóstico de infección por *Blastocystis sp* son la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos séricos y la reacción en cadena de polimerasa (PCR), pero actualmente son sólo usadas en investigación [(70)].

2.7. TRATAMIENTO.

Algunos autores sugieren que el hallazgo de *Blastocystis sp* en pacientes asintomáticos no requiere tratamiento; mientras que en los pacientes sintomáticos debe efectuarse un examen de heces mediante concentración en búsqueda de otros agentes potencialmente patógenos y deben descartarse causas no infecciosas de la sintomatología [(71)].

Al no reconocer otro patógeno o etiología para la sintomatología sería prudente administrar tratamiento en búsqueda de una respuesta clínica, la cual podría deberse a la supresión de *Blastocystis sp* o a la eliminación de algún otro patógeno no descubierto; sin embargo; la infección por *Blastocystis* es con frecuencia autolimitada, haciendo difícil la evaluación de la eficacia terapéutica [(72)].

Estudios in vitro han mostrado buena sensibilidad del organismo a emetina, metronidazol, furazolidona, trimetroprim- Sulfametoxazol (TMP-SMX), quinacrina y pentamidina [(73)].

Iodoquinol es inhibitorio in vitro y furoato de diloxanida sería inactivo. Los antimicrobianos que han sido usados en la práctica clínica incluyen metronidazol, tinidazol, iodoquinol, TMP-SMX y furazolidona [(74)].

- **Metronidazol:**

Es uno de los 5-nitroimidazoles más utilizados en el tratamiento contra *Blastocystis sp*, tiene una toxicidad selectiva para los organismos anaerobios o microaerófilos y para las células anóxicas o hipóxicas, pero se ha observado cierta ineficacia en algunos individuos [(75)]. La mayoría de los 5-nitroimidazoles (metronidazol, tinidazol, ornidazol, cardinazol) requieren varios días de tratamiento y presentan efectos secundarios estomacales, lo cual conduce al incumplimiento del tratamiento por parte del paciente [(76)].

Este agente generalmente es recomendado en dosis de 250 mg hasta 750 mg tres veces al día de 5 a 10 días [(77)]. Aunque se ha observado que la forma quística de *Blastocystis sp*, en algunos casos es resistente al efecto citotóxico de esta droga [(78)].

- **Secnidazol:**

Su larga vida media asegura concentraciones séricas eficaces durante al menos 72 horas, lo cual permite la administración en una sola dosis para los pacientes infectados. Experimentos realizados en ratas naturalmente infectadas con *Blastocystis sp* y tratadas con 225 mg de secnidazol por Kg de peso, permitieron demostrar la eliminación del parásito en las heces en un 92% y a partir de 150 mg/Kg de peso, disminuyó significativamente el número de *Blastocystis* observados en las muestras recolectadas [(79)].

- **Trimetroprim-Sulfametoxazol:**

La eficacia de TMP-SMX (6 mg/kg TMP (máximo 320 mg) y 30 mg/kg SMX (máximo 1600 mg) por día) se recomienda administrarse por 7 días. Este medicamento afecta directamente a *Blastocystis sp* o a la flora bacteriana necesaria para su crecimiento [(80)].

- **Nitazoxanida:**

Este 5-nitrotiazol considerado como antiparasitario de amplio espectro ha sido utilizado como un tratamiento efectivo contra *Blastocystis sp*, debe ser administrada dos veces al día por un intervalo de tres días en las siguientes dosis: 500 mg para pacientes de 12 años o mayores, 200 mg para pacientes entre los 4 y 11 años y 100 mg para pacientes entre 1 y 3 años [81].

- **Paramomicina:**

Antibióticos de amplio espectro como la paramomicina, que han sido utilizados en casos de diarrea crónica a causa de amebiasis intestinal, muestran también éxito contra el tratamiento de infecciones por *Blastocystis sp*, principalmente cuando estas infecciones se ven asociadas a problemas de lesiones cutáneas como la urticaria [82].

La dosis recomendada es de 25 mg/kg de peso, por un periodo de 10 días, los efectos secundarios que muestra son náusea, cólicos abdominales y diarrea. También se ha observado que combinado con el metronidazol, es una opción favorable, para erradicar el *Blastocystis sp* [83].

Algunos autores sugieren que el tratamiento de la blastocistosis requiere de la disponibilidad de una droga eficaz y bien tolerada, con el fin de eliminar el riesgo de efectos secundarios y el consiguiente abandono del mismo por parte de los pacientes [84].

2.8. PREVENCIÓN.

Al suponerse que el mecanismo de transmisión de *Blastocystis sp* es por la vía fecal-oral, ingestión de agua y bebidas o alimentos contaminados con materia fecal, la prevención estará dirigida a una adecuada eliminación de excretas así como la observación de las medidas higiénicas tanto individuales como de las comunidades [85]:

- ✓ Lavarse las manos con jabón después de ir al baño y antes de manipular los alimentos.

- ✓ Evitar tomar agua o alimentos de dudosa higiene.

- ✓ Al viajar a otros países, asegurarse de consumir alimentos bien cocinados y agua hervida o embotellada [86].

Es verdaderamente importante continuar insistiendo en educar a la población en la práctica permanente de las medidas de control de las infecciones de transmisión fecal - oral o por alimentos o agua contaminadas. Estas medidas han sido bien definidas por la OPS/OMS [87].

3.- ENTEROBACTERIAS.

La familia *Enterobacteriaceae* es considerado el grupo de mayor importancia clínica de bacilos Gram-negativos. Se han detallado 40 géneros con más de 150 especies (de los cuales, menos de 20 especies son las responsables de más del 95% de las infecciones por éstas bacterias). En base a sus propiedades bioquímicas, estructura antigénica e hibridación y secuenciación de los ácidos nucleicos se han clasificado éstos géneros [(88)].

Son microorganismos cosmopolitas, se pueden encontrar en el suelo, agua, vegetación y también en la flora intestinal normal de muchos animales, incluida la del hombre, de ahí el nombre de enterobacteria (enteron, intestino) [(89)].

Incluye bacterias que causan infecciones gastrointestinales, por lo tanto, se les denomina como microorganismos entéricos (sin importar si causan o no infección intestinal). Las bacterias que afectan el tracto gastrointestinal incluyen a ciertas cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Shigella sp* y a *Yersinia sp* [(90)].

Se ha descrito que en algunas ocasiones bacterias que se encuentran como flora normal o de manera comensal, dependiendo del estado inmunológico del huésped, pueden ocasionar infecciones oportunistas, éstas son: *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*. Y en el caso de *Escherichia coli* asociada a gastroenteritis, se ha observado que se vuelve patógena cuando adquiere genes de otras bacterias, con factores de virulencia presentes en plásmidos, bacteriófagos o islas de patogenicidad [(90)].

Las infecciones causadas por este grupo bacteriano se pueden originar de múltiples formas, por ejemplo: *Salmonella, Yersinia* de un reservorio animal, de un portador humano *Shigella y S. typhi* o *E. coli* de la diseminación endógena de los microorganismos en un paciente vulnerable; y éstos pueden afectar a todas las zonas corporales [(88)].

Todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae exhiben las siguientes características:

- Bacilos Gram-negativos.
- No forman esporas.
- Móviles por flagelos perítricos o no móviles.
- Aerobios o anaerobios.
- Fermentan la Glucosa.
- Catalasa (+).
- Oxidasa (-).
- Reducen nitratos a nitritos.

3.1 ***Escherichia coli.***

Es un bacilo Gram-negativo, móvil, facultativo, oxidasa negativo, reductor de nitratos, no esporulado, fermenta la glucosa con producción de ácido y gas y presenta 3 antígenos:

- Antígeno O: somático. Se han identificado 176 antígenos somáticos y es el responsable del serogrupo.
- Antígeno H: flagelar. Cuenta con 112 y es el responsable del serotipo.
- Antígeno K: capsular, se han determinado 60 y también determina el serotipo [(91)].

Forma parte de la flora normal del intestino del hombre y los animales de sangre caliente, constituyendo una de las especies bacterianas más abundantes en esta localización [(92)].

La *E. coli* productora de diarrea es aquella con características de virulencia que le permite lesionar las células intestinales o alterar la función del intestino [(93)].

En la actualidad existen 6 serogrupos principales de *E. coli* que ocasionan diarreas:

- ***E. coli* Enterotoxigénica (ETEC):** es la causa más común de diarrea en el viajero, coloniza el intestino delgado, posee fimbrias que le permiten adherirse fuertemente y suministrar la toxina al epitelio. Produce 2 toxinas, una termolábil (LT) y otra termoestable (ST), o ambas a la vez, actúan al desencadenar el sistema adenilciclasa y aumentar la secreción de agua y electrólitos [(94)].

Es de vital importancia detectarla en niños lactantes menores de 2 años ya que puede tornar a una infección grave, su frecuencia va del 10 al 30% en niños que presentan diarrea, su periodo de incubación va de 14 a 50 horas y se transmite por contaminación fecal de agua y alimentos [(95)].

- ***E. coli* Enteropatógena (EPEC):** infectan principalmente a los niños menores de 2 años en los países en vías de desarrollo. Produce un cuadro de diarrea acuosa que según su intensidad puede acompañarse de desequilibrio hidromineral o ácido-básico, vómito y fiebre. Con frecuencia el episodio de diarrea aguda se prolonga o evoluciona a diarrea persistente [(96)].

La adherencia que presentan sus fimbrias a las membranas de las células del epitelio intestinal y su posterior destrucción de las microvellosidades es su principal mecanismo de patogenicidad. Puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea y su forma de transmisión es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos [(97)].

- ***E. coli* Enteroinvasiva (EIEC):** Produce diarrea con sangre que como sucede con otros agentes invasivos puede ir precedida por una diarrea acuosa inicial. En general produce una disentería muy parecida a la de la *Shigella sp*, pero con síntomas mucho más atenuados [(98)], recordando que estás dos bacterias están

relacionadas de manera genética y bioquímicamente (descarboxilasas negativas, no móviles y lactosa negativas).

Invade el epitelio del colon, al adherirse primero a las vellosidades de la mucosa mediante mucinasas y adhesinas, para después entrar a la célula por endocitosis, multiplicarse y expandirse a otras células sanas [99].

Su transmisión es de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada.

- ***E. coli* Enterohemorrágica (EHEC):** La diarrea con sangre no invasiva tiene como prototipo a la *E. coli* Enterohemorrágica, provoca una colitis hemorrágica sin fiebre y existe la posibilidad de que aparezca el síndrome hemolítico urémico [100].

El serotipo O157 H7 puede dar lugar a manifestaciones clínicas muy graves, es debida al consumo de carne cruda o mal cocida, pero también se ha encontrado en leche bronca, agua contaminada y algunas frutas y vegetales como la lechuga, rábanos y alfalfa [101].

La producción de toxinas como la STX (Shigatoxina), origina colitis hemorrágica y diarrea con sangre, ya que esta toxina es el principal mecanismo de patogenicidad y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago STX, que está insertado en el genoma [102]. Su periodo de incubación va de 1 a 8 días.

- ***E. coli* Enteroagregativa (EAEC):** Coloniza el colon. Se adhiere a las células epiteliales del colon con fimbrias de adherencia. En niños produce diarrea acuosa, de color verde, con moco y sin sangre. Puede haber pérdida significativa de agua y electrólitos. Se asocia con frecuencia a diarrea persistente [103].

En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicadas la bacteria y diversas moléculas que produce; tiene la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea [104].

El sitio blanco de daño de EAEC puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un periodo de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 ó 20 días [105].

- ***E. coli* de Adherencia Difusa (DAEC):**

Se ha descubierto una fimbria de superficie (F1845), que está relacionada con el fenómeno de adherencia difusa. Es capaz de formar estructuras protuberantes, las cuales le confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado in vivo.

El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos [106].

3.2.- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *E. coli* PATÓGENA.

Escherichia coli se puede aislar e identificar de múltiples formas; desde aquellas clásicas: basándose en sus características bioquímicas y/o serológicas, las que incluyen animales o ensayos en cultivos celulares, y aquellas más modernas, rápidas y con alta especificidad como las técnicas de Biología molecular.

CULTIVO BACTERIANO Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS.

Se emplean medios selectivos y diferenciales como el MacConkey y el Eosina más Azul de metileno, respectivamente, utilizando directamente materia fecal o hisopo rectal, después del periodo de incubación, se observan el crecimiento bacteriano. La *E. coli* de flora normal es lactosa positiva, pero si en el medio crecen lactosas negativas, pudieran ser EIEC, que generalmente se encuentra si la muestra es diarrea con sangre [(107)].

La identificación se hace mediante pruebas bioquímicas en como TSI, LIA, MIO, citrato, sorbitol, mucato, urea, rojo de metilo, Voges Proskauer, malonato y caldo manitol-rojo de fenol [(108)].

Se debe tener precaución con el número de resiembras que se hacen a las cepas después del primoaislamiento, ya que la estabilidad de la capacidad toxigénica de la bacteria varía de un microorganismo a otro y se pierde con un alto número de pases, principalmente en los serotipos O2:H5 y O73:H34 mientras que en las cepas O26:H11 es muy estable [(108)].

SEROLOGÍA.

Se utilizan cepas aisladas en tubos de base de agar sangre (BAB), para posteriormente hacer la serología. Se utilizan sueros polivalentes A, B o C de EPEC, en niños con diarrea con moco y sangre, especialmente menores de un año [(109)].

La identificación del grupo EHEC se puede hacer por serotipificación o bien por poner de manifiesto la producción de la toxina STX también se puede cuantificar la elevación de anticuerpos dirigidos hacia el lipopolisacárido de E. coli O157:H7, así como demostrar la presencia de factores de virulencia como pO157 [(110)].

MODELOS ANIMALES.

La evidencia de la producción de las toxinas LT y STX de E. coli se puede realizar por un modelo “in vitro” que permita observar el efecto citopático en cultivo de células

Vero (células de riñón de mono verde), CHO (células de ovario de hamster chino) o HeLa (células de carcinoma cérvico-uterino) [111].

La toxina y las células se dejan en contacto hasta observar la aparición de un efecto citotónico (células alargadas) en el caso de toxina LT o bien efecto citotóxico (células redondas y muertas) debido a la toxina STX [111].

- **ESTUDIOS MOLECULARES.**

Las técnicas moleculares para la identificación de cualquiera de los 6 grupos de *E. coli*, se realizan principalmente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual es una técnica con alta especificidad, sensibilidad y muy rápida.

La PCR permite el copiado o amplificación "*in vitro*" de regiones de ADN, en forma exponencial. La hibridación se realiza entre el ADN blanco presente en la muestra y el iniciador, que es una secuencia conocida de un fragmento específico de un gen involucrado en la patogenicidad de cepas de *E. coli* [112].

La síntesis "*in vitro"* del fragmento de DNA o amplificación se efectúa mediante cambios de temperatura en tres fases: una de desnaturalización, una de hibridación y fase de alargamiento, cuyas condiciones serán diferentes en función del gen que se desea amplificar. Los reactivos necesarios para la PCR de cada muestra son nucleótidos de adenina, timina, citocina, guanina, $MgCl_2$, iniciadores y enzima Taq polimerasa [113].

Al finalizar la amplificación se toman alícuotas y se someten a electroforesis en gel de agarosa teñidos usualmente con bromuro de etidio [114].

También se pueden utilizar sondas para la hibridación en fase sólida como es el "colony blot". Las sondas son fragmentos pequeños de DNA que contienen parte de los genes que codifican para algún factor de virulencia y pueden estar marcadas

radioactivamente con 32P o no radiactivamente con biotina o digoxigenina y se pueden usar en ensayos sensibles y específicos para detectar cepas patógenas de interés clínico [115].

Se pueden utilizar también, sondas específicas para la toxina termolábil (LT) y termoestable (ST) del grupo ETEC, para la fimbria Bfp de EPEC, para el locus asociado con invasividad (ial) de EIEC y para la enterohemolisina (hlyA) de EHEC, entre otros factores de patogenicidad característicos de las bacterias [115].

El colony blot es la transferencia del DNA de una colonia de bacterias a una fase sólida que puede ser nylon, papel filtro o nitrocelulosa, para su posterior hibridación. Para esto las colonias puras, previamente aisladas de pacientes con diarrea, se inoculan directamente en forma ordenada sobre una placa de agar Luria y se incuban 4 h. a 37 °C. Después de este tiempo se coloca la membrana de nylon sobre la superficie de la placa con las colonias en crecimiento y se incuba toda la noche [116].

Las bacterias se rompen sobre la membrana y el DNA se desnaturaliza al colocar ésta en una solución de hidróxido de sodio para posteriormente fijarle el DNA. La hibridación se realiza con una sonda marca da con digoxigenina, la cual es un fragmento de un gen de virulencia específico, y se pone de manifiesto empleando un anticuerpo antidigoxigenina conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, cuyo sustrato es el BCIP, y el NBT es el cromógeno que desarrolla un color negro o café cuando se incuba la membrana a temperatura ambiente y en la oscuridad [116].

En fechas recientes, se ha desarrollado un ensayo que utiliza la tecnología de microarreglos de DNA, en la que se usan sondas con genes específi cos de serotipos de *E. coli* como el O55, O111, O114, O128 y el O157.87 La misma tecnología de microrreglos se ha usado para extender el perfi l de detección de antígenos somáticos de *E. coli*, así como a los antígenos flagelares [117].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En el Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos” la parasitosis intestinal por *Blastocystis sp* siguen siendo una causa importante de consulta, sin embargo, al no conocer de manera definida la patogenicidad del mismo, la aplicación del tratamiento a veces no es realizada de una manera adecuada, por lo tanto con la realización de este trabajo se pretende contribuir en el conocimiento de estas infecciones para ayudar a restablecer la salud de los pacientes.

Así mismo, es necesario conocer datos actuales de frecuencia y distribución de *Blastocystis sp* en niños con síntomas gastrointestinales remitidos del servicio de consulta externa del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”.

JUSTIFICACIÓN.

La reportes sobre la frecuencia de *Blastocystis sp* varían desde el 1.5 al 10% en países desarrollados y del 30 al 60% en países en vías de desarrollo [(118)].

Estudios realizados en Venezuela, demuestran la presencia de *Blastocystis sp* en un 9.2% en niños menores de 5 años con diarrea aguda infecciosa, [(119)]. Así mismo, Rincón y cols., demuestran que el 36.2 % de los individuos presentan enteroparásitos, siendo el *Blastocystis sp* en ambos casos el parásito más frecuentemente encontrado [(120)].

En Lima, Pajuelo Camacho analizando muestras fecales de pacientes hospitalizados y de consultorios externos en el Hospital de Emergencias Pediátricas reportaron una incidencia de 34,3% de *Blastocystis sp*, siendo el enteroparásito no helmíntico más frecuente [(121)].

Soriano y colaboradores en Argentina estudiaron las parasitosis que se presentaban en dos grupos: preescolares (2 a 5 años) y escolares (6 a 14 años), en los cuales se identificaron 7 especies de protozoos intestinales incluyendo patógenos y comensales y 4 especies de helmintos. *Blastocystis sp* fue la especie parasitaria más frecuente en ambos grupos, seguido por *Enterobius vermicularis*, *Giardia lamblia, Entamoeba histolytica y Ascaris lumbricoides.* [(122)].

En el estado de Guerrero, México, se determinó la prevalencia de *Blastocystis sp,* analizando una muestra de excremento, en tres localidades (Chilpancingo, Petaquilla y Tixtla) con un total de 1,138 niños preescolares y escolares, de ambos sexos. *Blastocystis sp* ocupó el primer lugar con el 61% de los CPS positivos. El 90% de los casos fueron parasitosis única. El 58% de los niños aparentemente sanos y con *Blastocystis sp* declararon tener algún síntoma gastrointestinal. La asociación del parásito con dolor abdominal y beber agua de la llave tuvo diferencia significativa [(123)].

En un estudio realizado en Turquía por Kaya y cols, en el que se incluyeron 52 pacientes con *Blastocystis sp* en heces y ningún otro agente patógeno; se describen como síntomas principales: dolor abdominal (76.9%), diarrea (50%) y plenitud abdominal (32.6%) [124].

En la India, Bratt y cols, estudiaron 389 pacientes los que fueron evaluados microscópicamente para detectar la presencia de *Blastocystis sp,* demostrando una incidencia del 11% para este parásito, siendo los principales síntomas referidos: dolor abdominal (78.9%), anorexia (52.6%), diarrea (47.3%) y flatulencias (47.3%) [125].

Así mismo, en un hospital en Arabia Saudita, Qadri y colaboradores reportan que los pacientes con blastocistosis presentaron: dolor abdominal (87.9%), constipación (32.7%), diarrea (23.4%), vómito (12.5%) y fatiga (10.51%) [126].

Dado que la patogenicidad de *Blastocystis sp*, aún está en controversia, ya que no se han encontrado mecanismos de virulencia, algunos autores han sugerido que la presencia de enterobacterias al hacer sinergismo con el parásito, puede ser la responsable de la patogenicidad.

En Bagdad, Magdi, estudió la asociación entre el *Blastocystis sp* y las enterobacterias, incluyó 200 muestras de heces realizando examen microscópico y cultivo bacteriano; 67% de estas muestras mostraron un solo enteropatógeno, 21% muestran asociación y 12% fueron negativos. Con respecto a la asociación del parasito con las enterobacterias se demostró en 12% de los casos, sugiriendo la posibilidad de que algún tipo de sinergismo pueda existir, el daño hecho por el parásito al recubrimiento de la pared intestinal, puede dar lugar a la posibilidad a alguna bacteria patógena para invadir el intestino [127].

Así mismo, en China, Qiao y colaboradores, usando tinciones como la de hematoxilina y yodo-lugol, además de cultivos celulares como el RPMI-1640, determinaron que el hecho de que al no estar presente otros agentes patógenos en la mitad de muestras positivas con *Blastocystis sp*, este podía causar la enfermedad de forma independiente y que su patogenia puede estar relacionado con cambios micro-ecológicos intestinales [128].

Con respecto al tratamiento para erradicar al parásito, varios medicamentos han sido probados, sin embargo, si las enterobacterias juegan un papel en la patogenicidad del parásito, se requiere una alternativa de tratamiento.

La nitazoxanida ha sido exitosa en la erradicación de la forma vacuolar de *Blastocystis sp*, al igual que en la remisión de síntomas y erradicación del parásito en pacientes con SIDA [(129)]. Así como por *Díaz* y *Mondragón* en el Estado de México en niños con una eficacia global del tratamiento de 84 %, siendo bien tolerado y sin efectos adversos [(130)].

En Irán, se comparó la eficacia del metronidazol a dosis de 250-750 mg, 3 veces al día, por 10 días, obteniendo una eficacia del 33.3%, comparándolo con Trimetroprim con Sulfametoxazol y demostrando con este medicamento una eficacia del 22.2%. Los autores concluyen que en este tipo de infecciones graves es probable que exista una resistencia a éstos fármacos, ya que no en todos los individuos son efectivos [(74)].

Por otra parte, el Trimetroprim con Sulfametoxazol ha sido reportado con una eficacia del 97.3% en estudios realizados en Turquía en pacientes a los que se les demostró la presencia de *Blastocystis sp* y se descartaron agentes de etiología bacteriana o viral, los autores consideran que es una buena opción la administración de este antibiótico en casos de blastocistosis [(131)].

En Venezuela se estudiaron 14 individuos infectados (7 varones y 7 hembras), con edades entre 5-79 años, para demostrar la eficacia del Secnidazol contra el *Blastocystis sp;* los pacientes fueron evaluados clínica y parasitológicamente antes y después del tratamiento. La dosis del medicamento fue de 2g en adultos y 30 mg/Kg/peso en niños. En 14,3% (2/14) de los pacientes se eliminó el parásito y en el resto, se observó disminución significativa del número por campo ($p< 0,05$), de la frecuencia de formas vacuolares ($p=0,001$) y formas granulares ($p<0,05$) y disminuyó la positividad del examen directo ($p<0,001$) [(132)].

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

Valorar el papel de *Escherichia coli* en la patogenicidad del *Blastocystis sp* y estimar la frecuencia y distribución de *Blastocystis sp* en niños con síntomas gastrointestinales en niños que acuden al Hospital Infantil de Morelia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Describir la asociación de *Escherichia coli* patógena con *Blastocystis sp* en niños que presenten síntomas gastrointestinales.
2. Enlistar los síntomas gastrointestinales en niños con *Blastocystis sp*, en infecciones únicas o mixtas.
3. Determinar la frecuencia del parásito.
4. Conocer la distribución de *Blastocystis sp* por sexo, grupos etarios y estacionalidad.
5. Conocer la asociación de *Blastocystis sp*, con otros parásitos intestinales.

HIPÓTESIS.

HIPÓTESIS.

La patogenicidad de *Blastocystis sp* no depende de la asociación con alguna enterobacteria patógena como *Escherichia coli*.

METODOLOGÍA.

Es un estudio de tipo prospectivo, descriptivo, transversal. Se incluyeron muestras de heces, pertenecientes a 329 niños remitidos al Laboratorio de Investigación en Microbiología y Parasitología, del servicio de Consulta Externa del Hospital Infantil de Morelia, quienes presentaban síntomas gastrointestinales diversos y a los cuales se les realizó examen Coproparasitoscópico (CPS) en serie y coprocultivo (CPC); en el periodo comprendido entre el 10 de Diciembre de 2009 al 28 de Mayo de 2010.

Las muestras fueron procesadas por examen directo con solución salina isotónica, de concentración por flotación (Técnica de Faust), por sedimentación (Técnica de Ritchie), Tinción tricrómica y Micrometría.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

Esta investigación se realizó en niños de 1 a 15 años, que presentaban síntomas gastrointestinales y a los cuales se les aplicó una encuesta para conocer los mismos, y a quienes se les demostró la presencia de *Blastocystis sp* sólo o asociado a otros parásitos, y se les realizó coprocultivo.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

Niños a quienes se les demostró la presencia de *Blastocystis sp*, que hayan recibido tratamiento, 15 días antes de iniciar el estudio.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

Pacientes a quienes no se les realizó coprocultivo o a quienes no hayan contestado encuesta.

MATERIAL Y MÉTODOS.

A los niños pacientes se les da por escrito las indicaciones para tomar las muestras correctamente (***anexo 1***), estas son procesadas por las técnicas de examen directo en fresco con solución salina, concentración por flotación y por sedimentación, tinciones y micrometría (***anexo 2***), y así como coprocultivo (***anexo 3***) para realizar la búsqueda de enterobacterias.

Las muestras de heces, son llevadas al Laboratorio acompañadas de una solicitud donde se indican datos como: nombre del paciente, edad, sexo, fecha de solicitud del estudio, diagnóstico presuntivo, número de expediente, servicio de procedencia y el nombre del médico que solicita el estudio.

UNIDADES DE OBSERVACIÓN.

Pacientes a los que se les demostró la presencia de *Blastocystis sp* sólo y/o asociado a alguna enterobacteria.

TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Descriptivo: utilizando números absolutos, tasas y porcentajes.

Se realizó un formato en Microsoft Excel para determinar las variables de estudio y poder establecer la frecuencia, distribución, sintomatología y resultados del coproparasitoscópico y del coprocultivo realizado, este formato deberá llevar los siguientes puntos; Nombre y número de identificación del paciente, edad, sexo, fecha, resultado del examen CPS y del Coprocultivo. Los datos fueron extraídos de las tarjetas y bitácoras del laboratorio de Investigación en Microbiología y Parasitología, de este Hospital.

CRITERIOS DE VALIDEZ:

Examen en fresco verificando que la morfología del parasito coincida con la morfología estándar diagnóstica.

RESULTADOS

Atendiendo a los criterios, se incluyeron 48 pacientes, en el 46 % se encontró a *Blastocystis sp* como único agente, asociado a comensales en 25%, a parásitos patógenos en 17 % y a enterobacterias en 12%, (**Tabla 1**), encontrándose mayormente asociado a *Entamoeba coli, Endolimax nana* y *Giardia lamblia*.

ASOCIACIÓN	NÚMERO	PORCENTAJE
***Blastocystis sp* ÚNICO**	22	46 %
PARÁSITOS COMENSALES.	12	25 %
PARÁSITOS PATÓGENOS.	8	17 %
***Escherichia coli* PATÓGENA.**	6	12 %
	TOTAL: 48	

Tabla 1. Asociaciones de *Blastocystis sp* con parásitos y *Escherichia coli* patógena.

Con respecto a los síntomas gastrointestinales que presentaron los niños con infección única por *Blastocystis sp*, se observan que los más frecuentemente encontrados son: dolor abdominal (77.2%), flatulencias (68.1%), plenitud abdominal (63.6%) y periodos de constipación (50%) **Tabla 2**.

Cuando existe la asociación de *Blastocystis sp* con *Escherichia coli* PATÓGENA, los síntomas principalmente referidos fueron dolor (83.3%), plenitud abdominal (50%), flatulencias (50%) y bruxismo (50%) (**Tabla 3**)

SÍNTOMA GASTROINTESTINAL	NÚMERO (%)
1.- DOLOR ABDOMINAL	17 (77.2 %)
2.- FLATULENCIAS	15 (68.1 %)
3.- PLENITUD ABDOMINAL	14 (63.6%)
4.- PERIODOS DE CONSTIPACIÓN.	11 (50 %)
5.- HECES BLANDAS	9 (40.9%)
6.- NÁUSEAS	9 (40.9%)
7.- BRUXISMO	9 (40.9%)
8.- VÓMITO	4 (18.8 %)
9.- PRURITO ANAL.	4 (18.8 %)
	TOTAL: 92

Tabla 2. Síntomas asociados a infección por *Blastocystis sp*.

SÍNTOMA GASTROINTESTINAL	NÚMERO (%)
1.- CÓLICOS/DOLOR	5 (83.3 %)
2.- FLATULENCIAS	3 (50 %)
3.- PLENITUD ABDOMINAL	3 (50 %)
4.- BRUXISMO	3 (50 %)
5.- HECES BLANDAS/DIARREA	2 (33.3 %)
6.- PERIODOS DE CONSTIPACIÓN.	2 (33.3 %)
7.- PRURITO ANAL.	2 (33.3 %)
8.- VÓMITO	1 (16.6 %)
9.- NÁUSEAS	1 (16.6 %)
	TOTAL: 6

Tabla 3. Síntomas presentados en infección por *Blastocystis sp* asociado con *Escherichia coli* PATÓGENA

Como puede observarse, los síntomas son mayormente referidos por los pacientes en parasitosis única que asociada a *Escherichia coli*, a excepción del dolor abdominal que fue más mencionado en infecciones mixtas, así como bruxismo y el prurito anal (**Gráfico 1**).

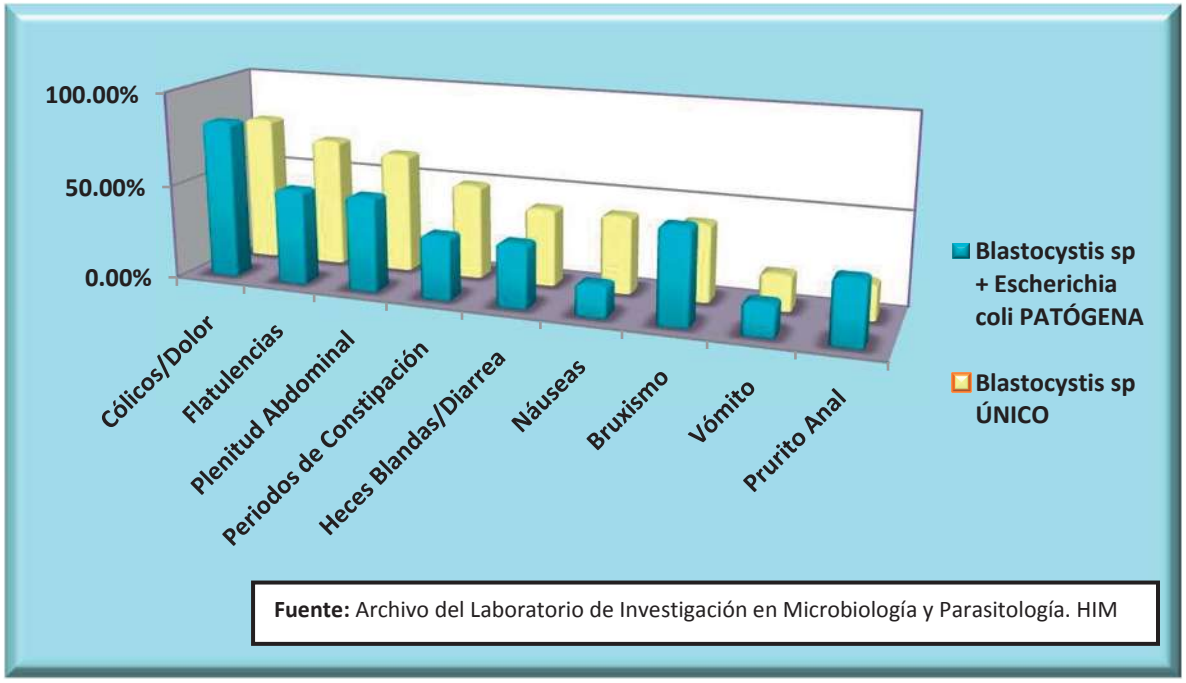


Gráfico 1. Comparación de Síntomas Gastrointestinales en Parasitosis Única o Mixta.

De los 329 niños estudiados, el 34% tenían parásitos patógenos y/o patógenos-comensales, 3 % parásitos comensales y el 63% de los niños no tenían ningún parásito (**Gráfico 2**).

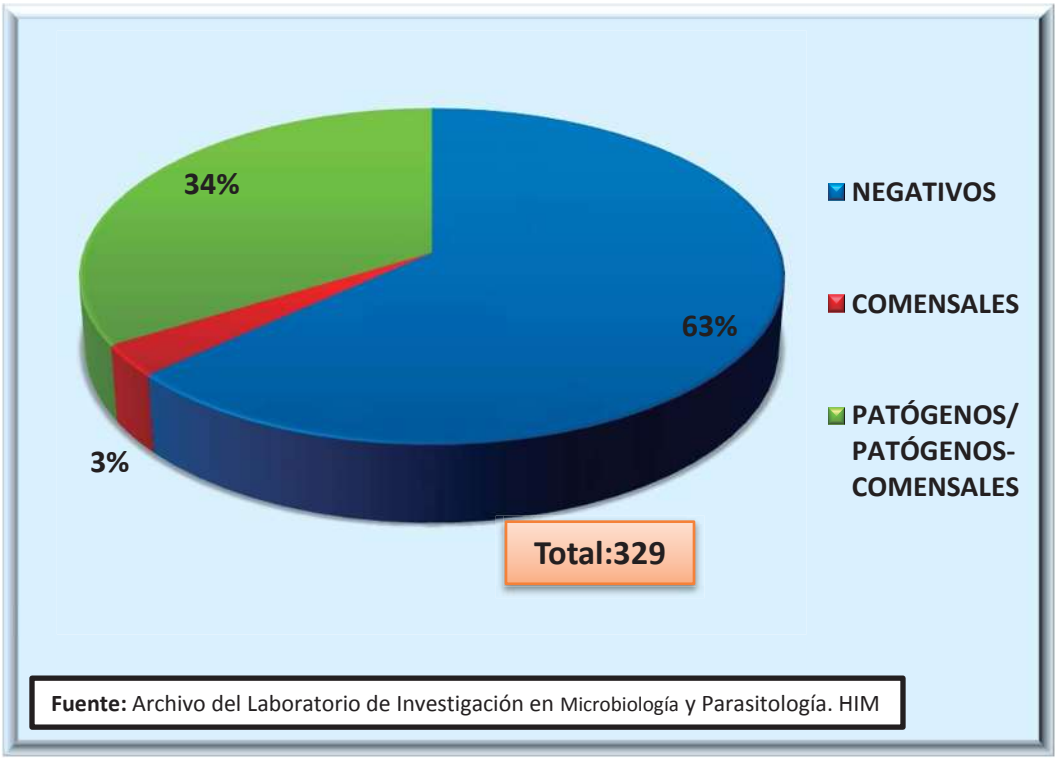


Gráfico 2. Frecuencia de Parásitos. HIM.

Blastocystis sp fue el parásito más frecuentemente encontrado (81.14%), seguido de *Giardia lamblia* (4.91%) y *Entamoeba coli* (4.91 %) (**Gráfico 3**).

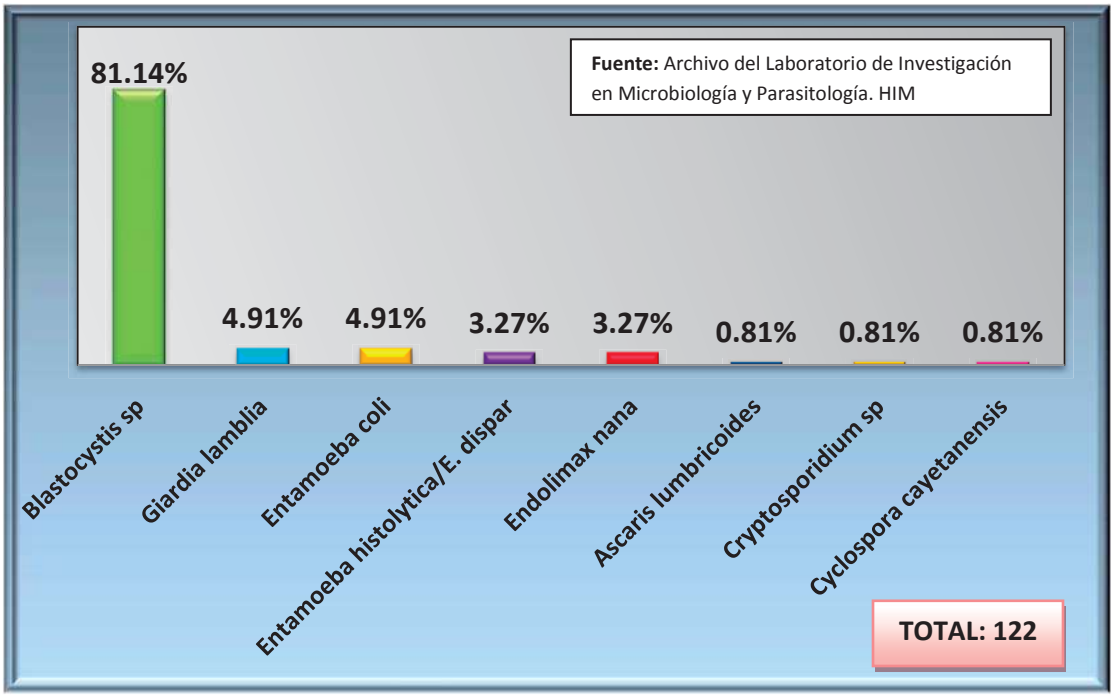


Gráfico 3. Frecuencia de Parásitos Intestinales.

De los casos encontrados con *Blastocystis sp*, 53% pertenecían al sexo femenino y 47% al sexo masculino (**Gráfico 4**).

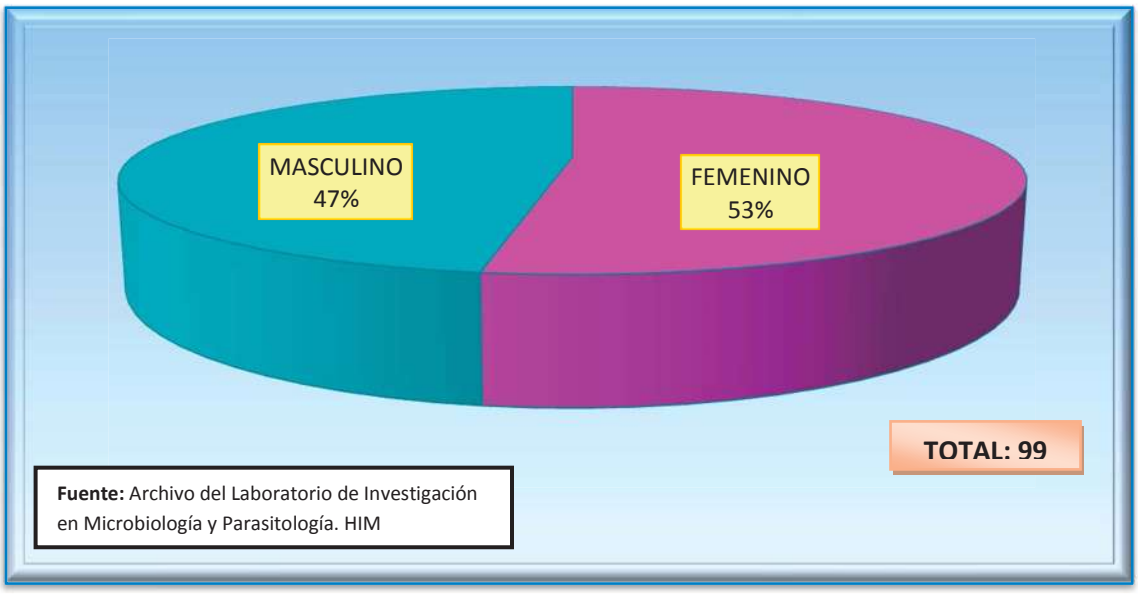


Gráfico 4. Distribución por Sexo de *Blastocystis sp*.

En cuanto a la distribución por grupos etarios, se observa que el *Blastocystis sp*, afecta tanto a los niños preescolares como a los escolares, principalmente los de 7 años (**Gráfico 5**).

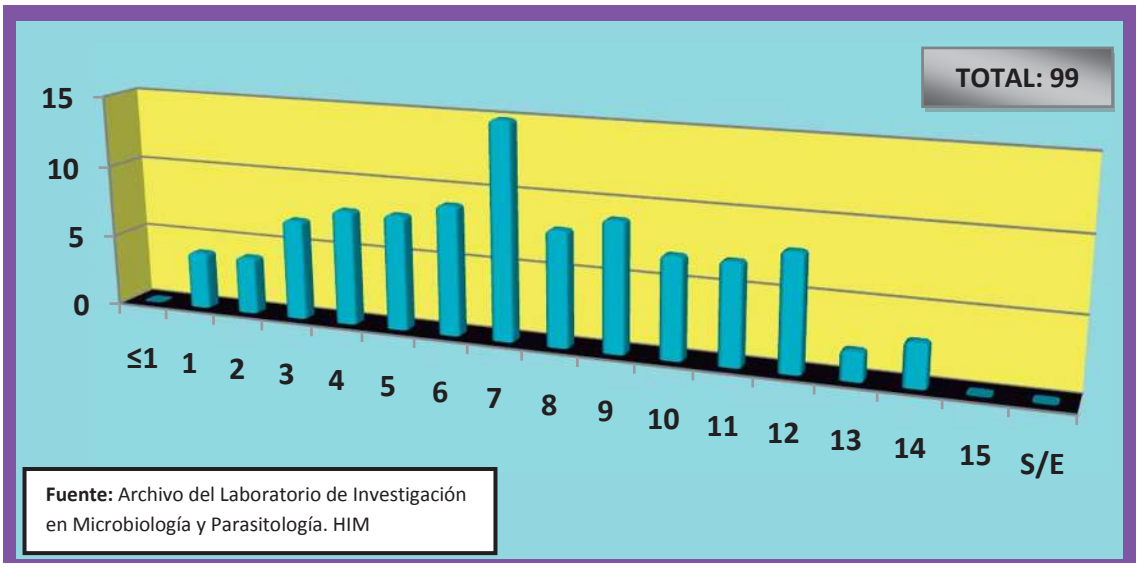


Gráfico 5. Distribución de *Blastocystis sp* por grupos etarios.

Con respecto a la estacionalidad que presentó el parasito en el periodo de estudio, estuvo presente en todos los meses, incrementando el número de casos en el mes de Mayo (**Gráfico 6**).

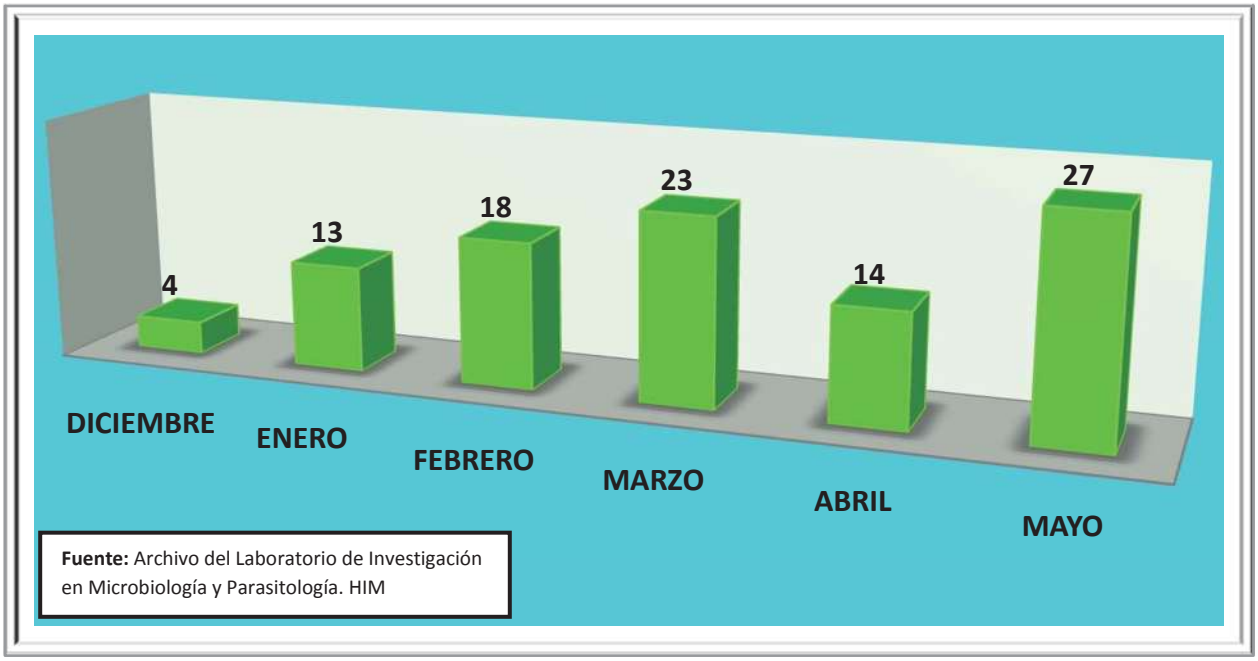


Gráfico 6. Estacionalidad *Blastocystis sp* en niños del HIM.

En los pacientes a los que se les demostró la presencia de *Blastocystis sp*, se encontró como único agente en el 43.5% y asociado mayormente a *Entamoeba coli, Endolimax nana* y *Giardia lamblia* (**Tabla 4**).

ASOCIACIÓN.	NÚMERO	PORCENTAJE
***Blastocystis sp* ÚNICO**	51	43.5 %
Entamoeba coli	25	21.3%
Endolimax nana	18	15.4%
Giardia lamblia	14	12 %
Entamoeba hartmanni	8	6.8 %
Cyclospora cayetanensis	1	0.8 %

Tabla 4. Asociaciones de *Blastocystis sp* con parásitos.

DISCUSIÓN.

Estudios realizados en Iraq en el que se pretendía demostrar el sinergismo o antagonismo que tiene *Blastocystis sp* con otros patógenos, para así apoyar la teoría de que es causante etiológico de diarreas, se reportan los siguientes datos: 43% de los aislados correspondieron a *Blastocystis sp,* 8% a bacterias y 37% a otros parásitos, estos resultados son muy similares a los encontrados en este estudio; 46% *Blastocystis sp*, 42% a parásitos y 12% con enterobacterias, demostrando que éste parásito no necesita de las enterobacterias para causar malestares gastrointestinales [(127)].

En una comunidad rural de Jordán, se hicieron estudios para demostrar la etiología en pacientes con gastroenteritis, revelando que *Blastocystis sp* era causante de un 30% de diarrea en éstos pacientes, concluyendo que éste no depende de enterobacterias como *Escherichia coli* que fue causante del 11.1% de estas infecciones gastrointestinales, manifestando así la patogenicidad del parásito, como causante de diarrea, concordando con los resultados de nuestra investigación [(133)].

De manera similar, Qiao y cols, en China, determinaron la relación que tienen las enterobacterias en la patogenicidad del *Blastocystis sp*, indicando que al no encontrar bacterias patógenas en el intestino y comprobando únicamente la presencia de *Blastocystis sp* en pacientes con diarrea, se pone de manifiesto que éste parásito es capaz de producir por si mismo enfermedad gastrointestinal [(128)].

Entre los síntomas gastrointestinales más mencionados por nuestros pacientes se encontraron; dolor abdominal (77.2%), flatulencias (68.1%) y plenitud abdominal (63.6%), datos similares reportan Kaya y cols., en Turquía [(124)].

En este mismo sentido, se reportan datos que demuestran que los síntomas más comunes presentes en la blastocistosis son: dolor abdominal, constipación, diarrea y flatulencias; en Iraq [(125)] y Arabia Saudita [(126)].

Salinas y cols, en Perú, demuestran que los síntomas atribuidos a blastocistosis, son muy poco específicos, y que incluyen diarrea, dolor abdominal, náuseas y flatulencias, y que éstos no van acompañados con fiebre, confirmando características iguales en nuestro estudio [15]

En el presente estudio, se encontró una frecuencia de parásitos del 37%, datos similares son reportados en Venezuela por Rincón y cols, quienes estudiaron niños del Hospital Infantil, de Maracaibo, Zulia y encontraron una frecuencia del 36.2% [120].

En Perú, Pajuelo y cols, reportan una incidencia de parásitos del 50.9% en el Hospital de Emergencias Pediátricas de Perú, mostrando una frecuencia parasitaria más alta que la que encontramos en esta investigación (37%) [121].

El parásito más encontrado fue *Blastocystis sp*, coincidiendo con lo reportado en Venezuela por Devera y cols, que estudiaron una estancia educativa del estado de Bolívar, encontrando una prevalencia muy alta de este parásito del 86.06% [134], al igual que en Brasil con una frecuencia del 40.9% [135].

Haciendo una comparación con estudios hechos en el estado de Guerrero, México, se nota al igual que en este estudio, que el *Blastocystis sp,* es el parásito más frecuente, en este caso en la población infantil, al encontrar un 61% de prevalencia [123].

Datos muy contrastantes se reportan en Japón, en donde se demostró que en 3,292 pacientes del Hospital Ryukyu, sólo existe una frecuencia del *Blastocystis sp* del 1% [136].

En la presente investigación, en los pacientes parasitados con *Blastocystis sp,* se detectó un 53% de pacientes pertenecientes al sexo femenino y un 47% en el sexo masculino, variaciones mínimas reportan en Tailandia por Saovanee [137] y en Venezuela [138] (51% sexo masculino y 49 sexo femenino).

En base a la distribución de *Blastocystis sp*, por grupos etarios, se encuentra que este parásito se puede encontrar tanto en niños preescolares como escolares,

demostrando una incidencia más alta a los 7 años de edad, esto se asemeja a estudios realizados en el estado de Guerrero al encontrar en una población infantil que el 31.2% que presentaba *Blastocystis sp* eran preescolares y el 68.2% eran niños escolares [123].

En base a las asociaciones de *Blastocystis sp* con otros parásitos, al igual que en EUA se ha demostrado que cuando está relacionado con parásitos como *Endolimax nana*, y se observa una alta prevalencia como la que se demuestra en este estudio (81.14%), *Blastocystis sp* es considerado como el agente etiológico de diarrea [139].

Al igual que en nuestra investigación, Devera y cols en Venezuela, demuestran que los parásitos más asociados a *Blastocystis sp*, son *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* y *Giardia lamblia* [134].

CONCLUSIONES.

En esta investigación, se demuestra que *Blastocystis sp*, es el parásito más frecuente en niños que acuden al Hospital Infantil de Morelia (81.14%), así mismo, que no necesita la asociación o sinergismo con alguna enterobacteria como la *Escherichia coli*, para provocar enfermedad o manifestaciones gastrointestinales, tales como: dolor abdominal (77.2%), flatulencias (68.1%), plenitud abdominal (63.6%), periodos de constipación (50%), ya que dichos síntomas fueron mencionados por los niños con *Blastocystis sp* y sin enterobacterias.

RECOMENDACIONES.

- El laboratorio encargado del diagnóstico parasitológico, deberá de reportar los casos de parasitosis por *Blastocystis sp*, incluyendo la forma observada.

- El médico tratante de la infección parasitaria por *Blastocystis sp*, deberá recomendar la administración de tratamientos que ayuden a eliminar los síntomas presentados por el paciente, este se elegirá de acuerdo a los síntomas manifestados por los mismos.

- En caso de diarreas, es necesario demostrar el agente etiológico de la infección, e incluir la búsqueda de *Blastocystis sp* en el diagnóstico diferencial.

- Es muy importante realizar encuestas sobre los síntomas gastrointestinales que presentan nuestros pacientes, así como incluir preguntas de los posibles factores de riesgo que puedan referir los mismos.

- Promover campañas en los que se capacite a médicos, químicos-farmacobiólogos, laboratoristas; encargados del diagnóstico y tratamiento de esta parasitosis, sobre la importancia epidemiológica del *Blastocystis sp*.

- Es muy importante, educar y enseñar a la población, de las posibles causas de transmisión de este parásito, para que mantenga las medidas de control de las infecciones de transmisión fecal - oral o por alimentos o agua contaminadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. - **Amato Neto V, Rodríguez Alarcón Rs, Gakiya E, Ferreira C, Et, Al.** *Blastocystis*: a high proportion of cases found in schoolchildren of Sao Paulo, state of Sao Paulo, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2004; 37:354-6.

2.- **Domínguez V.** Heterogeneidad Genética de Blastocystis hominis: Implicaciones Patogénicas. Valencia, España. 2003; 15-16

3.- **Alger J.** Blastocystis hominis: ¿Patógeno o Comensal? Revista Médica Hondureña; 2005; 65 (4): 114-117.

4.- **Aguirre A.** Aportaciones sobre la Ultraestructura de Blastocystis hominis. México, D.F., 2003; 3-5.

5.- **Brittan F.** Report of a series of microscopical investigations on the pathology of cholera. London Med Gaz.1849; 9:530-542.

6. -**Swayne G.** An account of certain organic cells peculiar to the evacuations of cholera. Lancet 1849; 2: 368-371.

7. - **Zierdt Ch.** Blastocystis hominis. Past and future.Clin Microbiol Rev 1991; 4: 61-79.

8. - **Alexeieff A.** Sur la nature des formations dites “kystes de Trichomonas intestinalis.” C R Soc. Biol. 1911; 71:296–298.

9. - **Brumpt.** Colite a Tetramitus mesnili (Wenyon 1910) et, colite a Trichomonas intestinalis Leuchart 1879. Blastocystis hominis n sp et formes voisines. Bull Socww Pathol Exot 1912; 5:725–730.

10. - **Zierdt C, Rude W.** Bull BS Protozoan characteristics of Blastocystis hominis. Am J Clin Pathol 1967; 48: 495.

11.- **Levine J.A, Estevez E.G.** Examination of preserved stool specimens for parasites: lack of value of the direct wet mount. J. Clin Microbiology. 1985; 22: 666-667

12. - **Silberman J, Sogin Ml, Leipe D, Clark C**. Human parasite finds taxonomic home Nature 1996; 380-398.

13. - **Noel C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb V, Delgado V, et al.** Molecular phylogenies of Blastocystis isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. J Clin Microbiol 2005; 43:348-355.

13.- **Stensvold C, Suresh G, Tan K, Thompson R, Traub R, Viscogliosie, Yoshikawa H, Clark C.** Terminology for Blastocystis subtypes-a consensus. Trends Parasitol 2007;23(3):93-6.

14. -**Stensvold C, Alfellani M, Norskov-Lauritsen S.** Subtype distribution of Blastocystis isolates from synanthropic and zoo animal and identification of a new subtype. International Journal for Parasitology. 2009; 39 : (4): 473-479.

15.- **Salinas J, Vildozola H.** Infección por Blastocystis sp. Revista Gastroenterología Perú. 2007; 27: 264-267.

16.- **Vázquez T, Campos R, García C, Valencia P.** Demostración de la fase de esquizogonia de Blastocystis hominis en humanos. Rev. Enfermedades infecciosas en pediatría. 2002; 47-58.

17.- **Perez S.E, Guzman R.C.** La morfología de Blastocystis hominis en las heces y evaluación de los métodos parasitológicos. Gen Rev. de la sociedad venezolana de gastroenterología 1994; 48:226-231.

18. - **Boreham P, Stenzel D.** The current status of Blastocystis hominis . Parasitology Today. 1993. (9): 251.

19.- **Nakamura Y, Hashimoto T, Yoshikawa H, Kamaishi T, Nakamura F, Okamoto K, Hasegawa M.** Phylogenetic position of Blastocystis hominis that contains cytochrome free mitochondria, inferred from the protein phylogeny of elongation factor 1α. Molecular and Biochemical Parasitology. 1996, 77:241-245.

20. - **Tan Ks, Singh M, Yap E.** Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. International Journal for Parasitology.2002 (32): 789-804.

21. - **Wong, K. H., Ng G, Lin Rt, H. Yoshikawa, M. B. Taylor, And K. S. Tan.** Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. 2008. Parasitol. Res. 102:663–670.

22. -**Scicluna, S. M., B. Tawari, And C. G. Clark.** DNA barcoding of *Blastocystis*. Protist. 2006. 157:77–85.

23. – **Yoshikawa H, et al.,** Polymerase chain reaction-based genotype classification among human Blastocystis hominis populations isolated from different countries, Parasitol Res 2004; 92: 22–29.

24.- **Velarde L, Mendoza M.** Prevalencia de Blastocystis hominis en menores de 12 años de una población mexicana urbana. Revista Cub Pediatría. 2006; 78(4).

25. - **Stenzel D, Boreham P, Mc-Dougall R.** Ultrastructure of Blastocystis hominis in human stool samples. International Journal for Parasitology 1991;21: 807-812.

26. - Pérez S.E, Guzmán R.C, La morfología de Blastocystis hominis en las heces y evaluación de los métodos parasitológicos. Gen Rev. de la sociedad venezolana de gastroenterología 1994; 48:226-231

27.- Wang K X, Li C P, Wang J, et al. Epidemiological survey of Blastocystis hominis in Huainan City, Anhui Province, Chine. World J Gastroenterol 2003; 8: 928-32.

28.- Nasirudeen Ama, Tan Ks, Singh M, Yap Eh. Programmed cell death in human intestinal parasite, Blastocystis hominis. Parasitology 2002; 123: 235-246.

29. - Vdovenko A. *Blastocystis hominis*: origin and significance of vacuolar and granular forms. Parasitology Research 2001; 86: 8-10.

30. -Windsor, J. J., D. J. Stenzel, And L. Macfarlane. Multiple reproductive processes in *Blastocystis hominis*. Trends Parasitol. 2003. 19:289–290, 291–292.

31.- Vázquez T, Valencia R. Caracterización morfológica de *Blastocystis hominis* en pacientes con diarrea aguda para el establecimiento de criterio diagnóstico. Acta Pediátrica Mex. 1998; 19(5): 233-4.

32.- Tay-Lara, V-G. Parasitología médica 7ª ed. Méndez editores Méx. 2002; 104-106.

33. - Larrauri R, Guillén A, Rojas R. Una nueva visión de Blastocystis hominis. Rev. Peruana de Medicina experimental y Salud. 2003; 20 (02): 116.

34. - Moe Kt, Singh M, Howe J, Tan Sw, Ng Gc, Chen Xq, Et al. Observations on the Ultrastructure and viability of the cystic stage of Blastocystis hominis from human feces. Parasitol Res. 1996; 82(5):439-44.

35.- Center For Disease And Prevention. Texto En Línea: [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/Blastocystis.htm] Consultado;9 de Junio de 2010

36.- Lozano Ch, Díaz I, Casas M, et al. Epidemiology and pathogenicity of Blastocystis hominis. Rev. Universidad Zulia Venezuela. 2003; 1: 11-19.

37. - Chacín, L. Aspectos controversiales de *Blastocystis hominis*: Taxonomía y concepto emergente de patogenicidad. Investigación Clínica 1991; 32: 147-148.

38. - Koutsavlis A, Soto J, et al. Blastocystis hominis a new Pathogen in a Day-Dare Centers? Regional Public Health Department, Montreal, Quebec, Canada. 2003; 27 (09): 1-9.

39. -García-Martos P, Benjumeda M. Blastocystis hominis. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1995,(10): 421-424.

40. - Markell Ek. Editorial: Is there any reason to continue treating Blastocystis infections?. Clinical Infectious Diseases. 2000; (21): 104-105.

41. - Babcock D, Houston R, Kumaki D, Shlim D. Blastocystis hominis in Kathmandu, Nepal. The New England Journal of Medicine. 2005; (313): 1419.

42. - Cimerman S, Cimerman B, Salomao D. Enteric parasites and AIDS. Sao Paulo Med J/Rev Paul Med 2000; 117(6):266-73.

43. - Logar J, Andlovic A, Poljsak-Prijatelj M. Incidence of Blastocystis hominis in patients with diarrhea. J Infect 1997; 28:151–154.

44. - Miller R, Minshew B. Blastocystis hominis: an organism in search of a disease. Rev Infect Dis1995; 10:930.

45. – Markell E, Udkow M. Blastocystis hominis: pathogen or fellow traveler? Am J Trop Med Hyg. 1996; 35:1023.

46. - Shlim D, Hoge C, Rajah R, Et al. Is Blastocystis hominis a cause of diarrhea in travelers? A prospective controlled study in Nepal. Clin Infect Dis 1995; 21:97.

47.- Markell E. Is there any reason to continue treating Blastocystis infections? Clin Infect Dis 1995; 21:104.

48. - Lee M. Pathogenicity of Blastocystis hominis. Journal of Clinical Microbiology. 1993 (29): 2089.

49.- Puthia, M. K., J. Lu, And K. S. Tan. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-κβ-dependent manner. Eukaryot. Cell. 2008. 7:435–443.

50.- Sajid, M., And J. H. Mckerrow. Cysteine proteases of parasitic organisms. Mol. Biochem. Parasitol. 2002. 120:1–21.

51.- Reyes L, Leon R. Diferenciación de *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amibiasis intestinal. 2002. Rev. Costarricense de Ciencias Médicas. 2002. 23: 3-4

52.- Tan, K. S. *Blastocystis* spp. *In* N. A. Khan (ed.), Emerging protozoan pathogens. 2008. Taylor and Francis, Oxford, United Kingdom.

53.- Walderich, B., S. Bernauer, M. Renner, J. Knobloch, And G. D. Burchard. Cytopathic effects of *Blastocystis hominis* on Chinese hamster ovary (CHO) and adeno carcinoma HT29 cell cultures. Trop. Med. Int. Health.1998. 3:385–390.

54.- Long, H. Y., A. Handschack, W. Ko¨Nig, Ambrosch A. *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. Parasitol. Res. 2001. 87:1029–1030.

55.- Barahona L, Maguiña C, Náquira C, et al. Blastocystosis Humana: estudio Prospectivo, sintomatología y factores epidemiológicos asociados. Rev. Gastroenterol Perú, 2003; 23: 29-35.

56. - Garavelli P,Orsi P, Scaglione L. Blastocystis hominis infection during AIDS. Lancet 1995; (2): 1364.

57.- Micheloud D, Jensen J, Fernandez E, Carbone J. Angioedema crónico e infección por Blastocystis hominis. Rev.Gastroenterol. Perú. 2007; 191-193.

58.- Yakoob J, Jafri W, Jafri N, et al. Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of Blastocystis hominis. Am J Trop Med Hyg 2004; 70: 383.

59. - Guglielmetti P, Cellesi C, Figura N, Rossolini A. Family outbreak of Blastocystis hominis associated Gastroenteritis. Lancet 1989; 2:1394.

60. - Sheehan Dj, Raucher Bg, et, al. Association of Blastocystis hominis with signs and symptoms of human disease. J Clin Microbiology. 1986; 24:548.

61. - Albrecht H, Stellbrink Hj, Koperski K, Greten H. Blastocystis hominis in human immunodeficiency virus-related diarrhea. Scand J Gastroenterol 1995; 30:909.

62. -Ok Uz, Cirit M, Uner A, et al. Blastocystosis and Cryptosporidiosis in renal transplant recipients. Nephron. 1997; 75:171.

63. – Devera R, Blanco Y, Requena I, Velázquez V. Diagnóstico de Blastocystis hominis: bajo rendimiento de los métodos de concentración de formol-éter y sedimentación espontánea. Rev. Biomed 2006; 231-233

64. - Suresh K, Smith H. Comparison of methods for detecting Blastocystis hominis. Eur J Clin Microbial Infect Dis 2004; 23:509.

65. – Zerpa R, Huicho L. Tinta china modificada para la detección de formas encapsuladas de Blastocystosis hominis. Revista Mexicana de Patología Clínica. 1999; 46(3): 184-186.

66. - Boeck, W. C., And J. Drbohlav. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. Am. J. Hyg. 1925. 5**:**371–407.

67.- Jones, W. R. The experimental infection of rats with *Entamoeba histolytica*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 1946. 40:130.

68. - Tan K, Ng G, Queck E, Howe J, Ramachandran N, et al. Blastocystis hominis: a simplified, high-efficiency method for clonal growth on solid agar. Experimental Parasitology. 2000; (96): 9-15.

69. - Clark C, Diamond L. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. Clinical Microbiology Reviews. 2002 (15): 329-341.

70. - Zierdt Ch, Zierdt Ws, Nagy B. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to Blastocystis hominis in symptomatic infections. J Parasitol 1995; 81:127.

71. - Haldane D. The role of Blastocystis hominis in enteric disease. The Nova Scotia Medical Journal 1991; (67): 33-34.

72. - Garavelli P. The therapy of Blastocystosis. J Chemother. 1993; 3:245-6.

73. - Yakoob J, Jafri W, Jafri N, Islam M, Asim Beg M. In vitro susceptibility of Blastocystis hominis isolated from patients with irritable bowel syndrome. Br J Biomed Sci 2004; 61:75-7.

74. - Moghadam D, Ghadirian E, Azami M. *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazol and thrimethoprim/sulfamethoxazole. Parasitol Res 2005; 96:273-5.

75. - Haresh K, Suresh K, Khairul Anuar A, Saminathan S. Isolate resistance of Blastocystis hominis to metronidazole. Tropical Medicine and International Health. 2000; (4): 274-277.

76. - Barrios E, Cruz N, Jiménez J. Acción del Secnidazol 1`(Hidroxil 2-Propil) 2 Metil-5-Nitro Imidazol sobre el *Blastocystis hominis* en ratas infectadas en su medio ambiente: estudio preliminar. 1998.

77. - Nigro L, Larocca L, Massarelli L, Patamia I, Minniti S, et al. A placebo-controlled treatment trial of *Blastocystis hominis* infection with metronidazole. J Travel Med 2003; 10:128-30.

78.- Zaman, V., And M. Zaki.. Resistance of *Blastocystis hominis* cysts to metronidazole. Trop. Med. Int. Health. 1996. 1:677–678.

79. – Galindo P, Chacón N, Wagner C, et. al. Blastocystis hominis en pacientes tratados con Unidazol (Secnidazol). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2008; 28: 66-71.

80.- Ertug S, Dost T, Eartabaklar H. et. al. The effect of trimethoprim/sulfamethoxazole in Blastocystis hominis infection. Turkey. 2006; 35 (6): 739-742.

81. – Rossignol J, Kabil S, Said M, et al. Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with Blastocystis hominis. Clin Gastroenterol Hepatol 2005; 3:987.

82.- Valsecchi, R., P. Leghissa, And V. Greco. Cutaneous lesions in *Blastocystis hominis* infection. Acta Derm. Venereol. 2004. 84:322–323.

83.- Pasqui, A. L., E. Savini, M. Saletti, C. Guzzo, L. Puccetti, And A. Auteri. Chronic urticaria and *Blastocystis hominis* infection: a case report. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2004. 8:117–120.

84.- Kaya S, Cetin E, Aridogan B, Arikan S, et al. Pathogenicity of Blastocystis hominis a clinical reevaluation. Turkey. 2007; 31 (3): 184-187.

85. – Leelayoova S. et al. Evidence of Waterborne Transmission of Blastocystis hominis. J Trop Med Hyg 70(6), 2004; pp. 658–662

86. – Cardenas M, Martinez R. Protozoarios parásitos de importancia en salud pública transportados por mosca domestica linnaeus en Lima, Perú. Rev. Perú Biol (2004)11(2):149-153.

87. - World Health Organization. Intestinal Parasites: Control strategies. Tomado de: [http://www.who.int./ctd/intpara/strategies.html], Consultado: 20 de Junio del 2010.

88. – Murray, Rosenthal, Pfaüer. Microbiología Médica. 5ta Edición. Editorial Elsevier, 2004, Capítulo 31: 323-330.

89. - Figueroa P. Enterobacteriaceae, Vibrio, Campylobacter y Helicobacter. Carolina E.U.A. 2006; Capítulo 11.

90. - Mims, Playfair, Roitt, Wakelin, Williams. Microbiología Médica. 2da Edición. Editorial Harcout,2003, Capítulo 20: 253-260.

91.- Winsor D, Cleary T. E. coli, Aeromonas y Plesiomonas. En: Behrman RE, Nelson. Tratado de Pediatría. 15 ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interam 1996; 995-8.

92.- Tannock G.W. Normal Microflora. London: Chapman and Hall; 1995.

93.- Fernández R, Rodríguez C, Rodríguez I, et. al. Escherichia coli como causa de diarrea infantil. Rev. Cubana de Pediatría. 2003, 75, (3).

94. -Gutiérrez-Cázarez Z, Qadri F, Albert M, Giron J. Identification of enterotoxigenic Escherichia coli harboring longus type IV pilus gene by DNA amplification. J Clin Microbiol 2000; 38:1767-1771.

95.- Rodríguez G. A. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud Publica Mex 2002; 44:464-475.

96.- Vidal J, Canizález A, Gutiérrez J, Navarro F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. Salud Publica Mex 2007; 49:376-386.

97.- Nougayrede J, Fernández P, Donnenberg M. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. Cell Microbial 2003;5(6):359-372.

98.- Rico-Martínez M. Biología molecular en la patogenia de Shigella sp y Escherichia coli enteroinvasiva. Rev. Latinoam Microbiol 1995;37:367-385.

99. - Sethabutr O, Venkatesan M, Yam-Pang Lw, Smoak Bl, et. al. Detection of PCR products of the ipaH gene from Shigella and enteroinvasive Escherichia coli by enzyme linked immunosorbent assay. Diagn. Microbiol Infect Dis 2000; 37:11-16

100.- Margall N, Domínguez A, Prats G, Salleras L, et, al. Escherichia coli Enterohemorrágica. Rev. Españ. de Salud Pública. 1997, 71(5).

101. - Kobayashi M, Sasaki T, Saito N, Tamura K, Suzuki K,et al. Houseflies: Not simple mechanical vector of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. Am J Trop Med Hyg 1999;61:625-629.

102. - Schmidt H, Beutin L. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of Escherichia coli O157:H7 strain 933. Infect Immun. 1995;63:1055-1063.

103.- Nataro J, Deng Y, Maneval D, German A, Martin Wc, et,al. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative Escherichia coli mediate adherence to Hep-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. Infects Immun. 1992; 60:2297-2304.

104.- Villaseca J, Navarro-García F, Mendoza G, Nataro J, et al. Pet toxin form enteroaggregative Escherichia coli produces cellular damage associated with disruption. Infect and Immun**.** 2000; 68: 5920-5927.

105. Gemany Y, Begand E, Duval P, Le Bouguenec C. Prevalence of enteropathogenic, enteroaggregattive, and diffusely adherent E. coli among isolates from children with diarrhea in New Caledomia. J Infect Dis 1996;174(5):1124-6.

106.- Poitrineau P, Forestier C, Meyer M, Jallat C, Rich C, et al. Retrospective case-control study of diffusely adhering Escherichia coli and clinical features in children with diarrhea. Journal Clin Microbial. 1995 ; 33:1961-1962.

107.- Eslava C, Mateo J, Cravioto A. Cepas de Escherichia coli relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Secretaria de Salud. México, 1994: 251.

108. - Nataro J, Kaper J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998; 11(1)**:**142-201.

109.- Tarr P. Escherichia coli O157:H7 clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection. Clin Infect Dis 1995; 20:1-10.

110.- Rodríguez G. Exotoxinas. En: Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. México, Secretaría de Salud, 1994:369.

111.- Giono S, Rodríguez-Angeles G, Rodríguez Mj, et al. Identificación de enterotoxinas y citotoxinas de E. coli por cultivo de células Vero e hibridación en fase sólida (Colony blot). Rev. Latinoam Microbiol. 1994; 36: 231-241.

112.- Begum D, Strockbine N, Sowerr E.. Evaluation of a technique for identification of Shiga-like toxin-producing Escherichia coli by using polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled probes. J Clin Microbial. 1993; 31:3153-3156.

113.- Tenover Fc. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. Clin Microbiol Revs 1988;1:82-101.

114.- Arbeit Rd, Arthur M, Dunnr, Kim C, Selander Rk, Goldstein R. Resolution of recent evolutionary divergence among Escherichia coli from related lineages: The application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. J Infect Dis 161:230-235.

115.- Rodríguez G, Rodríguez Mj, Giono S, Gómez M. Identificación de cepas de Escherichia coli productoras de toxina termolábil (LT) en células Vero y colony blot. Memorias del V Congreso Nacional de Investigación en Salud Pública. II Congreso regional de la Asociación Internacional de Epidemiología 1994:106.

116.- Rodríguez G, Rincón M, Cortés-Tenorio L, Moreno A. Escherichia coli causante de diarrea en México, identificada por hibridación en fase sólida colony blot. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, 2001. 21 supl: S116.

117.- Ballmer K, Korczak Bm, Kuhnert P, Slickers P, Ehricht R, Hachler H. Fast DNA serotyping of *Escherichia coli* by use of an oligonucleotide microarray. J Clin Microbiol 2007; 45(2)**:**370-379.

118.- Devera R, Angulo V, Amaro E, Finali M, Franceschui G, Blanco Y, Tedesco Rm, Requena I, Velasquez V. Parasitosis intestinales en habitantes de una comunidad rural del estado bolívar Venezuela Rev. Biomed 2006; 17:259-268.

119. - Cermeño J, Hernández I, Maryerick K, Medina N, et. al. Etiología de diarrea aguda en niños menores de 5 años en Ciudad Bolívar, Venezuela. Revista de la Sociedad Venezuela de Microbiología. 2008; 28: 55-60.

120.- Rincón W, Acurero E, Serrano E. Enteroparásitos asociados a diarrea aguda en niños menores de 12 años de edad. Kasmera 2006; 34(1):31-39.

121.- Pajuelo C.G, Lujan R.D Paredes P.B Estudio de enteroparásitos en hospital de emergencias pediátricas, Lima Perú. Rev. Med hered v. 2005; 16 (3):178-183.

122.- Soriano S, Manacorda A, Pierangeli N, Navarro M, Giayetto A, Barbieri L, Lazzarini L, Minvielle M, Grenovero M , Basualdo J. Parasitosis intestinales y su relación con factores socioeconómicos y condiciones de hábitat en niños de Neuquén, Patagonia, Argentina. Parasitol Latinoam 2005, 60: 154 – 161

123.- Rodríguez E, Mateos B, González C, Aguilar Y, Alarcón E, et. al. Transición parasitaria a Blastocystis hominis en niños de la zona centro del estado de Guerrero, México. Revista de Parasitología Latinoamericana. 2008; 63: 20-28.

124. -Kaya S, Cetin E, Aridogan B, et. al. Pathogenicity of Blastocystis hominis, a clinical revaluation. Turkiye, Parazitol Derg. 2007; 31 (3): 184-187.

125. - Bratt D, Tikasingh E. Blastocystis hominis in two children of one family. West Indian Med J. 1990; 39 (1): 57-58.

126. - Qadri S, Okaji G, Dayel F. Clinical significance of Blastocystis hominis. Hospital Rey Faisal Specialist and Center on Investigation, Saudi Arabia.2005

127.- Magdi K, Elham A. Pathogenicity of Blastocystis hominis in relation to enteropathogens in gastroenteritis, cases in Baghdad. European Journal of Scientific Research. 2009, 25 (4): 606-613.

128. - Qiao J, Zhang X, Wei Z, et, al. Study on the biological characteristic of Blastocystis hominis: morphology, mode of reproduction and the relation to bacteria. Key Laboratory of Environment and Genes Related to Diseases, Ministery of Education, Xi' an Jiaotong University, Xi'an 710061, China.

129. - Cimerman S, Ladeira Mc, Luliano W. *Blastocystosis*: nitazoxanide as a new therapeutic option. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(3):415-7.

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

131.- Ertuğ S, Dost T, Ertabaklar H, Gültekin B. The effect of Trimethoprim-Sulfamethoxazole in Blastocystis hominis infection. Turkey. 2006; 35(6):739-42.

132. - Guzmán C, Vethencourt M, Galindo M, Chacón N, Wagner C. Comportamiento biológico de *Blastocystis sp* en pacientes tratados con Secnidazol. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología; 2008; 28:66-71

133. - Nimri F, Maqdam M. Enteropathogens associated with cases of gastroenteritis in a rural population in Jordan. Clin Microbial Infect. 2004; 10: 634-639

134.- Devera R, Amaya I, Blanco Y, Montes A, Muñoz M. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en estudiantes de la Unidad Educativa Bolivariana Alejandro Otero "Los Alacranes", San Félix, Estado Bolívar. Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. 2009. Artículos vitae: 1-9.

135.- Aguiar, J. I., A. Q. Goncalves, F. C. Sodre, R. Pereira Sdos, M. N. Boia, E. R. De Lemos, And R. R. Daher. Intestinal protozoa and helminthes among Terena Indians in the State of Mato Grosso do Sul: high prevalence of *Blastocystis hominis*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2007. 40:631–634.

136.- Hirata, T., H. Nakamura, N. Kinjo, A. Hokama, F. Kinjo, N. Yamane, J. Fujita. Prevalence of *Blastocystis hominis* and *Strongyloides stercoralis* infection in Okinawa, Japan. Parasitol . 2007. Res. **101:**1717–1719

137.- Saovanee L, Suradej S, Umaporn T, Tawee N, Paanjit T, Phunlerd P, Mathirut M. Water: A Possible Source of *Blastocystis* spp. Subtype 1 Infection in Schoolchildren of a Rural Community in Central Thailand. *J. Trop. Med. Hyg.,* 2008. 79(3): 401–406

138.- Traviezo L, Triolo M, Agobian G. Predominio de *Blastocystis hominis* sobre otros enteroparásitos en pacientes del municipio Palavecino, estado Lara, Venezuela**.** REV CUBANA MED TROP 2006; 58(1):14-8

139. - Graczyk T, Shiff C, Tamang L, Munsaka F, Beitin A, Moss W. The association of Blastocystis hominis and Endolimax nana with diarrheal stools in Zambian school-age children. Baltimore USA. 2005. 98: 38-43

140.- Diagnóstico de Laboratorio de Infecciones Gastrointestinales. Publicación Técnica del INDRE número 22. UNIDAD IV: Diagnóstico Parasitológico. 1994

141.- Normalización de La Metodología de Diagnóstico Parasitológico. Laboratorio de Investigación en Microbiología y Parasitología Hospital Infantil de Morelia "Eva Sámano de López Mateos" 2000.

ANEXOS.

ANEXO I.

INDICACIONES PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

A) PACIENTES FORÁNEOS

1. Se requieren dos muestras con conservador (formol) y una fresca
2. Para las muestras con conservador se debe colocar un pedazo de excremento del tamaño de una nuez en el frasco con formol.
3. Homogenizar perfectamente con ayuda del abatelenguas hasta dejar una consistencia de un atole espeso.
4. Repetir el procedimiento hasta completar 2 muestras (de días diferentes).
5. Para la recolección de la muestra fresca colocar un pedazo de excremento del tamaño de una nuez en un frasco limpio con tapadera. Remitir al laboratorio antes de 24 horas de haber sido colectada. Las muestras pueden ser obtenidas a cualquier hora del día, no deben de extraerse de la taza de baño. No es necesario el ayuno.
6. Las muestras se reciben de 7:30 a 10:00am de lunes a viernes y los resultados se anexan al expediente a las 14:00 horas.
7. Si las muestras se entregan después de las 10:00 am los resultados se anexan al expediente al día hábil siguiente a las 14:00 horas.

B) PACIENTES LOCALES

1. Colocar un pedazo de excremento del tamaño de una nuez en un frasco limpio con tapadera.
2. La muestra no debe extraerse de la taza del baño.
3. Remitir al laboratorio antes de 1hora de haber sido colectada. 2 muestras deben contar con menos de 24 horas y una de menos de hora. Las muestras pueden ser obtenidas a cualquier hora del día. No es necesario el ayuno.
4. Repetir el procedimiento hasta completar 3 muestras.
5. Las muestras se reciben de 7:30 a 10:00am de lunes a viernes y los resultados se anexan al expediente a las 14:00 horas el día que entregue la última muestra.

ANEXO 2:
TÉCNICAS COPROPARASITOSCÓPICAS.

A) EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO EN FRESCO.

La técnica más sencilla y simple para el análisis de las muestras fecales es el examen en fresco, particularmente cuando son diarreicas. La muestra puede tomarse directamente de la materia fecal o de muestras concentradas. Los reactivos más usados son la solución salina isotónica (SSI), el lugol y el azul de metileno amortiguado (AMA).

La observación en fresco con SSI se usa para el examen inicial microscópico de las heces y se emplea para buscar los huevos y larvas de los gusanos, trofozoitos y quistes de protozoarios. El examen en fresco con lugol se usa para teñir el glucógeno y el núcleo de los quistes, por lo que si éstos están presentes pueden identificarse específicamente con este método. El examen directo en fresco con AMA, debe efectuarse cada vez que se observen trofozoitos de amiba en la preparación en fresco con SSI o cuando se sospeche la presencia de éstos. El AMA tiñe trofozoitos de amibas pero no tiñe los quistes, ni trofozoitos o quistes de flagelados. El AMA es apropiado solo para muestras que estén frescas no debe usarse en muestras preservadas en donde los organismos han muerto [140, 141].

Material:

- ✓ Aplicadores de madera
- ✓ Portaobjetos de 26X76 mm
- ✓ Cubreobjetos de 22X22
- ✓ Solución salina isotónica
- ✓ Lugol
- ✓ Solución de azul de metileno amortiguado (AMA)
- ✓ Solución 1:1 de parafina y vaselina
- ✓ Microscopio

Procedimiento:

1. Colocar por separado en cada extremo de un portaobjetos una gota de solución salina isotónica y otra de lugol.
2. Con el aplicador, tomar una muestra representativa de heces (muestras con moco y sangre elegir la parte que contiene para estudiarla).

3. Mezclar con la solución salina isotónica, procurando hacer una suspensión y no un frote.
4. Quitar de la suspensión fibras y otros fragmentos sólidos.
5. Colocar el cubreobjetos. Sellar con la solución de vaselina-parafina 1:1. Observar con objetivo 10X.
6. Repetir esta operación en la preparación con lugol. Las muestras teñidas con lugol se utilizan para examinar quistes de amibas, flagelados, ciliados y/o huevos de helmintos, etc. Aunque los quistes se pueden detectar con objetivo de 10X, siempre debe utilizarse el objetivo de mediano poder de resolución (40X) para examinar las características de los quistes, los cuales además deben medirse para asegurar su identificación.
7. Se deben ver perfectamente los elementos en la preparación sin que se dificulte la observación por exceso de detritus.
8. Examinar en el microscopio con objetivos de 10X y 40X.
9. En caso de observar trofozoítos de amiba en la muestra con SSI, colocar una gota de AMA en el portaobjetos y mezclar la materia fecal.
10. El AMA se usará sólo si se observan trofozoítos de amiba en SSI [140, 141].

B) MÉTODO DE FAUST.

Este es posiblemente el método más empleado en el mundo, y aunque no es muy efectivo en materias fecales ricas en grasas como algunos otros métodos de flotación, no concentra muy bien los huevos pesados de la mayoría de los trematodos. Tiene el mérito especial de ser accesible para la mayoría de los laboratorios, además de ser útil para la búsqueda simultánea de protozoarios y helmintos.

Material:

- ✓ Tubos de ensaye sin labios de 13X100 mm.
- ✓ Solución de sulfato de zinc, con peso específico de 1.180.
- ✓ Vasos o frascos de vidrio (250 ml).
- ✓ Gasa cortada en cuadros de 10 cm.
- ✓ Malla de alambre (de mosquitero) en cuadros de 12 cm.
- ✓ Asa de alambre, terminada en círculo de 5-6 mm de diámetro.
- ✓ Portaobjetos desengrasados de 26X76 mm.
- ✓ Cubreobjetos de 22X22 mm.
- ✓ Embudos.
- ✓ Abatelenguas.

- ✓ Solución parafina-vaselina 1:1
- ✓ Centrífuga con camisa para tubos Wasserman, que alcance cuando menos 2,500 rpm.
- ✓ Microscopio.
- ✓ Gradilla.

Procedimiento:

1. Hacer una suspensión homogénea con uno o dos gramos de materia fecal y 10 ml de agua de la llave.
2. Filtrar a través de la gasa colocada en el embudo y colectar la suspensión recibiéndola directamente en el tubo.
3. Centrifugar los tubos así preparados, a 2000-2500 rpm durante 1 minuto.
4. Decantar el sobrenadaste y resuspender el sedimento con agua, agitando con un aplicador.
5. Centrifugar nuevamente y volver a decantar el sobrenadante. Esta operación se repite hasta que el sobrenadante quede claro.
6. Agregar 2 a 3 ml de solución de sulfato de zinc a los tubos y homogeneizar perfectamente. luego llenar los tubos hasta 0.5 a 1 cm por abajo de los bordes.
7. Centrifugar a 2000 rpm durante 1 minuto. Detener la centrífuga sin freno.
8. Recoger con el asa limpia o flameada, la película superficial que se encuentra en el menisco del tubo durante 2 a 3 ocasiones sucesivas y depositarla en un portaobjetos.
9. Colocar 2 gotas de lugol parasitológico sobre la preparación y homogeneizar con el ángulo de un cubreobjetos y cubrir la preparación. Sellar la laminilla.
10. Observar al microscopio con objetivos de 10X y 40X [140, 141].

C) MÉTODO DE RITCHIE.

Es un examen CPS semejante al de Barthelemy (1917) y quizás es uno de los más referidos en la literatura científica, debido a que se toma como prototipo para comparar otros métodos. Es una técnica de concentración que demuestra la presencia de huevos, quistes y larvas, no importa la densidad que tengan. Con el éter que emplea, elimina muchos detritus orgánicos y con el formol, usando como fijador, se mantiene la integridad de las formas parasitarias. Sin embargo, es costoso porque utiliza varios reactivos, las preparaciones quedan muy sucias ya que la sedimentación aparte de concentrar a las formas parasitarias, también concentra contaminantes.

Material:

- ✓ Solución salina isotónica.
- ✓ Formol al 10%
- ✓ Éter sulfúrico comercial.
- ✓ Tubos cónicos para centrífuga de 15 ml.
- ✓ Gasa cortada en cuadros de 8 cm.
- ✓ Vasos de precipitados de 100 ml.
- ✓ Abatelenguas.
- ✓ Lugol.
- ✓ Pipetas Pasteur de 20 cm de longitud.
- ✓ Bulbos de goma.
- ✓ Portaobjetos de 38X76 mm.
- ✓ Cubreobjetos de 22X22 mm.
- ✓ Solución de parafina-vaselina 1:1.
- ✓ Microscopio.

Procedimiento:

1. Colocar por medio de un abatelenguas, aproximadamente 1 g de materia fecal en el vaso de precipitados, agregar 10 ml de solución salina, homogenizar.
2. Filtrar la suspensión a través de la gasa, recibir en otro vaso, pasar el filtrado al tubo de centrífuga.
3. Centrifugar durante 1 minuto a 2000 rpm. Desechar el sobrenadante.
4. Repetir el paso 3 las veces que sea necesario (generalmente 2 a 3) con el fin de obtener un sedimento más limpio.
5. Agregar 10 ml de formol al 10% y dejar en reposo la suspensión aproximadamente 10 minutos (fijación).
6. Agregar 5 ml de éter, tapar el tubo y agitar vigorosamente durante 30 segundos.
7. Centrifugar durante 1 minuto a 1500 rpm. Se observan cuatro capas: 1) éter, 2) restos fecales, 3) formol y 4) sedimentos.
8. Pasar una pipeta Pasteur a través de las capas 1, 2 y 3. Extraer con cuidado el sedimento.
9. Colocar una gota del sedimento sobre un portaobjetos, agregar una gota de lugol, y cubrir con una laminilla. Sellar.
10. Observar con el microscopio a seco débil [140, 141].

D) TINCIÓN DE KINYOUN.

1. Cubrir la preparación (previamente fijada) con fucsina durante 3 minutos. Evitar que la preparación se seque.
2. Enjuagar suavemente con agua de la llave.
3. Decolorar con ácido sulfúrico al 10% por 5 segundos.
4. Enjuagar nuevamente con agua de la llave.
5. Poner el colorante de contraste (verde brillante al 1%) por 30 segundos.
6. Lavar con agua y dejar secar, colocando el portaobjetos en posición vertical.
7. Observar a inmersión [140, 141].

E) TINCIÓN TRICRÓMICA.

Es un método rápido que da buenos resultados en los estudios ordinarios. Es sencillo, pues no es necesario sobreteñir y luego aclarar para que resalten los detalles morfológicos de los parásitos. Tampoco hace falta el mordiente antes de la tinción. Pero para fines prácticos, el aclaramiento de los frotis da mejores resultados, y es preferible incluirlo. La solución colorante es estable y puede utilizarse varias veces, sustituyendo el volumen perdido por la solución madre. Sin embargo, si se tiñen más de 15 frotis al día (en 50 ml), el colorante tiende a perder su fuerza. Si la solución colorante se evapora dejándola destapada durante 3 a 8 horas, recobra las cualidades perdidas. Esto puede lograrse quitando la tapa de la caja de tinción durante la noche. La principal diferencia entre la tinción de materias frescas y fijadas con PVA es que éstas necesitan más tiempo, omitiéndose además la fijación, pues la solución PVA ya realizó esta función.

Técnica de tinción con muestras frescas:

1. Fijador de Schaudinn
   5 minutos a 50·C, 1 hora a temperatura ambiente
2. Alcohol al 70% con yodo (1 minuto).
3. Alcohol al 70% (1 minuto).
4. Alcohol al 70% (1 minuto).
5. Colorante tricrómico (2 a 8 minutos).
6. Alcohol al 90% acidificado (10 a 20 segundos, o hasta que el frotis ya casi no pierda colorante).
7. Alcohol al 95% (Enjuagar dos veces).
8. Carbol Xilol (1 minuto).

9. Xilol (1 minuto).
10. Se monta con un cubreobjetos, empleando Permount u otro medio semejante.

Preparación de Reactivos:

- *Fijador de Schaudinn modificado*:

Cristales de cloruro de mercurio	4.5 g
Alcohol etílico 95%	31 ml
Acido acético glacial	5 ml

Disolver el cloruro de mercurio en el alcohol en un frasco con tapón agitando a intervalos, añadir el ácido acético, tapar el frasco y mezclar por agitación; conservarlo hasta que sea necesario.

- *Colorante tricrómico:*

Cromotropo 2R	0.6 g
Verde claro SF	0.15 g
Verde rápido FCF	0.15 g
Acido fosfotúngstico	0.7 g
Acido acético glacial	0.95 ml
Agua destilada	100 ml

Carbol – Xilol:

Fenol líquido	1 parte
Xilol	3 parte [140, 141].

F) MEDICIÓN MICROSCÓPICA DE PARÁSITOS Y SUS PRODUCTOS.

La medición de los parásitos y sus productos es un recurso valioso para precisar el tamaño de los huevos y de los parásitos en sus estadios de su evolución y permite una mejor diferenciación de ellos y un adecuado diagnóstico. Se puede realizar con un micrómetro ocular u ocular micrométrico y el micrómetro objetivo [140,141].

Principio: Los micrómetros oculares están grabados con una escala fija que consiste en 50 líneas paralelas. Cada división del micrómetro ocular representa diferentes medidas según el poder de resolución del juego de objetivos utilizados en un microscopio compuesto, por lo tanto para cada juego de oculares y objetivos utilizados, la escala ocular se debe comparar con una escala calibrada conocida. Es importante recordar que una vez efectuada la calibración con un determinado juego de oculares y objetivos, éstos no pueden ser intercambiables con los componentes correspondientes de otro microscopio.

Coeficiente micrométrico: Es una cifra que expresa la equivalencia en µm de una división de la escala del micrómetro ocular al emplear cada objetivo del microscopio. Suele denominarse "factor" y la operación para obtenerlo "calibración del microscopio". El coeficiente micrométrico es inversamente proporcional al poder de amplificación de los objetivos utilizados. Habitualmente se obtienen tres coeficientes micrométricos para cada microscopio usando un solo ocular micrométrico y los objetivos 10X y 45x (seco débil y seco fuerte) y de 90X ó 100X (de inmersión), pero puede hacerse cualquier combinación de ocular y objetivo. Para obtener el coeficiente micrométrico hay que seguir la siguiente técnica [140,141].

Materiales:

- ✓ Micrómetro ocular de escala fija. Es un pequeño disco de vidrio de 12 mm de diámetro, en el cual puede verse grabada una escala de 5 mm, dividida en 50 partes y generalmente numerada de 10 en 10. Este disco se coloca sobre el diafragma de cualquier ocular, transformándolo así en ocular micrométrico. Cada división de esta escala mide 100 µm.

- ✓ Ocular micrométrico de platina con divisiones de 0.1 y 0.01mm. Es esencialmente similar al micrómetro ocular, pero la lente va montada sobre un corto tubo que puede acortarse o alargarse a voluntad por deslizamiento en el tubo externo, permitiendo así enfocar con toda precisión la escala micrométrica intercalada entre él.

- ✓ Micrómetro objetivo: Es un portaobjetos en cuyo centro se halla grabada una escala de 1 ó 2 mm, dividida en 100 ó 200 partes; cada división mide 10 µm.

- ✓ Microscopio compuesto estándar.

Procedimiento:

1.- Retirar el ocular del microscopio. Si se utiliza un microscopio binocular, se acostumbra a retirar el ocular X10 derecho.

2.- Desenroscar la lente superior del ocular e insertar la oblea del micrómetro de modo que se apoye en el anillo del diafragma dentro del ocular. Colocar el micrómetro con el lado grabado hacia abajo. El micrómetro se manipula con paño para lentes y se debe evitar por todos los medios que algún hilo quede adherido a la superficie.

3.- Reinsertar el ocular. Al observar a través del ocular, la escala del micrómetro aparece como una serie de divisiones alineadas.

4.- Colocar el micrómetro de platina bajo el objetivo del microscopio que se ha de calibrar. Enfocar la escala del micrómetro de platina que se ve como una serie de divisiones de 0.1 y 0.01 mm.

5.- Ajustar el micrómetro de platina de modo que la línea “0” de la escala del micrómetro ocular se superponga exactamente con la línea “0” de la escala del micrómetro de platina.

6.- Sin efectuar ninguna otra manipulación, observar ambas escalas y hallar el próximo par de líneas que coincidan exactamente. Con un aumento de 450 X, las líneas coincidentes son la marca 40 de la escala ocular y la marca de 0.09 mm de la escala del micrómetro de la platina.

Cálculos:

El objeto de la calibración es determinar cuánto mide en µm cada división de la escala ocular cuando se calibra contra la escala del micrómetro objetivo. Por lo tanto, 40 unidades de la escala del ocular equivalen a 0.09 mm de la escala del micrómetro de platina y cada división del ocular es igual a 0.09 mm/40, o sea 0.00225 mm. Dado que hay 1000 µm en cada milímetro, cada división del micrómetro es igual a 0.00225 X 1000, o sea 2.25 µm.

ANEXO III.

COPROCULTIVO.

El estudio de la materia fecal para el aislamiento e identificación de bacterias productoras de diarrea se denomina coprocultivo y es de apoyo para el diagnóstico clínico. Hasta hace pocos años, la proporción de los resultados positivos de este análisis era de 10-20%, aún en las mejores condiciones del laboratorio. Este porcentaje aumenta si se incluyen en la búsqueda a todos los agentes ahora reconocidos, lo que implica usar varios medios de cultivos selectivos y diferenciales [140,141].

Las muestras fecales se recogen al inicio del cuadro clínico, antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano y directamente en un frasco limpio de boca ancha y con tapa hermética, de preferencia estéril. Si se va a procesar en un hospital no es necesario usar medio de transporte y hay que sembrar de inmediato. En estudios de campo o cuando el laboratorio no está cercano, se toman dos hisopos rectales bien impregnados con materia fecal que se colocan en un medio de transporte como el Cary-Blair, cuando en el diagnóstico se incluye cólera y otros agentes. Se utiliza el medio de transporte Stuart-Amies cuando van a transcurrir más de dos horas para procesarlo, aunque no está determinado que sirva para conservar *Vibrio*. Se han diseñado medios de transporte especiales para *Campylobacter*.

Si la materia fecal es líquida puede recolectarse en un frasco o bolsa y si es sólida o semisólida con un hisopo estéril, se recoge una pequeña cantidad de una evacuación espontánea reciente, seleccionando las partes mucosas o sanguinolentas.

✓ NORMAS GENERALES PARA LA APLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO:

1.- El coprocultivo será prescrito en ciertas situaciones: en caso de diarrea hemorrágica o mucoso-sangrienta (síndrome disentérico), en presencia de signos clínicos de gravedad (deshidratación, síndrome septicémico, fiebre) en pacientes debilitados o inmunodeprimidos, en caso de toxiinfección alimentaria colectiva.
2.- Las muestras de heces solo se recibirán si vienen acompañadas de su solicitud de estudio.
3.- Las muestras solo se aceptaran con un tiempo máximo 2 hrs de haberse recolectado.
4.- Si vienen en un medio de transporte se aceptaran con un tiempo máximo de 24 hrs de haberse recolectado.
5.- Si trae tratamiento el paciente solo se recibirá a reserva de que el paciente siga con el padecimiento diarreico.

6.- La hora de recepción de nuestra será de 7.30 am y 7.30 pm

7.- Los resultados se entregaran a las 48 hrs de haber entregado la muestra, si se necesita el antibiograma se tardaran otras 24 hrs.

- **AISLAMIENTO.**

Para el aislamiento se utilizan medios diferenciales y selectivos como: Agar MacConkey, (MC), Agar Eosina Azul de Metileno (EMB), Agar Salmonella Shigella (SS), Agar verde brillante (BG). Las placas se incuban a 37ºC durante 18 a 24 horas y se observan colonias.

- **IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE ESPECIES.**

La clasificación de las enterobacterias está basada en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético del cromosoma bacteriano. Los sustratos sobre los cuales estas enzimas pueden actuar se incorporan al medio de cultivo. Junto con un sistema indicador que pueden detectar ya sea la declinación del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos. Las pruebas bioquímicas más utilizadas para su identificación son: TSI (Triple Azúcar y Hierro), LIA, MIO (Movilidad, Indol y Ornitina), Citrato, Malonato y Urea.

Procedimiento:

1.- Colocar 1 gota de yodo-lugol y 1 de verde brillante a un tubo con caldo tetrationato.

2.- Con un hisopo, agregar una pequeña cantidad de materia fecal al caldo tetrationato.

3.- Sembrar la materia fecal en 1 placa de MacConkey y 1 de EMB.

4.- Incubar el caldo Tetrationato y las placas inoculadas por 24 horas a 37°c.

5.- Al término de la incubación; revisar la presencia de colonias bacterianas en placas de MacConkey y EMB y sembrar 1 gota de la suspensión de caldo tetrationato en placas de cultivo de Verde Brillante y Salmonella-Shigella.

6.- Realizar pruebas Bioquímicas si se observan colonias patógenas o sospechosas en placas de MacConkey o EMB.

7.-Después del periodo de incubación en placas de Verde Brillante y Salmonella-Shigella observar la presencia de colonias bacterianas sospechosas y realizar pruebas Bioquímicas de las mismas.

8.- Realizar pruebas de Sensibilidad a antibióticos.

9.- Reportar el microorganismo causante de la infección gastrointestinal y el resultado del antibiograma para la erradicación de la misma.

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *Escherichia coli.*

PRUEBA BIOQUÍMICA	% DE POSITIVIDAD.
Ácido de Glucosa	100 %
Nitrato a nitrito	100 %
Rojo de Metilo	99 %
Fermentación de L-arabinosa	99 %
Prueba de Indol	98 %
Fermentación de D-manitol	98 %
Fermentación de Trealosa	98 %
Fermentación de D-manosa	98 %
Gas de Glucosa	95 %
Movilidad a 36 ° c	95 %
Fermentación de Lactosa	95 %
Fermentación de D-xilosa	95 %
Fermentación de maltosa	95 %
Fermentación de mucato	95 %
Fermentación de D-sorbitol	94 %
Lisina Descarboxilasa	90 %
Fermentación de Glicerol	75 %
Ornitina Descarboxilasa	65 %
Fermentación de la Sacarosa	50%
Citrato de Simmons	1 %
H_2S (TSI)	1 %
Hidrólisis de la Urea	1 %
Voges-Proskauer	0 %
Malonato	0 %