

Laboratorio de Microbiología y Parasitología



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**“ESTUDIO GENÉTICO DE LOS SUBTIPOS DE *BLASTOCYSTIS* EN NIÑOS  
QUE ACUDEN AL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA**

**PRESENTA:**

**MERLE YURIDIA LÓPEZ PÉREZ**

**BAJO LA ASESORÍA DE:**

**QFB GUADALUPE ERÉNDIRA OROZCO MOSQUEDA**

**CO-ASESOR:**

**DC JOSÈ PABLO MARAVILLA CAMPILLO**

**MORELIA MICHOACÁN**

**MARZO 2015**

### DEDICATORIA

Primeramente a Dios, porque alguien me dijo que si estudie Química debería de cuestionarme más cosas, el porqué de las cosas. A lo cual digo, por él es que llegué hasta donde ahora estoy y con él puedo responder mejor esas preguntas.

A mi Familia, los Pérez por mostrarme esa lucha, fuerza y constancia, a los López por no dejarme caer en adversidades.

A Mis Padres, mi papá Alfonso por darme ese ejemplo de buen humor y positivismo que me acompañó en mis más tristes y desesperadas situaciones. Mi mamá Carmen por apoyarme, sacrificarse por mi para salir adelante y así lograrlo por mi misma, a ti la que soy hoy.

A Mis Hermanos, a Mariela por servirme como primer ejemplo y con el tiempo llevarnos de lo mejor, gracias por esas pláticas constructivas. A Gabriela por comprenderme y darme ánimos en los días que sentía desvanecer, por tu compañía y amor. A mi hermano+ por cederme su lugar en la vida, mejor regalo no pude tener.

### AGRADECIMIENTOS

A mi tutora de tesis, Química Eréndira muchísimas gracias por creer en mi, por permitirme ser parte de este proyecto, por compartir todo su conocimiento conmigo, por darme la oportunidad de desenvolverme en otros ámbitos. Por su consejo, por mostrarme una y otra vez su coproteca y demás técnicas que realizamos juntas. Eternamente gracias.

Al DC Pablo Maravilla, gracias por su apoyo y por brindarme las herramientas necesarias, así también al DC Fernando, DC Guiehdani, DC Arony y a todos los Doctores del laboratorio por su hospitalidad. A Rodo, Nancy y como olvidar al QFB Eduardo López, muchas gracias por tu tiempo, ayuda y el compartir tu conocimiento conmigo.

Agradezco al proyecto de CONACYT No. 182089 por el apoyo en la realización de los ensayos moleculares y de secuenciación.

A mis sinodales por otorgarme su tiempo y en sus correcciones brindarme su conocimiento.

Anahí, Ale prima, Bianka y Diana, mejor unión y amor en ustedes no puede encontrar. Las llevo en mi corazón por siempre.

Yanin, la primer persona que conocí en esta etapa y a la que nunca imaginé, pudiera compartir tantas semejanzas, como esta total confianza, te quiero mucho.

A todos mis compañeros de clase, la mejor época... interdecimos, mejor unión no se pudo hacer. ¡Ganamos fútbol chicas!.

A mis compañeros de laboratorio, ese espacio en el almuerzo, ese espacio de aprendizaje, ese espacio de diversión, ese espacio en el recuerdo. Sandy y Lupis, que lindas personas, encantada de haber compartido con ustedes este gran proceso. Gracias por los ánimos y esas largas pláticas.

A la Química Ceci muchas gracias por ser tan cálida, por hablarme, escucharme, Q. Lupita más bien dicho mi mamá, gracias por las porras, sus abrazos y su tierna sonrisa para conmigo, Q. Nena en mi opinión un ejemplo a seguir por tan atenta y sincera, gracias, Q. Arge usted es un vivo ejemplo de que los cambios para bien se pueden lograr, gracias por mostrarme eso, Q. Kari gracias por ofrecerme su ayuda si lo necesitaba cuando éramos vecinas, por ser tan buena onda y carismática, Q. Lolita gracias por el buen ejemplo entre trabajo y vivir feliz, Q. Lulú gracias por las recomendaciones, por sacarme de dudas y por ser mi ejemplo de superación, Q. Brenda gracias por ser tan amable y mostrarme esa cara de alegría y sencillez ante la vida.

Y en sí a todos los que en mi carrera me dieron ánimos. GRACIAS.

## RESUMEN

*Blastocystis sp* es el parásito intestinal mayormente reportado en la actualidad, tanto en países en desarrollo como en desarrollados <sup>(1-4)</sup>, cuyo papel patógeno es altamente controvertido, asociándolo con los 17 subtipos conocidos, la mayoría de los cuales son zoonóticos.<sup>(5)</sup> Este un estudio de tipo abierto, observacional y prospectivo, que forma parte de un proyecto a nivel nacional.

Se incluyeron muestras de excremento de niños remitidos del Servicio de Consulta Externa mayores de un año, a quienes se les aplicó una encuesta para conocer las manifestaciones clínicas y hábitos higiénicos, previo consentimiento escrito por parte de los padres.

A las muestras se les realizó coproparasitoscópico en serie (CPS) con examen directo en fresco, concentración por sedimentación (F-E) y por flotación (Sacarosa) así como coprocultivo, preservándolas posteriormente en alcohol al 70% y refrigeración a 4 C hasta la extracción de ADN (Qiagen). Se sometieron a reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final diagnóstica para *Blastocystis* (Utilizando Primers de Santin e ITS); a continuación se llevó a cabo la purificación (AxyPrep-96 PCR Clean-up) y cuantificación para la secuenciación y determinación de subtipo (genotipo) consultando los datos del GenBank.

Se estudiaron 113 muestras, de las cuales el 86.7 % dieron positivas a *Blastocystis* con PCR, 80.4% con Primers Santin, 71.7% con ITS y 84.8% en ambos. De las 52 muestras secuenciadas el 50% corresponde al subtipo 1, el 25% al subtipo 2, el 23.08% al subtipo 3 y el 1.92% al subtipo 7.

Los subtipos 3 y 7 no estuvieron relacionados con ningún síntoma, el subtipo 1 se asoció con estreñimiento ( $p < 0.05$ , gl 1) y el subtipo 2 se asoció con diarrea ( $p < 0.05$ , gl 1). Para el subtipo 1 el factor de riesgo mayormente asociado fue el defecar en el suelo (RR 2.6), material de la casa austero (RR 2.4) y el no lavarse las manos antes de comer (RR 2.3); para el subtipo 2 el convivir con animales (RR 8), antecedente de arrojar lombrices (RR 5.4) y tomar agua de la llave (RR 3); para el subtipo 3 el comer alimentos en la calle (RR 2.3), material de la casa austero (RR 2.2) y tomar agua de la llave (RR 2). El subtipo 7 no se asoció con ningún factor de riesgo.

**PALABRAS CLAVE:** Parásito, Blastocystis, Subito, Intestinal.

## ABSTRACT

*Blastocystis sp* is the intestinal parasite mostly reported today, in both developing and developed countries (1-4), whose pathogenic role is highly controversial, associating it with the 17 known subtypes, most of which are zoonotic. (5 ) This study type open, observational, prospective, part of a nationwide project.

Stool specimens from children referred Outpatient Service older than one year, to whom it was applied a survey to know the clinical and hygienic habits prior written consent of the parents were included.

The samples underwent serial coproparasitoscopic (CPS) with direct examination of fresh, concentration by sedimentation (FE) and float (Sucrose) and stool culture, then preserving them in alcohol 70% and refrigerated at 4 C until extraction DNA (Qiagen). They underwent chain reaction (PCR) diagnostic endpoint for Blastocystis (Using Primers Santin and STIs); then held purification (AxyPrep-PCR Clean-up 96) and quantification for sequencing and determination of subtype (genotype) at GenBank data.

113 samples were studied, of which 86.7% were positive for *Blastocystis* with PCR, with primers Santin 80.4%, 71.7% and 84.8% STI both. Of the 52 sequenced samples corresponds to 50% subtype 1, subtype 25% 2, the subtype 3 23.08% 1.92% and 7 subtype.

Subtypes 3 and 7 were not associated with any symptoms, the subtype 1 was associated with constipation (p 0.05, df 1) and subtype 2 was associated with diarrhea (p 0.05, df 1).

For the subtype 1 risk factor was mostly associated defecate on the floor (RR 2.6), material austere house (RR 2.4) and not washing hands before eating (RR 2.3); for subtype 2 on live animals (RR 8), history of throwing worms (RR 5.4) and take tap water (RR 3); for subtype 3 eating street food (RR 2.3), material austere house (RR 2.2) and take tap water (RR 2). The subtype 7 is not associated with any risk factor.

**KEYWORDS:** Parasitic, Blastocystis, subtype, intestinal.

ÍNDICE

**Contenido**

Dedicatoria _____	2
Agradecimientos _____	3
Resumen _____	4
I.    Introducción _____	6
II.   Antecedentes _____	7
III.  Planteamiento del problema _____	17
IV.  Justificación _____	18
V.   Hipótesis _____	19
VI.  Objetivos _____	19
VI.I.  Objetivo general _____	19
VI.II. Objetivo específico _____	19
VII.  Material y Métodos _____	20
VIII. Resultados _____	22
IX.  Discusión _____	26
X.   Conclusión _____	27
XI.  Recomendaciones _____	27
XII. Referencias _____	28
XIII. Anexos _____	36

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias intestinales constituyen una de las infecciones más comunes a nivel mundial, especialmente en países en vías en desarrollo. Se estima que unas 3.500 millones de personas están afectadas por estas infecciones y que 450 millones manifiestan enfermedad, siendo la mayoría niños.<sup>(6)</sup> En poblaciones urbanas y periurbanas, la presencia, persistencia y diseminación de parásitos intestinales se relacionan con las condiciones de saneamiento básico disponible. La contaminación del suelo, el agua y alimentos con materia fecal, las deficientes condiciones de vida, la falta de adecuados hábitos higiénicos y un bajo nivel de instrucción son factores que favorecen la infección parasitaria.<sup>(7)</sup>

La mayoría de las infecciones por enteroparásitos son producidas por protozoarios y en menor proporción por helmintos.<sup>(8)</sup> Los protozoos intestinales no parecen restringirse a condiciones climáticas, grupos socioeconómicos ni áreas geográficas.<sup>(9)</sup>

Durante un largo periodo, *Giardia lamblia* era el parásito intestinal mas frecuentemente reportado en niños,<sup>(10)</sup> pero en los últimos años *Blastocystis* lo ha desplazado, teniendo frecuencias del 27% hasta 60% en países en vías de desarrollo y de 1.6 a 16% en países desarrollados.<sup>(11-13)</sup>

*Blastocystis* es un parasito muy controvertido, con un gran polimorfismo morfológico, se han descrito diversos ciclos de vida y atribuciones de virulencia que no han sido aclarados.<sup>(14)</sup> Varios estudios experimentales incluyendo trabajos en modelos animales y cultivos celulares han sido interpretados a favor de un rol patogénico.<sup>(13,15)</sup>

Las características clínicas con las que se han asociado a *Blastocystis* no son específicas, quizás la manifestación clínica más asociada sea el síndrome de colon irritable, seguido de diarrea.<sup>(16)</sup>

Hasta el año 2010 se conocían 10 subtipos de *Blastocystis*, de los cuales 7 son zoonóticos.<sup>(17)</sup> Hoy en día se tienen reportados 17 subtipos y se cree que pueden encontrarse más.<sup>(18)</sup>

## II. ANTECEDENTES

### HISTORIA

Las primeras descripciones con imágenes posiblemente compatibles con el microorganismo que posteriormente sería llamado *Blastocystis*, fueron hechas por Brittan<sup>(19)</sup> y Swayne<sup>(6)</sup> quienes estudiaron y escribieron abundantemente sobre la epidemia de cólera en Londres durante 1849, llamándolo “cuerpos del cólera” o “células anulares” considerándolo causante de la epidemia. Sin embargo, esta información no es suficiente para atribuirles el descubrimiento del parásito.<sup>(20)</sup>

La primera descripción cumpliendo criterios de nomenclatura 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.<sup>(21)</sup>

En 1912, Brumpt estudiando solo material humano presentó una breve descripción del germen al que llamó “*Blastocystis hominis*”, presentándolo como una levadura intestinal inocua importante por su posibilidad de ser confundida con *E. histolytica*.<sup>(22)</sup> Dicha descripción y el término acuñado ganó prestancia rápidamente, siendo reconocido este nombre en la literatura hasta fecha reciente.<sup>(23)</sup> Luego de varios reportes del microorganismo en heces humanas durante las primeras décadas del siglo XX, sugiriendo patogenicidad especialmente en regiones tropicales, poco fue publicado hasta 1967, en que el trabajo de Zierdt y Cols, renovó el interés por el parásito presentando evidencia para clasificar a “*Blastocystis hominis*” como un Protozooario (sub clasificación del reino Protista que incluye a la mayoría de parásitos humanos, amibas, flagelados, ciliados entre otros).<sup>(24)</sup>

“*Blastocystis hominis*” sufrió múltiples reclasificaciones, mostrándose fuera y dentro de diferentes ramas del árbol de la vida,<sup>(25)</sup> sin embargo Silberman y Cols, 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. Subreino Chromobiota, Infrareino Heterokonta ratificado por estudios de SSrRNA.<sup>(26,27)</sup>

En un consenso realizado en 2007 se sugirió reemplazar el término *Blastocystis hominis* por la de *Blastocystis sp* seguido del subtipo correspondiente.<sup>(4,28)</sup>

### EPIDEMIOLOGIA

En varios estudios basados en el análisis genético de *Blastocystis*, se mostraron diferentes subtipos, esto se plasmó en una publicación de consenso en 2007,<sup>(28)</sup> donde se sugirió reportar al parásito como *Blastocystis sp* seguido de la indicación del subtipo de 1 a 9.<sup>(4)</sup>

Un estudio en 1996 informó una prevalencia de *Blastocystis* del 70% en perros de refugios en Brisbane Australia; en estudios recientes, junto con muestras de Camboya e India, mostraron que perros y gatos de pacientes sintomáticos infectados por *Blastocystis*, albergan al menos un subtipo en común con el paciente y se sugiere que existe una variación geográfica en la prevalencia. Los resultados arrojan, que los

perros no son huéspedes naturales de *Blastocystis*, sino que son oportunistas infectados con una diversidad en subtipos. <sup>(29)</sup>

Hasta la fecha, han sido reportados 17 genotipos de muestras pertenecientes a diferentes hospederos. <sup>(18, 30-37)</sup>

Sobre lo documentado, el Subtipo 5 y 8 son poco comunes en los seres humanos, esto puede ser debido a la especificidad y/o el rango restringido geográficamente aparente de algunos subtipos. <sup>(38)</sup> El subtipo 1 se asocia a varios mamíferos y aves, el subtipo 2 está asociado a primates y cerdos, el subtipo 3 es el genotipo más frecuentemente hallado en humanos, el subtipo 4 se asocia a roedores, el subtipo 5 está relacionado con el ganado vacuno y con cerdos, los subtipos 6 y 7 son frecuentemente aislados de aves; los subtipos 8 y 9 están estrechamente vinculados con los subtipos 4 y 6, respectivamente. <sup>(30-36)</sup>

La infección se puede dar a través de las transmisiones de humano a humano, zoonóticas y transmitidas por el agua, por ello las recomendaciones para asegurar buenas prácticas de salud pública, como el lavado de manos regular y cuidadoso manejo de materiales contaminados con heces. <sup>(39)</sup>

Hasta ahora, se ha reportado la predominación del subtipo 1 y 3 en África subsahariana (Liberia, Nigeria y Tanzania), mientras subtipo 2 y 4 son mucho menos comunes y sobre otros subtipos en los seres humanos en estas regiones, no hay observaciones. Mientras que en muchos países europeos, son bastante comunes el subtipo 4 y 7. <sup>(40)</sup>

Los subtipos 1, 2 y 3 son los encontrados en humanos del continente americano (EE.UU., Colombia y Brasil). Por otra parte el subtipo 1 parece ser el más común en los Estados Unidos, mientras que subtipo 3 es el más común en la mayoría de regiones de América del sur. El subtipo 2 tiene una prevalencia mucho mayor en ciertas regiones de América; cabe señalar que los datos estadounidenses sólo representan el 3% del total de América (Figura 1). <sup>(40,41)</sup>

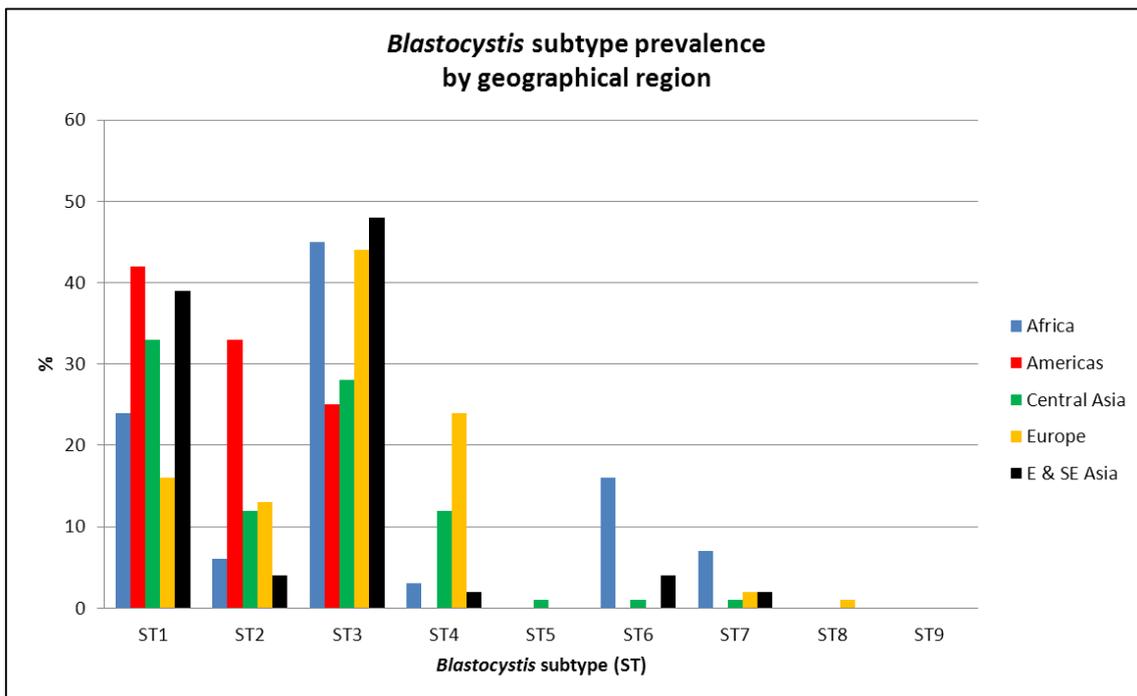


Fig. 1. Distribución Geográfica de los Subtipos de *Blastocystis* a nivel mundial. Tomado de: <http://www.blastocystis.net/2013/01/where-are-we-on-blastocystis-subtypes.html>.

La recopilación de estudios sobre la distribución geográfica de los subtipos de *Blastocystis sp*, podría dar una interpretación del parásito en su papel en la infección humana, pero esto resulta ser inconcluso por los estudios esporádicos y escasos que se han reportado. (42)

En la Tabla 1 se muestra una recopilación en estudios de diversos países, conforme a la subtificación en muestras positivas a *Blastocystis* y tomadas de diferentes hospederos. (43,44)

País	Hospedero	Subtipo
Bangladesh	Humano	1 y 3
China	Humano	1,2,3,4,7, >9
Dinamarca	Humano	1,2,3,4
Egipto	Humano	1,3,6,7
Alemania	Humano	1,2,3,4, >9
Grecia	Humano	1,2,3,4,6,7
Japon	Humano	1,2,3,4,6,7,9,>9
Pakistan	Humano	1,3,6
Singapur	Humano	1,3
Turquia	Humano	1,2,3,7, >9
Tailandia	Humano	1,3,7, >9
Peru	Humano	1,2,3,4,6,7,8,9,>10
Perú	Primates	1,2,3,4,5,8,10, >10

Perú	Cerdos	1,2,3,5
Perú	Ganado	1,3,5,10
Perú	Caballo, Perro	1,2,3,10
Perú	Marsupial, Roedor	4
Perú	Pajaro	1,2,6,7,8 ,>10
Japon	Mono	1,5,
Japon	Cerdos	1,6
Japon	Ganado	1,3,6
Japon	Pollo	1,4
Japon	Codorniz	2,4
Japon	Perdiz	4
Japon	Rata	7
Japon	Ganzo	2
Japon	Faisán	3
Francia	Pato	2
Francia	Pavo	4
Nueva Guinea	Cerdos	3,7

Tabla 1. Distribución de los Subtipos de *Blastocystis*.

Esto demuestra la baja especificidad entre parásito y hospedero; que ciertos subtipos no son exclusivos de una especie o área geográfica. <sup>(17)</sup>

#### CICLO DE VIDA

Ciertos conceptos sobre el ciclo de vida de *Blastocystis* han sido equivocados, por lo que todavía se están siguiendo estudios para dar una descripción establecida sobre el ciclo (Fig. 2). Las últimas revisiones pretenden dar atención a las ideas erróneas y los hallazgos recientes en la taxonomía, la biología y la virulencia de este microorganismo. <sup>(25)</sup>

Laboratorio de Microbiología y Parasitología

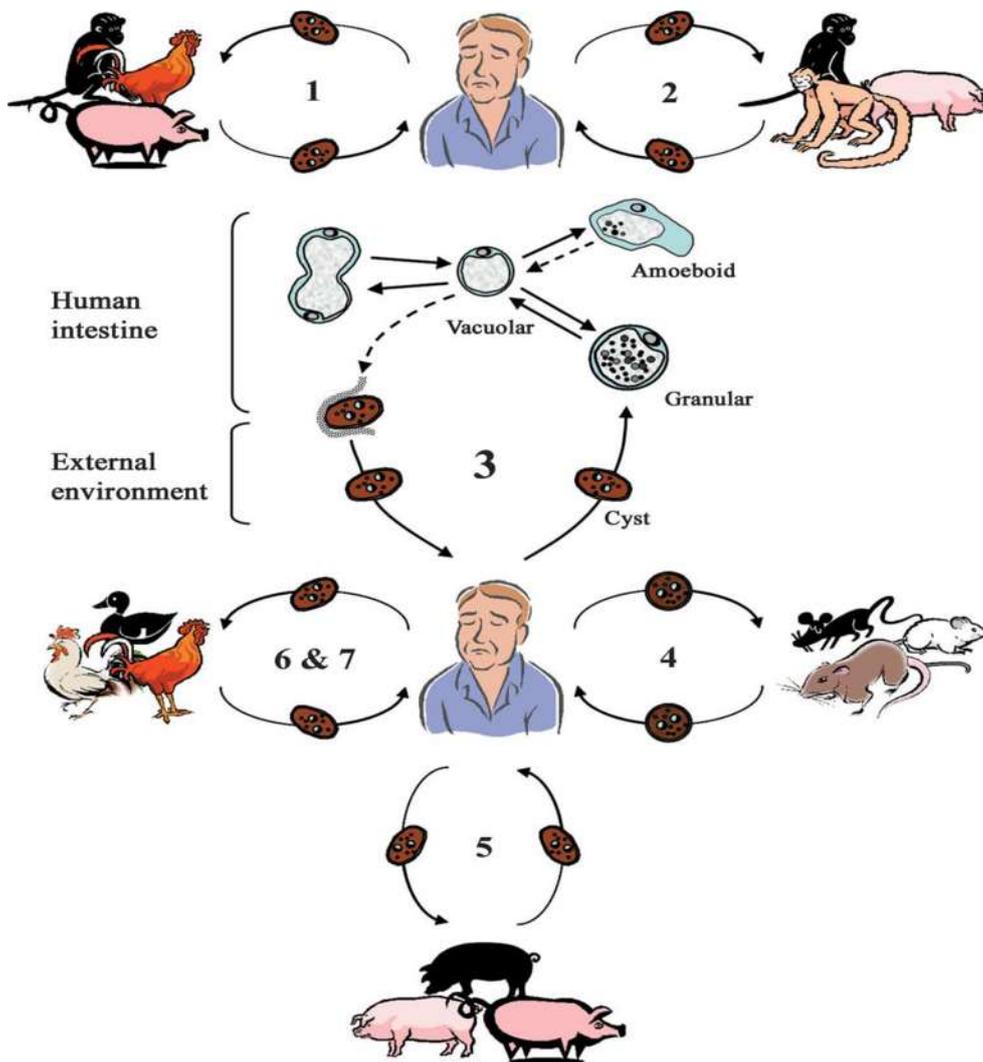


Fig. 2. Ciclo de vida *Blastocystis sp.*

Tomado de: Tan K S. New Insights on Classification, Identification and Clinical Relevance of *Blastocystis Sp.* Clin Microbiol Rev 2008; 21: 639-65.

### MORFOLOGÍA

Este protista unicelular es un organismo polimórfico con varias formas, tales como vacuolar (o cuerpo central), anular (también llamada avacuolar), granular, amebiana, esquizonte, multivacuolar y la forma de quiste. Sin embargo, podría existir en otras formas.<sup>(25)</sup>

La forma vacuolar también referida como la forma de cuerpo o vacuola central varía enormemente en su tamaño de 2 a 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, presenta una gran vacuola que ocupa hasta 90% del volumen celular, teniendo aparentemente una función de "almacén", por ello en el citoplasma periférico se encuentran de uno a dos núcleos, orgánulos tipo mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico.<sup>(45)</sup> (Fig. 3).

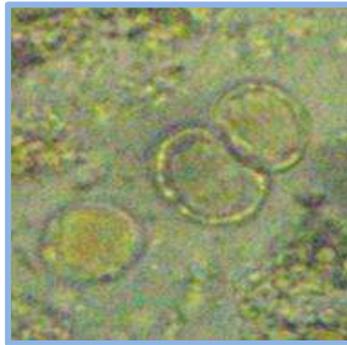


Fig. 3. Forma vacuolar de *Blastocystis* y vacuolar en división.

La forma anular es aquella que no posee una vacuola en su interior, por lo que también se le conoce como avacuolar (Fig. 4).



Fig. 4. Forma anular de *Blastocystis*.

La forma granular comparte muchas similitudes con la vacuolar excepto que ésta presenta numerosos gránulos (mitocondrias) en el citoplasma periférico e inclusive dentro de la vacuola central.<sup>(46)</sup> (Fig. 5)



Fig. 5. Forma granular de *Blastocystis*.

La forma amebiana rara vez se encuentra en muestras fecales y en cultivo, siendo su descripción morfológica motivo de conflicto y confusión en los reportes y se ha sugerido que es una forma intermedia entre la vacuolar y la quística que ingiere

bacterias para obtener los requerimientos suficientes para su enquistamiento, aunque esta hipótesis se encuentra en debate.<sup>(46,47)</sup> (Fig. 6).



Fig. 6. Forma amebiana de *Blastocystis*.

La forma esquizogónica es la formación de células hijas dentro de un esquizonte. <sup>(48)</sup> (Fig. 7) .

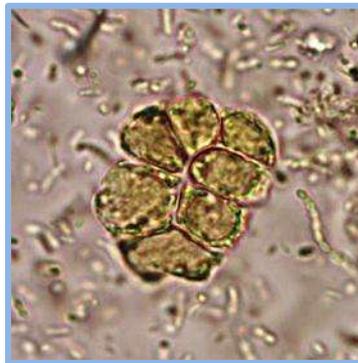
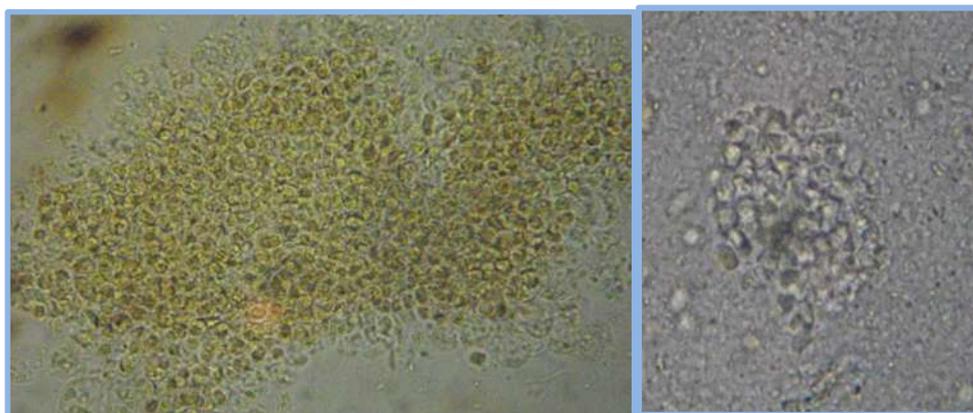


Fig. 7 Forma en esquizonte de *Blastocystis sp.*

**Tomado de:** <http://www.blastocystis.net/2013/01/where-are-we-on-blastocystis-subtypes.html>



Figs. 8 y 9. Formas en esquizonte de *Blastocystis sp.*

La forma multivacuolar presenta la vacuola dividida en varios fragmentos (Fig. 10).

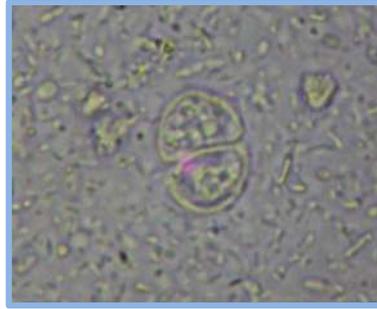
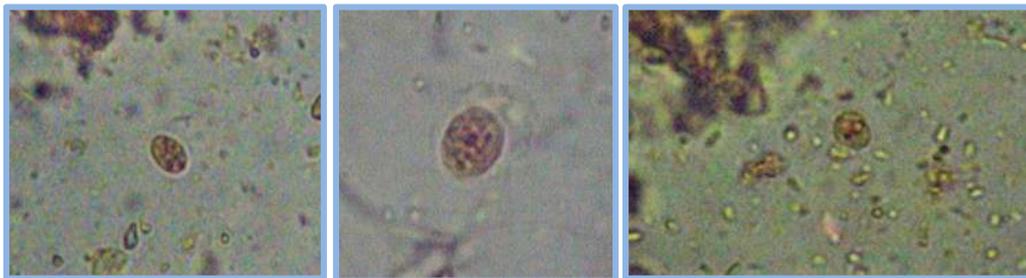


Fig. 10. Forma multivacuolar de *Blastocystis* sp.

La forma quística fue descrita y confirmada entre 1988 y 1999, ya que son fácilmente confundidos con detritus fecal, son esféricos u ovales y están protegidos por dos capas fibrosas, contienen de 1 a 4 núcleos, vacuolas, depósitos de lípidos y glucógeno. <sup>(49-50)</sup> Estos quistes miden 15µm de diámetro pero presentan enormes diferencias en el tamaño cuando provienen de diferentes especies animales. <sup>(51)</sup> (Figs. 11 -13).



Figs. 11-13. Formas de quistes de *Blastocystis* sp.

### **PATOGENICIDAD**

Observaciones por microscopía hacen la referencia que el hallazgo de más de cinco formas de *Blastocystis* por campo, acompañados por signos clínicos de enfermedad intestinal y en ausencia de otros agentes etiológicos, implicarían una acción patógena de este parásito. <sup>(52)</sup>

Actualmente se cree que la gran variabilidad genética de *Blastocystis* sería causante de los distintos resultados en investigaciones respecto de su rol patógeno; como resultado, la búsqueda de relación entre manifestaciones clínicas y los subtipos de *Blastocystis* se ha convertido en una de las principales líneas de investigación en parasitología. <sup>(53,54)</sup>

Un estudio reciente de 5 subtipos diferentes de *Blastocystis* en Malasia, demostró que podría facilitar la proliferación de células de cáncer de colon, al ser el subtipo 3 expuesto en dichas células, se obtuvo una proliferación estadísticamente significativa, a comparación de los otros 4 subtipos estudiados. <sup>(55)</sup>

Hay pocos reportes clínicos que demuestran una relación directa entre la presencia de este parásito con la enfermedad del síndrome de intestino irritable y pocos modelos animales para explorar esta relación. <sup>(56)</sup>

Por su diversidad genética muy compleja en diferentes organismos, hace que sea difícil el concretar un cuadro de patogenidad y esto sumado al hecho que la toma de muestras para su estudio hasta la fecha, ha sido limitada. <sup>(57)</sup> Aun así, continúan los esfuerzos para explorar la relación entre el estado de salud de las personas y los subtipos, no hay un consenso que trate sobre la metodología de tipificación acuñada a cierta especie en particular. <sup>(58)</sup>

## SINTOMATOLOGÍA

*Blastocystis* causa muchos síntomas gastrointestinales no específicos, por lo que la patogenidad de los diferentes subtipos no está clara hoy en día, manteniéndose como tema controversial. <sup>(55)</sup> Por lo que, en ocasiones es considerado como un comensal y en otras como patógeno, por encontrarse en pacientes sintomáticos y asintomáticos. <sup>(59)</sup>

El subtipo 1 ha sido relacionado con síntomas en Iran y Libia. <sup>(60,61)</sup> y el subtipo 4 se asocia cada vez más a enfermedad intestinal en Dinamarca. <sup>(62)</sup>

Este parásito fue asociado a ciertos síntomas en estudios realizados en Colombia, tales como: dolor abdominal, estreñimiento, diarrea, flatulencia y síndrome del intestino irritable. <sup>(63)</sup>

En un estudio de 74 casos de *Blastocystis*, de personas ambulatorias en Perú, obtuvieron una correlación estadística ( $p < 0,05$ ) entre las personas sintomáticas y la presencia del parásito del 91,9%. La sintomatología asociada por orden de significancia estadística fue: dolor abdominal, plenitud abdominal y urticaria, resultando como único factor de riesgo asociado el consumo de agua sin hervir. <sup>(64)</sup>

## DIAGNOSTICO

La detección de *Blastocystis sp* en muestras fecales humanas se realiza a menudo con microscopía directa y cultivos, o bien, con pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual hay primers específicos para *Blastocystis* que se utilizan para amplificar un fragmento genómico de la subunidad pequeña ribosómica de ADN (SSUrDNA). El fragmento de ADN amplificado se clona en un plásmido y se secuencian usando los cebadores específicos de plásmido. La secuencia de ADN obtenida se analiza utilizando BLAST y un árbol filogenético construido usando el software MEGA. <sup>(65,66)</sup>

Este tipo de estudio ha sido realizado en muestras de Colombia y Nepal, dando por resultados una buena identificación tanto del parásito como en su genotipificación. <sup>(67,68)</sup>

Recientemente se han desarrollado métodos para estudiar la variación dentro del Subtipo, con implicaciones para nuestra comprensión de la especificidad del portador.

Un análisis de secuencias en Tailandia, reveló polimorfismos de nucleótido para *Blastocystis* subtipo 1, que fueron descritos como subtipo 1 variante 1, subtipo 1 variante 2, siendo *Blastocystis* subtipo 1 variante 1 la infección más predominante en este genotipo. <sup>(69)</sup>

Dentro del análisis por PCR se observa también la identificación de infecciones mixtas de subtipo, como es el caso de muestras positivas a *Blastocystis* en Irán, 2.64% de las infecciones mixtas tuvieron tres subtipos diferentes, estando el subtipo 1 predominando en dichas infecciones. <sup>(61)</sup>

Estas técnicas de PCR son caras, por lo son realizadas en laboratorios de investigación. <sup>(70)</sup>

La especificidad del método de frotis fecal directo en un estudio de 110 muestras en Filipinas fue del 97,3%, mientras que la PCR de las heces fue de 95,9%. <sup>(71)</sup>

## TRATAMIENTO

Varios fármacos han sido utilizados para tratar *Blastocystis* pero cada uno de ellos ha producido un porcentaje ampliamente variable de la curación clínica y la erradicación del parásito de las heces. Basado en los estudios llevados a cabo y las respuestas clínicas obtenidas en los pacientes, Metronidazol parece ser el fármaco más eficaz para *Blastocystis*. Sin embargo, el tratamiento se complica debido a las diferentes dosis, regímenes adoptados y la falta de respuesta al tratamiento observado en varios sectores de la población estudiada, como es el caso en pacientes inmunocomprometidos, en los que este y otros medicamentos contra *Blastocystis* son ineficaces. <sup>(40)</sup>

El hallazgo de diferentes subtipos de *Blastocystis*, exhiben resistencia a Metronidazol y se asocia con grados variables de síntomas, que ha puesto de relieve la importancia de identificar los subtipos del parásito, con el fin de predecir la respuesta clínica. <sup>(72)</sup>

El tratamiento con Metronidazol, suele ser apropiado y recomendado a individuos asintomáticos con pocos quistes de *Blastocystis*. Sin embargo, los que tienen signos gastrointestinales o dermatológicos y entre otros síntomas, con muchos quistes en la muestra fecal, pueden requerir un tratamiento más complejo. <sup>(56)</sup>

Los informes al fracaso del tratamiento con Metronidazol, sugiere la existencia de cepas resistentes a los medicamentos. En 2011, un estudio realizado in vitro con subtipos 4 y 7, sugeridos para representar los subtipos patógenos zoonóticos, en el cual se utilizaron 19 compuestos contra ambos subtipos, dando el subtipo 7 resistente a Metronidazol, mientras que el subtipo 4 fue sensible. Por el contrario, parásitos de subtipo 4 eran resistentes a emetina, mientras que los subtipo 7 sensibles. Encontrando eficaces contra ambos subtipos in vitro a nitazoxanida, furazolidona, mefloquina, quinina, cotrimoxazol (trimetoprima-sulfametoxazol) y iodoacetamida. Ambos subtipos eran resistentes a la cloroquina, doxiciclina, ampicilina y pirimetamina. Poniendo con este estudio la necesidad de reevaluar los regímenes de tratamiento establecido para las infecciones de *Blastocystis* y ofrecer nuevas opciones de tratamiento para los fracasos del tratamiento con Metronidazol. <sup>(73)</sup>

Un estudio realizado en Malasia utilizando cultivos de los subtipos 1- 4, tratados con Metronidazol, demostró que el subtipo 3 es el que muestra una mayor resistencia después de 72 horas en cultivo. Esto sugiere que existe un mecanismo en *Blastocystis sp*, que regula el proceso apoptótico para producir un mayor número de células viables cuando se tratan con Metronidazol. <sup>(74)</sup>

Otros fármacos como Trimetoprim-sulfametoxazol y Nitazoxanida, han sido evaluados para el tratamiento ya sea solo o en combinación, dando resultados favorables al combatir a *Blastocystis*. <sup>(72)</sup>

Una gran cantidad de interés se ha generado sobre el papel de los probióticos, en particular de *Saccharomyces boulardii* y otros compuestos de los alimentos naturales, en la erradicación del parásito. Esto ofrece una visión sobre las cuestiones relacionadas con la resistencia a los medicamentos, el fracaso del tratamiento, la reinfección, y los puntos de vista actuales sobre las modalidades de tratamiento.

Hasta la fecha, el modo de acción de los fármacos utilizados y el mecanismo de resistencia no es del todo conocido y es un tema de especulación. <sup>(72)</sup>

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe gran debate respecto a si *Blastocystis* es un comensal intestinal o un verdadero patógeno.<sup>(13)</sup> Su importancia radica por la frecuencia con la que es reportado en muestras de heces de individuos sintomáticos <sup>(21, 73-75)</sup> y asintomáticos.<sup>(76,77)</sup>

Durante mucho tiempo se le atribuyó a *Blastocystis* un comportamiento no patógeno o comensal, pero cada vez es mayor el número de informes que le asignan un carácter patógeno con una amplia variedad de signos y síntomas.

En la mayoría de los individuos; se cree que son portadores de un subtipo en particular de *Blastocystis*, <sup>(27)</sup> siendo los subtipos 1 y 3 los mayormente encontrados. Algunos autores sugieren que el subtipo 3 es exclusivo de humanos y el responsable de la sintomatología, por eso se sugiere que la patogenicidad podría estar relacionada con el subtipo y la carga parasitaria. <sup>(78)</sup>

Los análisis realizados sobre muestras de *Blastocystis* en América Latina son escasos, lo reportado es mayormente de especie animal, como es el caso de estudios en Brasil y Perú. En cuanto a México no se conocen estudios realizados con respecto a *Blastocystis*. <sup>(79)</sup>

Por lo que en este estudio se pretende identificar los subtipos de las muestras fecales positivas a *Blastocystis*, de los niños que acuden al hospital, mostrando la relación entre el subtipo y los síntomas presentes en el paciente, esto además, con el propósito de incluir los primeros datos en el país y específicamente en nuestro estado.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial los primeros 3 subtipos de *Blastocystis* son los más frecuentes y al realizar cada vez más investigaciones, se da el hallazgo de más subtipos, aunque no comparada con la prevalencia de estos primeros. <sup>(80)</sup>

En Egipto se estudiaron muestras de *Blastocystis* de pacientes sintomáticos para determinar su genotipo, siendo el 3 el más frecuente (61.9%), seguido del 1 (19.05%). <sup>(81)</sup>

En China se estudió la presencia del parásito en cuatro poblaciones, con frecuencias de 1.9 a 32.6%, la prevalencia fue más alta en adultos mayores de 60 años, 5 subtipos fueron identificados, de los cuales el 3 predominó, seguido del 1. <sup>(82)</sup>

En Taiwan, no se encontró asociación entre síntomas intestinales con la presencia de *Blastocystis*, <sup>(83)</sup> mientras que un estudio realizado en 100 individuos iraníes hubo infecciones mixtas de los subtipos 1 y 3 (14%) que fueron significativamente relacionados con síntomas gastrointestinales ( $p = 0.045$ ). <sup>(84)</sup>

Mientras que en Perú, *Blastocystis* aparece frecuentemente tanto en humanos como en animales, y aunque su patogenicidad continua siendo controversial, se reportan casos con sintomatología gastrointestinal. <sup>(85)</sup>

Estudios recientes apuntan a la probable infección de diferentes especies dependiendo del subtipo, por eso que se relacione al subtipo 3 como *B. hominis*. <sup>(86)</sup>

Si bien algunos estudios vinculan los síntomas gastrointestinales con los subtipos 1, 3 y 6, aún no se ha hallado una correlación concluyente entre el subtipo involucrado en la infección y las manifestaciones clínicas de los individuos infectados. <sup>(87,88)</sup>

En Tailandia se estudió la presencia de *Blastocystis* en el agua potable, el 77.9% pertenecía al subtipo 1 y el 22.1% al subtipo 2, demostrándose que los casos de parasitosis en los niños de la comunidad, estaban relacionados al consumo de agua. <sup>(89)</sup>

En un caso de urticaria aguda causada por *Blastocystis*, en un anciano agricultor de Estados Unidos, enfatiza la importancia del control de las heces en busca del parásito en pacientes con urticaria, cuando otros factores causales comunes de la misma se han descartado. <sup>(90)</sup>

Los factores de riesgo asociados con *Blastocystis* en una casa hogar en Tailandia, fueron la edad, estado nutricional y los niños que infectaron a los trabajadores de cuidado infantil. <sup>(91)</sup> Mientras que en Nepal el 81% de los infectados, su factor de riesgo fue el beber agua no hervida o filtrada. <sup>(68)</sup>

V. HIPÓTESIS

La patogenicidad de *Blastocystis* está asociada a los diferentes subtipos.

VI. OBJETIVOS

VI.I. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de *Blastocystis* y sus subtipos en niños que acuden al Hospital Infantil de Morelia, asociándolos a síntomas gastrointestinales.

VI.II. OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Evaluar la confiabilidad de un kit comercial para la extracción de ADN en muestras preservadas para el diagnóstico de *Blastocystis*.
2. Correlacionar los subtipos con las manifestaciones clínicas.
3. Enlistar los factores de riesgo asociados a los diferentes subtipos del parásito.

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo es parte de un proyecto a nivel nacional, autorizado por el CONACYT con la propuesta número 168619.

### Universo de estudio y muestra:

Todos los pacientes que presenten positividad a *Blastocystis sp* en estudios coproparasitológicos en serie remitidos del Servicio de Consulta Externa con o sin síntomas gastrointestinales, a quienes se les aplicó una encuesta para conocer las manifestaciones clínicas, previo consentimiento escrito por parte de los padres (Anexo 1).

### Tamaño de la muestra:

El tamaño de muestra para toda la República, se calculó considerando una frecuencia del 50% con cualquiera de los subtipos, un nivel de potencia de la prueba del 95% y un error del 10%, resultando un tamaño de muestra de 96 portadores de *Blastocystis* para cada región climática, dando un total de 384 muestras para todo el país.

Se estudiaron portadores de *Blastocystis* mayores de 1 año, de ambos sexos, diagnosticados mediante microscopia, con y sin alteraciones gastrointestinales, provenientes de las distintas regiones del estado de Michoacán.

Este es un estudio descriptivo, transversal, abierto, observacional y prospectivo.

A los niños se les proporcionó por escrito las indicaciones para tomar las muestras adecuadamente (Anexo 2), en el momento de recibirlas se les aplicó una encuesta para conocer los síntomas y factores de riesgo asociados (Anexo 3). Las muestras fueron procesadas por examen directo en fresco (Anexo 4), concentración por sedimentación (Anexo 5), por flotación con sacarosa (Anexo 6), micrometría (Anexo 7) y coprocultivo (Anexo 8).

Las muestras positivas a *Blastocystis* sin otros patógenos se preservaron en alcohol al 70% y refrigeración a 4 C hasta su procesamiento. Fueron sometidas a la extracción de ADN con un equipo comercial (Anexo 9), posteriormente se llevó a cabo una PCR diagnóstica para *Blastocystis* (Anexo 10), se purificó el ADN (Anexo 11) y se mandó secuenciar (Anexo 12).

### Criterios de inclusión:

Niños mayores de 1 año de ambos sexos remitidos del servicio de consulta externa con y sin síntomas gastrointestinales, a quienes se les solicitó examen coproparasitológico en serie de 3, que se les demostró la presencia de *Blastocystis*, sin otro patógeno asociado, que respondieron la encuesta previo consentimiento escrito de los padres.

### Criterios de exclusión:

Pacientes que:

- Tenían *Blastocystis* asociado a otro patógeno.
- No haya dado su consentimiento.

**Criterios de eliminación:**

Los pacientes que:

- Con datos incompletos

**Definición de variables y unidades de medida:**

Presencia y subtipo de *Blastocystis*, edad, sexo, síntomas.

**Fuentes, métodos, técnicas, y procedimiento de recolección de la información:**

Los datos se obtuvieron de las bitácoras de registro y tarjetas del Laboratorio de Investigación en Microbiología y Parasitología del Hospital Infantil de Morelia y del Hospital de especialidades Dr. Manuel Gea Gonzalez y procesados en hoja de cálculo Excel para realizar las determinaciones estadísticas.

**Plan de procesamiento y presentación de la información:**

Hoja de cálculo Excel, procesado de texto Word.

**Aspectos éticos:**

Riesgos previsible o probables: Riesgo superior al mínimo.

Los niños que participan en este estudio no corrieron ningún riesgo, ya que la unidad de estudios fueron las muestras fecales, por lo que de acuerdo con el Reglamento de Investigación en Salud, esta investigación fue sin riesgo y en los resultados se mantendrá la confidencialidad y anonimato de los pacientes. También este proyecto se apega a los principios éticos de la investigación científica postulados por la Asociación Médica Mundial a partir de la declaración de Helsinki.

Para el personal que procesa las muestras se tomaron las medidas preventivas a fin de evitar una eventual contagio, por lo que fue obligatorio el uso de bata, cubre bocas, guantes.

Debe resaltarse que durante este proyecto no se intervino en el tratamiento ni en la práctica clínica, quedando ambas bajo responsabilidad del médico tratante, enfocándose esta investigación a trabajar exclusivamente con el ADN de *Blastocystis*, obtenido de la materia fecal de portadores, que fueron procesadas para su diagnóstico microscópico.

Protección de pacientes frente al riesgo: Precaución estándar.

Archivo confidencial de investigación: Expedientes clínicos y bitácoras del Laboratorio de Investigación de Microbiología y Parasitología.

### VIII. RESULTADOS

Se incluyeron 113 muestras, de las cuales en el 56.6% de los casos *Blastocystis sp* se encontró como parásito único, en 0.9% asociado con algún parásito patógeno, 38.9% asociado a parásito comensal y en un 3.5% asociado con patógeno y comensal. (Fig. 14)

Total= 113

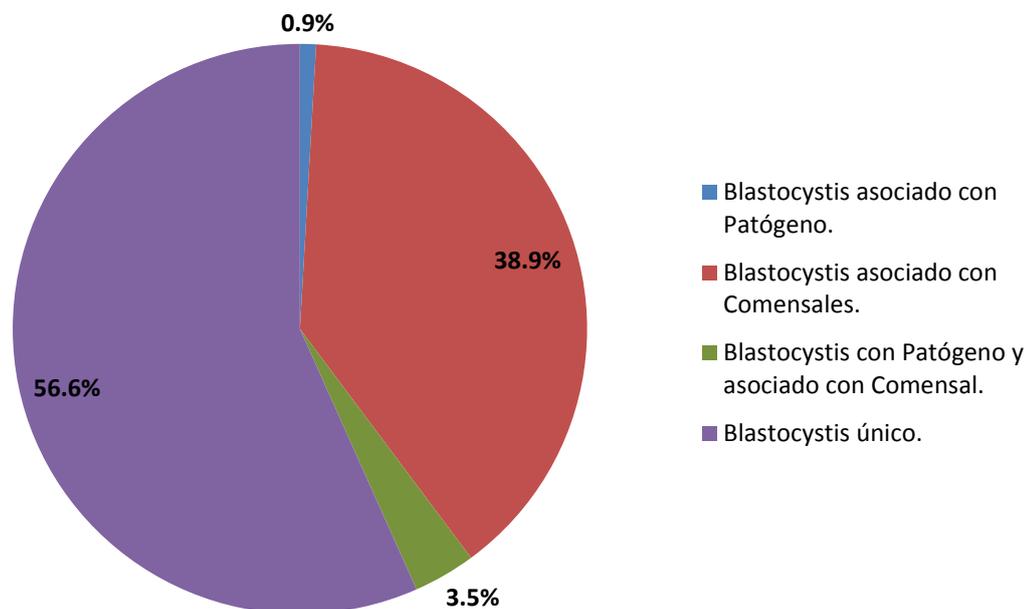


Fig. 14. Asociación de casos de *Blastocystis* con otros parásitos.

Se obtuvo una recuperación de ADN del 86.7% con el equipo de extracción Qiagen, de muestras conservadas con etanol al 70%. (Fig. 15)

Total = 113 muestras

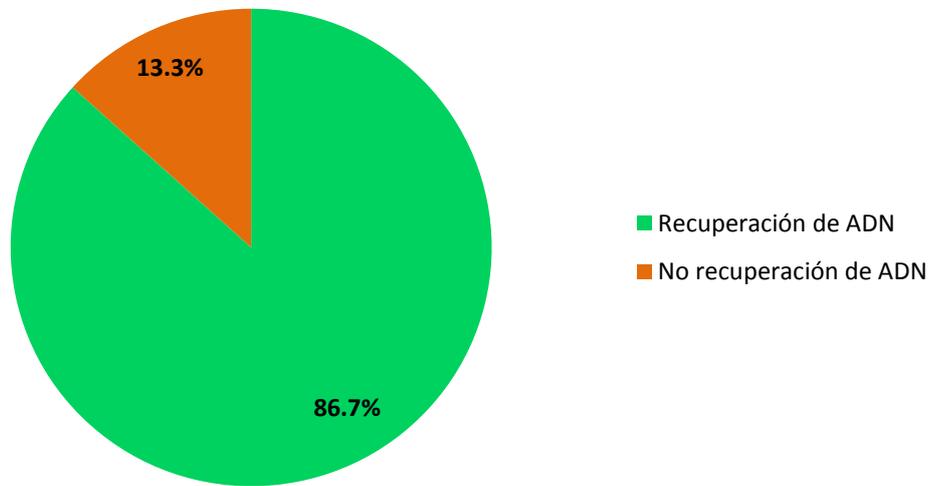


Fig. 15. Recuperación de ADN con Qiagen

De las 92 muestras, dieron positivas el 80.4% con primer de Santin, un 71.7% con ITS y con ambos 84.8%. (Fig. 16 y 17)

Total = 92 muestras

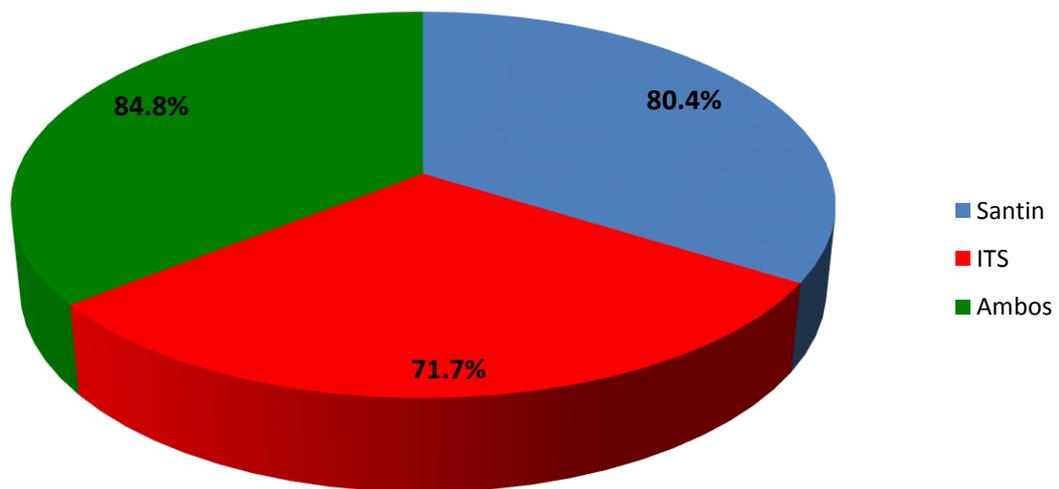


Fig. 16. Análisis de ADN de *Blastocystis* por PCR.

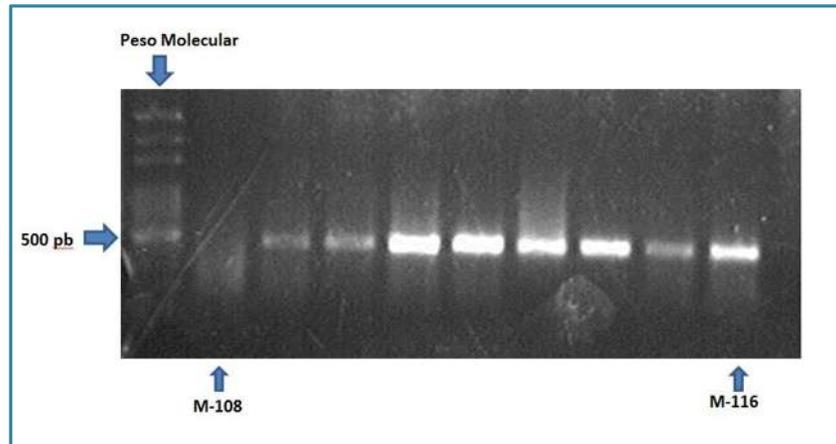


Fig. 17. PCR con Primers de Santin (muestras 108-116).

Para la subtipificación se incluyeron 52 muestras, el subtipo 1 fue el mayormente encontrado, seguido del 2, 3 y el 7 (Fig. 18)

Total = 52 muestras

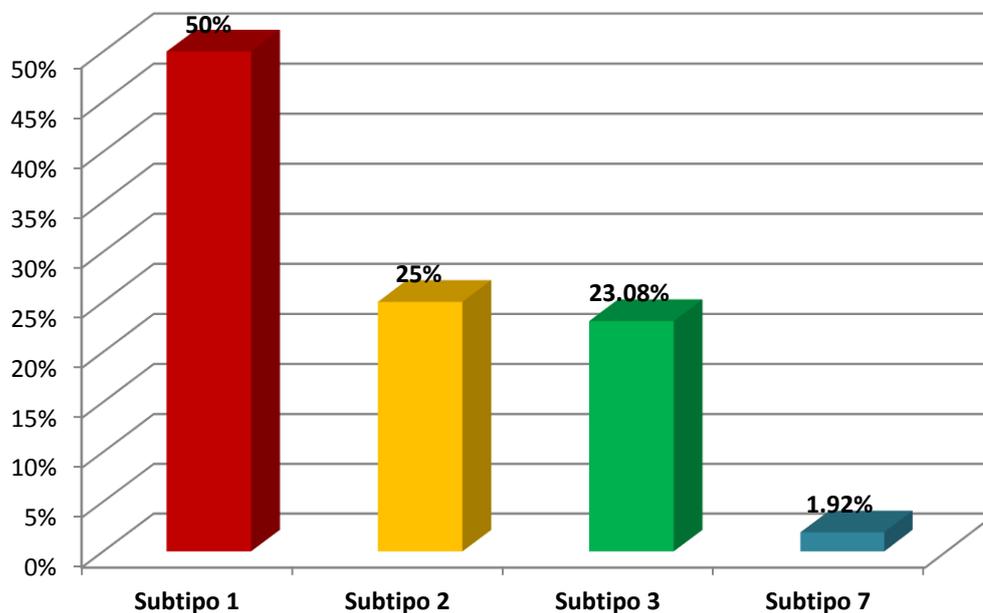


Fig. 18. Distribución de subtipos de *Blastocystis*.

En cuanto a la distribución geográfica, el subtipo 1 predominó tanto en los pacientes de Morelia como en los foráneos, seguido del subtipo 2. (Fig. 19)

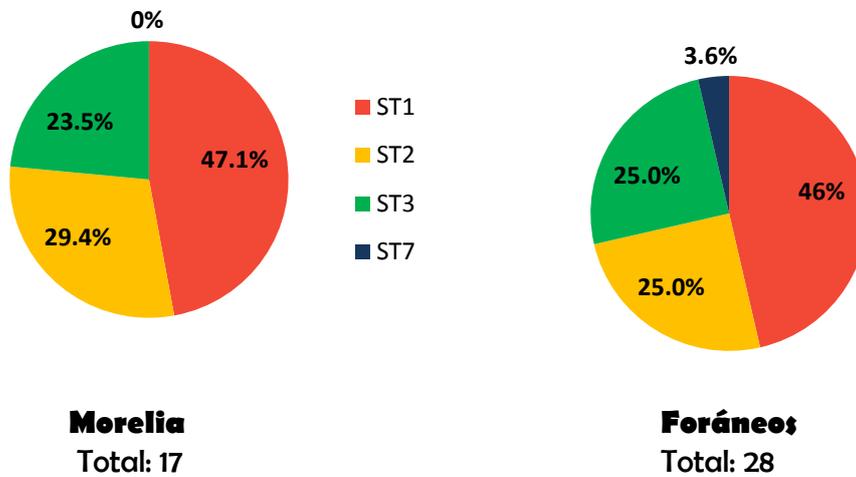


Fig. 19. Distribución de los subtipos de *Blastocystis*.

El estreñimiento fue el síntoma más frecuentemente reportado en el subtipo 1, mientras que para el subtipo 2 fue la presencia de heces blandas y los subtipos 3 y 7 no se asociaron a síntomas ( $p=0.5$ ,  $gl=1$ ).

Síntoma	Subtipo	$\chi^2$ ( $p=0.5$ , $gl=1$ )
Heces blandas	2	4.24
Estreñimiento	1	4.09
Bruxismo	3	2.86
Prurito Anal	3	2.69
Dolor Abdominal	3	1.90
Flatulencia	1	1.63

Tabla 2: Síntomas asociados a los diferentes subtipos

El factor de riesgo mayormente asociado al subtipo 1 fue el hecho de defecar en el suelo, para subtipo 2 el convivir con animales y para el subtipo 3 el comer alimentos en la calle. El Subtipo 7 no tuvo ninguna asociación (Tabla 3)

Factor de Riesgo	Subtipo	RR
Convivir con animales	2	8
Antecedente de arrojar lombrices	2	5.4

Tomar agua de la llave	2	3
Defecar en el suelo	1	2.6
Material de la casa austero	1	2.4
No lavado de manos	1	2.3
Comer alimentos en la calle	3	2.3

Tabla 3. Factores de riesgo asociados a *Blastocystis*.

## IX. DISCUSIÓN

De las muestras analizadas el 43.3% de los casos, *Blastocystis* estaba asociado con uno o más parásitos, ya sea patógeno, comensal u ambos, resultados similares fueron reportados por Irán e India. <sup>(61,84,92)</sup>

Se obtuvo una recuperación de 86.7% con el equipo de extracción de Qiagen, mientras que Yoshikawa reporta un 48%, cabe señalar que las muestras de nuestro estudio fueron preservadas en etanol 70% y en refrigeración 4 C hasta su procesamiento, el cual fue realizado antes de 2 meses como máximo, mientras que Yoshikawa y colaboradores no mencionan las condiciones y tiempo de almacenamiento de las muestras. <sup>(93)</sup>

Se usaron 2 diferentes primers, uno de los cuales (ITS) fue elaborado para este análisis por un colaborador, dando para nuestros resultados una mayor significancia estadística que con un solo primer, como análisis hechos en Australia. <sup>(78)</sup>

De 74 muestras secuenciadas, 22 fueron descartadas por estar asociadas a algún microorganismo patógeno o por una encuesta de datos incompleta; siendo 52 muestras, las calculas para su asociación con síntomas gastrointestinales y factores de riesgo de acuerdo al subtipo. Siendo así un reporte más amplio de *Blatocystis* en seres humanos, en comparación con estudios de Tailandia y E.U.A. <sup>(90,91)</sup>

El subtipo 1 fue el más frecuentemente encontrado, nuestros datos coinciden con lo reportado en Liberia, Nigeria, Tailandia y Brasil,<sup>(91)</sup> seguido del subtipo 2, 3 y 7 respectivamente, resultado que compartimos con países suramericanos. <sup>(94,95)</sup>

El subtipo 2 se asocia a heces blandas y el subtipo 1 a estreñimiento, reporte compartido con Tailandia<sup>(96)</sup> y contrario a lo reportado en Perú y Colombia que asocian al dolor abdominal.<sup>(63,64)</sup> Investigaciones en China, Irán, Suecia y Australia consideran al subtipo 3 el responsable de síntomas. <sup>(61,79,82)</sup>

Los factores de riesgo asociados fueron el convivir con animales, antecedente de arrojar lombrices y el tomar agua de la llave; este último caso coincide con lo reportado en Nepal y Tailandia. <sup>(68,89)</sup>

**X. CONCLUSIÓN**

Los subtipos 1 y 2 fueron los mayormente encontrados, asociando al subtipo 1 con estreñimiento y el defecar en el suelo, mientras que al subtipo 2 se le asoció con heces blandas y al hecho de convivir con animales.

**XI. RECOMENDACIONES**

Es necesario continuar con esta línea de investigación para aportar mayor conocimiento a la epidemiología y papel patógeno del parásito en nuestro medio.

**XII. REFERENCIAS**

1. Velarde R L T, Mendoza R A. *Prevalencia de Blastocystis hominis en menores de 12 años de una población Mexicana Urbana*. Rev Cubana Pediatr 2006; 78:47-189.
2. Devera R, Blanco Y, Requena I, Velásquez V. *Diagnóstico de Blastocystis hominis: Bajo rendimiento de los métodos de concentración Formol y Éter, Sedimentación Espontánea*. Rev Biomed 2006; 17: 231-3.
3. Traviezo V L E, Triolo M M, Agobian G. *Predominio de Blastocystis hominis sobre otros Enteroparásitos en pacientes del Municipio Palavecino Estado Lara, Venezuela*. Rev Cubana Med Trop 2006; 58: 10-5.
4. Stensvold C R, Suresh G K, Tan K S, Thompson R C, Traub R J, Viscogliosi E, Yoshikawah, Clark C G. *Terminology for Blastocystis Subtypes-A Consensus Trends*. Parasitol 2007; 23(3):93-6.
5. Sekar U, Shanthi M. *Blastocystis: Consensus of treatment and controversies*. Trop Parasitol. 2013; 3(1):35-9.
6. Devera R, Cermeño J R, Blanco Y, Bello M C, Guerra X, De Sousa M, Maitan E. *Prevalencia de Blastocistosis y otras Parasitosis Intestinales en una comunidad rural del Estado Anzoátegui, Venezuela*. Parasitol Latinoam. 2003; 58: 95 – 100.
7. Taamasri P, Leelayoova S, Rangsin R, Naaglor T, Ketupanya A, Mungthin M. *Prevalence of Blastocystishominis carriage in Thai army personnel based in Chonburi, Thailand*. Mil Med. 2002; 167(8):643-6.
8. Suresh K, Smith H. *Comparison of methods for detecting Blastocystis hominis*. Eur J ClinMicrobiol Infect Dis. 2004; 23(6):509-11.
9. Nascimento S A, Moitinho M D L. *Blastocystis hominis and other intestinal parasites in a community of Pitanga City, Paraná State, Brazil*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2005; 47(4):213-7.
10. Alarcón R S, Amato Neto V, Gakiya E, Bezerra R C. *Observations on Blastocystis hominis and Cyclospora cayetanensis in routine parasitological examinations*. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40(2):253-5.
11. Galvan-Ramírez M L, Madriz-Elisondo M L, Bernal-Redondo R. *Biodiversidad Parasitaria Entre Indígenas Y Mestizos Adultos De San Pedro Itzican, Jalisco, México*. Salud Pública Mex 2007; 49: 321-2.
12. Devera R, Cermeño J R, Blanco Y, Bello M C, Guerra X, De Sousa M, Maitan E. *Prevalencia De Blastocistosis En Venezuela*. Parasitol Latinoam 2004; 34: 53 – 57.

13. Larrosa-Haro A, Ruiz-Perez M, Aguilar-Benavides S. *Utility of studying feces for the diagnosis and management of infants and preschool children with acute diarrhea.* Salud Pública Mex. 2002; 44(4):328-34.
14. Tan KSW. *New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of Blastocystis spp.* Clin. Microbiol. Rev 2008; 21: 639-665.
15. Zierdt Ch. *Blastocystis Hominis—Past And Future.* Clin Microbiol Rev 1991; 4:61-79.
16. Yakoob J, Jafri W, Beg M A, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R. *Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of Blastocystis hominis.* Parasitol Res 2010; 106: 1033-8.
17. Stensvold C R, Alfellani M A, Norskov-Lauritsen S, Prip K, Victory E L, Maddox C, Nielsen H V, Clark C G. *Subtype Distribution Of Blastocystis Isolates From Synanthropic And Zoo Animales And Identification Of A New Subtype.* Int J Parasitol. 2009; 39(4):473-9.
18. Alfellani M A, Jacob A S, Perea N O, Krecek R C, Taner-Mulla D, Verweij J J, LeVecke B, Tannich E, Clark C G, Stensvold C R. *Diversidad y distribución de Blastocystis sp. subtipos en primates no humanos.* Parasitología. 2013 julio, 140 (8) :966-71.
19. Brittan F. *Report of a series of microscopical investigations on the Pathology of cholera.* London Med Gaz 1849; 9:530-542.
20. Zierdt Ch. *Blastocystis Hominis—Past And Future.* Clin Microbiol Rev 1991; 4:61-79.
21. Alexeieff A. *Sur la nature des formations dites "Kystes de Trichomonas Intestinalis."* C R Soc. Biol. 1911; 71:296-298.
22. Brumpt E. *Colite a Tetramitus mesnili (Wenyon 1910) et colite a Trichomonas intestinalis Leuchart 1879. Blastocystis Hominis Sp et formes voisines bull socww.* Pathol Exot 1912; 5:725-730.
23. Silberman J D, Sogin M L, Leipe D D, Clark C G. *Human parasite fi NDS Taxonomic.* Home Nature 1996; 380:398.
24. Zierdt C H, Rude W S, Bull B S. *Protozoan Characteristics of Blastocystis hominis.* Am J Clin Pathol 1967; 48:495.
25. Parija S C , Jeremías S. *Blastocystis : taxonomía, la biología y la virulencia. Departamento de Microbiología, JIPMER, Pondicherry, India.* Trop Parasitol 2013 Jan; 3 (1) :17-25.
26. Johnson A M, Thanou A, Boreham P F, Baverstock P R. *Blastocystis Hominis: Phylogenetic affinities determined by rRNA Sequence Comparison.* Exp Parasitol 1989; 68:283-288.

27. Tan Ks. *New Insights on classification, identification and clinical relevance of Blastocystis spp.* Clin Microbiol Rev 2008; 21(4): 639-65.
28. Zeliha K, Cigdem A H, Gunay E, Sami K, Abdurrahman T, Hasan I, Ali P D. *Trimethoprim–Sulfamethoxazole induced rash and fatal Hematologic disorders; Journal of Infection.* Trop Parasitol 2006; 52(2):49-52.
29. Wang W, Cuttell L, Bielefeldt-Ohmann H, Inpankaew T, Owen H, Traub RJ. *La diversidad de subtipos de Blastocystis en perros en diferentes entornos geográficos.* Parasit Vectores. 2013 Jul 24; 6:215.
30. Thathaisong U, Worapong J, Mungthin M, Tan-Ariya P, Viputtigul K, Sudatis A. *Blastocystis Isolates from a pig and a horse are closely related to Blastocystis hominis.* J Clin Microbiol 2003; 41(3): 967-75.
31. Yoshikawa H, Abe N, Wu Z. *PCR-Based identification of Zoonotic isolates of Blastocystis from mammals and birds.* Microbiology 2004; 150(5): 1147-51.
32. Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, *Et Al.* *Genomic analysis of Blastocystis hominis strains isolated from two long-term health care facilities.* J Clin Microbiol 2000; 38(4): 1324-30.
33. Abe N, Wu Z, Yoshikawa H. *Zoonotic genotypes of Blastocystis hominis detected in cattle and pigs by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of the small subunit ribosomal RNA gene.* Parasitol Res 2003; 90(2): 124-8.
34. Yan Y, Su S, Ye J, Lai X, Lai R, Liao H, *Et Al.* *Blastocystis Sp. Subtype 5: A Possibly Zoonotic Genotype.* Parasitol Res 2007; 101(6): 1527-32.
35. Noel C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb V P, Delgado- Viscogliosi P, Ho L C. *Et Al.* *Molecular phylogenies of Blastocystis isolates from different hosts: Implications for Genetic diversity, identification of species and zoonosis.* J Clin Microbiol 2005; 43(1): 348-55.
36. Yoshikawa H, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. *Molecular comparative studies among Blastocystis isolates obtained from humans and animals.* J Parasitol 2003; 89(3): 585-94.
37. Lee M G, Stenzel D J. *A survey of Blastocystis in domestic chickens.* Parasitol Res 1999; 85(2): 109-17.
38. Alfellani M A, Jacob A S, Perea N O, Krecek R C, Taner-Mulla D, Verweij J J, LeVecke B, Tannich E, Clark C G, Stensvold C R. *Diversidad y distribución de Blastocystis sp. subtipos en primates no humanos.* Parasitol Res. 2013 julio; 140 (8) :966-71.
39. Pipatsatitpong D, Rangsin R, Leelayoova S, Naaglor T, Mungthin M. *Incidence and risk factors of Blastocystis infection in an orphanage in Bangkok, Thailand.* Parasit Vectors. 2012; 14:5-37.

40. Marcos L A, Gotuzzo E. *Infecciones por protozoos intestinales en el huésped inmunocomprometido. Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.* Agosto 2013, 26 (4):302-8.
41. <http://www.blastocystis.net/2013/01/where-are-we-on-blastocystis-subtypes.html>.
42. Clark C G, Van der Giezen M, Alfellani M A, Stensvold C R. *Los acontecimientos recientes en la investigación Blastocystis.* Adv Parasitol. 2013; 82:1-32
43. Tan W K S. *New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis sp.* Clin. Microbiol. Rev., 2008; 21: 639-665.
44. Viscogliosi E, Pierce R, Capron M. *Molecular Phylogenies of Blastocystis Isolates from Different Hosts: Implications for Genetic Diversity, Identification of Species and Zoonosis.* Journal of Clinical Microbiology, 2005; Vol. 43, p. 348-355.
45. Stenzel D J, Boreham P F. *Blastocystis hominis revisited.* Clin. Microbiol. Rev 1996; 9: 563-584.
46. Tan K S, Sing M, Yap E H, Ho L C, Moe K T, Howe J M, Ng G C. *Colony formation of Blastocystis hominis in soft agar.* Parasitol Res 1996; 82:375-377.
47. Tan K S, Sing M, Yap E H. *Recent advances in Blastocystis hominis research: hot spots in terra incognita.* Int J Parasitol 2005; 32: 789-804.
48. Tay Lara, Velasco Gutiérrez. Parasitología Médica. 7ª. Ed. Editorial Méndez Editores. MÉXICO. 2006; 7:203-208.
49. Zaman V, Howe J, Ng M L. *Variation in the cyst morphology of Blastocystis hominis.* Parasitol Res. 1997; 83: 731-733.
50. Moe K T, Singh M, Howe J, Ho L C, Tan K S W, Chen X Q, Yap E H. *Development of Blastocystis hominis cysts into vacuolar forms in vitro.* Parasitol Res. 1999; 85: 103-108.
51. Moe K T, Singh M, Howe J, Ho L C, Tan K S W, Ng G C, Chen X Q, Yap E H. *Observations on the ultrastructure and viability of the stage os Blastocystis hominis from human feces.* Parasitol Res. 1996; 82: 439-444.
52. Feldman R.E. *Un nuevo parásito intestinal: Blastocystis hominis. Reubicación taxonómica y comprobación de su acción patógena.* Acta Bioquím Clin Latinoam 1987; 21: 357-61.
53. Moghaddam D, Ghadirian E, Azami M. *Blastocystis hominis and the evaluation of efficacy of Metronidazole and Trimethoprim/Sulfamethoxazole.* Am J Gastroenterol. 1999;94(11):3245-7
54. Rodríguez L. *Blastocystis sp, subtipos según su huésped.* Et Al., 2008; Martínez Barbosa Et A., 2010; 6:298-334.

55. Kumarasamy V, Kuppusamy U R , Samudi C , Kumar S . *Blastocystis sp. subtipo 3 desencadena mayor proliferación de las células de cáncer colon rectal humano*. Parasitol Res. 2013 Oct; 112 (10) :3551-5.
56. Coyle C M, Varughese J, Weiss L M, Tanowitz H B. *Blastocystis: to treat or not to treat*. Clin Infect Dis. 2012 Jan 1;54(1):105-10.
57. Alfellani M A, Taner-Mulla D, Jacob A S, Imeede C A, Yoshikawa H, Stensvold C R, Clark C G. *La diversidad genética de Blastocystis en el ganado y animales de zoológico*. Protist. 2013 Jul; 164 (4): 497-509.
58. Stensvold C R. *Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for Blastocystis subtyping*. J Clin Microbiol. 2013 Jan;51(1):190-4
59. Dogruman-AI F, Dagci H, Yoshikawa H, Kurt O, Demirel M. *A Possible Link Between Subtype 2 And Asymptomatic Infections Of Blastocystis Hominis*. Parasitol Res 2008; 103: 685-9.
60. Safadi D, Meloni D, Poirier P, Osman M, Cian A, Gaayeb L, Wawrzyniack I, Delbac F, Alaoui H, Delhaes L, Dei-Cas E, H Mallat, Dabboussi F, Hamze M, Viscogliosi E. *Molecular Epidemiology of Blastocystis in Lebanon and Correlation between Subtype 1 and Gastrointestinal Symptoms*. Parasitol. 2013 Mar; 4:304-417.
61. Moosavi A, Haghghi A, Mojarad E N, Zayeri F, Alebouyeh M, Khazan H, Kazemi B, Zali M R. *Genetic variability of Blastocystis sp. isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Iran*. Parasitol Res. 2012 Dec;111(6):2311-5.
62. Stensvold C R, Christiansen D B, Olsen K E, Nielsen H V. *Blastocystis sp. subtype 4 is common in Danish Blastocystis-positive patients presenting with acute diarrhea*. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(6):883-5.
63. Ramírez J D, Sánchez L V, Bautista D C, Corredor A F, Flórez A C, Stensvold C R. *Blastocystis subtipos detectados en seres humanos y animales de Colombia*. Infect Genet Evol. 2013 Jul 22. pii: S1567-1348 (13) 00286-4.
64. Barahona R L, Maguiña V C, Náquira V C, Terashima I A, Tello R. *Human blastocystosis: prospective study symptomatology and associated epidemiological factors*. Rev Gastroenterol Peru. 2003 ;23(1):29-35.
65. Gould R, Boorum K. *Antígeno de superficie de Blastocystis es estable en muestras de heces protegidos con productos químicos de al menos 1 año*. Epub 2013 Jul; 112 (7) :2469-71.
66. Şakalar Ç, Uyar Y, Yürürdurmaz M A, Tokar S, Yeşilkaya H, Gürbüz E, Kuk S, Yazar S. *Clonación de Blastocystis sp subtipo 3 de la subunidad pequeña de ADN ribosómico*. Turkiye Parazitolo Derg. 2013; 37 (1) :13-8.

67. Ramírez J D, Sánchez L V, Bautista D C, Corredor A F, Flórez A C, Stensvold C R. *Blastocystis subtypes detected in humans and animals from Colombia*. Infect Genet Evol. 2013. pii: S1567-1348(13)00286-4.
68. Lee I L, Tan T C, Tan P C, Nanthiney D R, Biraj M K, Surendra K M, Suresh K G. *Predominance of Blastocystis sp. subtype 4 in rural communities, Nepal*. Parasitol Res. 2012;110(4):1553-62.
69. Thathaisong U, Siripattanapipong S, Mungthin M, Pipatsatitpong D, Tan-ariya P, Naaglor T, Leelayoova S. *Identification of Blastocystis subtype 1 variants in the Home for Girls, Bangkok, Thailand*. Am J Trop Med Hyg. 2013 Feb; 88(2):352-8.
70. Martín D, Bart A, Vandenberg O, Verhaar N, Wentink-Bonnema E, Moens C, Van Gool T. *Subtipo de determinación de Blastocystis aislados por láser asistida por matriz de desorción / ionización tiempo de vuelo espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013 sep; 27:281-405.
71. Santos H J, Rivera W L. *Comparison of direct fecal smear microscopy, culture, and polymerase chain reaction for the detection of Blastocystis sp. in human stool samples*. Asian Pac J Trop Med. 2013; 6(10):780-4.
72. Sekar U, Shanthi M. *Blastocystis: Consensus of treatment and controversies*. Trop Parasitol. 2013;3(1):35-9.
73. Mirza H, Teo J D, Upcroft J, Tan K S. *A rapid, high-throughput viability assay for Blastocystis spp. reveals metronidazole resistance and extensive subtype-dependent variations in drug susceptibilities*. Antimicrob Agents Chemother. Parasitol Res 2011; 55(2):637-48.
74. Dhurga D B, Suresh K G, Tan T C, Chandramathi S. *Apoptosis in Blastocystis spp. is related to subtype*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012 Dec;106(12):725-30.
73. Doyle O, Helgason M, Mathias R E. *Epidemiology and pathogenicity of Blastocystis hominis*. J. Clin. Microbiol. 1990; 28: 116-121.
74. Nimri L, Batchounr Y. *Intestinal colonization of symptomatic and asymptomatic schoolchildren with Blastocystis hominis*. Clin. Microbiol.1994; 32: 2865-2866.
75. Ponce De León R, Stevaz M, Zdero M. *Importancia del diagnóstico de Blastocystis hominis en el examen Parasitológico de heces*. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 1991; 33: 159-164.
76. Zakj M, Daoud A, Pugh R, Al A F, Mutairi G, Saleh Q. *Clinical Report Of Blastocystis Hominis Infection In Children*. J. Trop. Med. Hyg. 1991; 94: 118-122.
77. Masry N, Bassily S, Parid Z, Aziz A. *Potential Clinical Significance Of Blastocystis Hominis In Egypt*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1990; 84: 695.

78. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. *Subtype distribution of Blastocystis isolates identified in a Sydney population and pathogenic potential of Blastocystis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013 Mar; 32(3):335-43.
79. Salinas J L. *Current status of Blastocystis terminology*. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 2009; 51(2): 117-118.
80. Alfellani M A, Stensvold C R, Vidal-Lapiedra A, Onuoha E S, Fagbenro-Beyioku A F, Clark C G. *Variable geographic distribution of Blastocystis subtypes and its potential implications*. Acta Trop. 2013 Apr;126(1):11-8.
81. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui K, Delbac F, Boorom K, Delhaes L, Dei-Cas E, Viscogliosi E. *Subtype Analysis Of Blastocystis Isolates From Symptomatic Patients In Egypt*. Parasitol Res. 2010; 106(2):505-11.
82. Li L H, Zhang X P, Lu S, Zhang L, Yoshikawa H, Wu Z, Steinmann P, Utzinger J, Tong X M, Chen S H, Zhou X N. *Cross-Sectional Surveys And Subtype Classification Of Human Blastocystis Isolates From Four Epidemiological Settings In China*. Parasitol Res. 2007;102(1):83-90.
83. Kuo H Y, Chlang D H, Wang C C, Chen T L, Fung C P, Lin C P, Cho W L, Liu C Y. *Clinical Significance Of Blastocystis: Experience From A Medical Center In Northern Taiwan*. J Microbiol Infect, 2008;41(3):222-6.
84. Haghghi A, Moosavi A, Mojarad E N, Zayeri F, Alebouyeh M, Khazan H, Kazemi B, Zali M R, Tan Ks. *New insights on classification, identification and clinical relevance of Blastocystis spp*. Clin Microbiol Rev 2008; 21(4): 639-65.
85. Salinas J L, Vidozola G H. *Infection by Blastocystis: a review*. Rev Gastroenterol Peru. 2007;27(3):264-74.
86. Hoevers J, Holman P, Logan K, Hommel M, Ashford R, Snowden K. *Restriction Fragment-Length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of Blastocystis hominis isolates from geographically diverse human hosts*. Parasitol Res 2000; 86(1): 57-61.
87. Vassalos C M, Spanakos G, Vassalou E, Papadopoulou C, Vakalis N. *Differences in clinical significance and morphologic features of Blastocystis sp subtype 3*. Am J Clin Pathol 2010; 133(2): 251-8.
88. Souppart L, Moussa H, Cian A, Sanciu G, Poirier P, El Alaoui H, Et Al. *Subtype Analysis Of Blastocystis Isolates From Symptomatic Patients In Egypt*. Parasitol Res 2010; 106(2): 505-11.
89. Leelayoo S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, Mungthin M. *Drinking water: A possible source of Blastocystis spp. Subtype 1 infection in school children of a rural community in central Thailand*. Am J Trop Med Hyg 2008; 79(3)401-406.

90. Verma R, Delfanian K. *Blastocystis hominis urticaria aguda asociada*. Am J Med Sci. 2013 Jul; 346 (1) 80.
91. Pipatsatitpong D, Rangsin R, Leelayoova S, Naaglor T, Mungthin M. *Incidence and risk factors of Blastocystis infection in an orphanage in Bangkok, Thailand*. Parasit Vectors. 2012; 14;5:37
92. Rayan P, Verghese S, McDonnell P A. *Geographical location and age affects the incidence of parasitic infestations in school children*. Indian J Pathol Microbiol. 2010; 53(3):498-502.
93. Yoshikawa H, Dogruman F A, Songul T, Semra K, Neriman B, Nedim S. *Evaluation of DNA extraction kits for molecular diagnosis of human Blastocystis subtypes from fecal samples*. Parasitol Res. 2011; 109: 1045; 1050.
94. Londoño A L, Mejía S, Gómez-Marín J E. *Prevalence and risk factors associated with intestinal parasitism in preschool children from the urban area of Calarcá, Colombia*. Rev Salud Publica (Bogota). 2009; 11(1):72-81.
95. Malheiros A F, Stensvold C R, Clark C G, Braga G B, Shaw J J. *Short report: Molecular characterization of Blastocystis obtained from members of the indigenous Tapirapé ethnic group from the Brazilian Amazon region, Brazil*. Am J Trop Med Hyg. 2011 Dec; 85(6):1050-3.
96. Surangsrirat S, Thamrong L, Piyaniran W, Naaglor T, Khoprasert C, Taamasri P, Mungthin M, Leelayoova S. *Assessment of the association between Blastocystis infection and irritable bowel syndrome*. J Med Assoc Thai. 2010; 93 Suppl 6:S119-24.
97. Santín M, Gomez M M, Solano G, Fayer R. *Development of a new PRC protocol to detect and subtype Blastocystis sp. from humans and animals*. Parasitol Res 2011; 109:205-212.

Laboratorio de Microbiología y Parasitología

**XIII. ANEXOS**

**ANEXO 1: HOJA DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACION EN EL PROYECTO DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA “EVA SÁMANO DE LÓPEZ MATEOS”**

**LABORATORIO DE INVESTIGACION EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**HOJA DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN “GENETICA DE LOS SUBTIPOS 1 Y 3 DE *BLASTOCYSTIS* EN NIÑOS QUE ACUDEN AL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA”**

Manifiesto que he recibido información completa y precisa sobre los beneficios del proyecto de investigación titulado: “GENETICA DE LOS SUBTIPOS 1 Y 3 DE *BLASTOCYSTIS* EN NIÑOS QUE ACUDEN AL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA”, el cual no representa riesgo para mi paciente \_\_\_\_\_; dado que la información se obtendrá de la muestra de materia fecal y los datos que se piden se manejaran de forma anónima y confidencial.

Por lo anterior doy mi consentimiento para que el resultado del estudio de mi hijo(a), pueda ser utilizado con fines académicos y de investigación por el Laboratorio de Investigación en Microbiología y Parasitología, del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”

Morelia Michoacán a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Nombre y Firma del Padre/Tutor

Nombre y Firma del testigo

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

RESPONSABLE DE LA INVESTIGACIÓN

QFB GPE. ERENDIRA OROZCO MOSQUEDA

**ANEXO 2: INDICACIONES PROPORCIONADAS A LOS PACIENTES PARA LA  
CORRECTA TOMA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS**

**a) Pacientes foráneos**

Se requieren de dos muestras con conservador y una muestra fresca. Colocar un pedazo de excremento del tamaño de una nuez en el frasco con formol. Homogenizar perfectamente con ayuda del abate lenguas hasta dejar consistencia de un atole espeso, repetir el procedimiento hasta completar 2 muestras (de días diferentes). Para la recolección de la muestra fresca colocar un pedazo de excremento del tamaño de una nuez en un frasco limpio y con tapadera. Remitir el laboratorio antes de 24hrs de haber sido colectada. Las muestras pueden ser recolectadas a cualquier hora del día no debe de extraerse de la taza del baño. No es necesario de ayuno.

**b) Pacientes locales**

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

**ANEXO 3: FORMATO DE ENCUESTA**

No.	FECHA	NOMBRE	EDAD	SEXO	PROCEDENCIA	SINTOMATOLOGIA	FACTORES DE RIESGO	SUBTIPO



Fig. 20. Aplicación de la encuesta a los padres de familia.

#### ANEXO 4: EXAMEN DIRECTO EN FRESCO

##### MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

###### MATERIAL:

- Porta objetos 7.5 X 2.5 cm
- Cubre objetos 22 X 22 mm
- Aplicadores de madera
- Hisopos
- Pipeta Pasteur con bulbo de goma
- Parafina-vaselina 1:1

###### REACTIVOS:

- Solución salina isotónica 0.85% (ssi)
- Solución yodo-lugol
- Frasco con cloro para descartar el material.

###### PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Solución de yodo lugol

- Yodo (cristales) 5 gramos
- Yoduro de potasio 10 gramos
- Agua destilada 100 ml
- Para uso diluir 1:5

###### EQUIPO:

- Microscopio compuesto
- Parrilla eléctrica para derretir la parafina

###### EQUIPO DE SEGURIDAD PERSONAL :

- Bata blanca limpia de manga larga
- Guantes de latex
- Cubrebocas

##### PROCEDIMIENTO

- 1.- Colocar 1 gota de solución salina isotónica ó yodo lugol en el centro del portaobjetos.
- 2.- Con el aplicador, tomar la muestra, calculando más o menos 1.5 a 2 mg. de heces y hacer una suspensión uniforme con la gota de ssi o yodo-lugol.
- 3.- Cubrir la preparación con el cubreobjetos
- 4.- Con un hisopo limpiar las orillas del cubre objetos para quitar el exceso de muestra.
- 5.- Sellar la preparación con parafina.
- 6.- Observar al microscopio con objetivos de 10X y 40X.

#### ALGORITMOS

a) Para interpretación de resultados.

- 1.- Se observan al menos 20 campos por laminilla en 10X y 40X buscando trofozoítos y quistes de Blastocystis.



#### ANEXO 5: MÉTODO DE CONCENTRACIÓN POR SEDIMENTACIÓN CON FORMOL-ETER.

##### TÉCNICA DE RITCHIE

Para detectar la presencia de parásitos intestinales. Es uno de los métodos más referidos en la literatura científica que se toma como prototipo para comparar otros métodos. Es una técnica de concentración que demuestra la presencia de huevos, quistes, ooquistes y larvas, no importa la densidad que tengan. Con el éter que emplea, elimina muchos detritus orgánicos y con el formol, usado como fijador, se mantiene la integridad de las formas parasitarias.

##### MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

###### MATERIAL :

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Tubos cónicos de 15 ml
- Pipeta pasteur con bulbo de goma
- Tapones de hule
- Pizeta con agua
- Vasos de plástico de 100 ml
- Embudos de plástico de 5 cm de diámetro
- Casa en cuadros de 16X16 cm
- Abatelenguas de madera
- Hisopos

- Gradilla
- Parafina-vaselina 1:1

**REACTIVOS :**

- Solución de yodo-lugol
- Solución de formol al 10%
- Eter
- Frasco con cloro como desinfectante

**EQUIPO :**

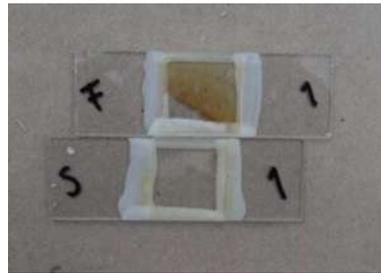
- Microscopio compuesto
- Parrilla
- Centrifuga
- Vortex

**EQUIPO DE SEGURIDAD PERSONAL :**

- Bata blanca limpia de manga larga
- Guantes de latex
- Cubre bocas

**PROCEDIMIENTO**

- 1.- Con un aplicador, tomar una muestra de heces de aproximadamente 1 ó 2 gramos y hacer una suspensión 3:1 en un baso de plástico.
- 2.- Filtrar a través de gasa húmeda a un tubo cónico de 15 mL, utilizando un embudo de plástico.
- 3.- Centrifugar el tubo a 2,500 rpm durante un minuto.
- 4.- Descartar el sobrenadante.
- 5.- Añadir 10mL de formol al sedimento y con la ayuda de un aplicador agitar perfectamente la muestra y dejar reposar por 5 minutos.
- 6.- Agregar un mL de éter.
- 7.- Tapar el tubo y agitar vigorosamente en el vortex durante 15 segundos.
- 8.- Retirar cuidadosamente el tapón del tubo cónico, realizando esto lejos de la cara.
- 9.- Centrifugar a 2,500 rpm por un minuto.
- 10.- Al final de la centrifugación se obtienen 4 capas: Sedimento, formol, detritus y éter. Con un aplicador desprender el tapón de detritus de todo alrededor y decantar los sobrenadantes de un solo movimiento de tal manera que solo quede el sedimento.
- 11.- Con un hisopo limpiar las paredes del tubo cónico.
- 12.- Mezclar el sedimento con formol y con ayuda de una pipeta pasteur transferir el sedimento a un portaobjetos y agregar una gota de lugol, mezclar perfectamente y colocar un cubreobjetos.
- 13.- Con un hisopo limpiar el exceso de muestra alrededor del cubreobjetos.
- 14.- Sellar la preparación con parafina.
- 15.- Observar al microscopio examinando sistemáticamente la preparación, utilizando el objeto de 10x y posteriormente con el objetivo de mediana resolución para confirmar las estructuras de los quistes.



## ANEXO 6: MÉTODO DE CONCENTRACIÓN POR FLOTACIÓN CON SACAROSA

### TÉCNICA DE SHEATHER.

Este método es poco usado en el mundo, es poco efectivo en materias fecales ricas en grasas, concentra 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, REACTIVOS Y EQUIPO

#### MATERIAL:

- Portaobjetos 7.5x2.5 cm
- Cubreobjetos 22x22 mm
- Tubos de ensaye 13x100
- Pipetas pasteur con bulbo de goma
- Matraz Erlenmeyer 500 ml
- Probeta 1000 ml
- Pizeta con agua
- Vaso de plástico de 100 ml
- Embudos de plástico de 5 cm de diámetro
- Casa en cuadros de 16x16 cm
- Abatelenguas de madera
- Aplicadores de madera
- Hisopos
- Asa bacteriológica con aro de 5mm de diámetro doblada con un ángulo de 90°
- Gradilla
- Parafina-vaselina 1:1

#### REACTIVOS :

- Solución de yodo-lugol
- Solución de Sheather, densidad 1,20
- Frasco con cloro para descartar el material

#### PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

Sheather (Densidad 1,20)  
Sacarosa 800 gramos

Fenol 2 gramos

Agua destilada 1 litro

\*Calentar el agua destilada a ebullición, retirar el mechero y agregar los componentes restantes agitando.

**EQUIPO:**

-Microscopio compuesto

-Parrilla eléctrica

-Centrifuga

-Densímetro

**EQUIPO DE SEGURIDAD PERSONAL**

-Bata blanca limpia de manga larga

-Guantes de látex

-Cubre bocas

**PROCEDIMIENTO:**

1.- Con un aplicador, tomar una muestra de heces aproximadamente 1 gramo, hacer una suspensión 3:1 con agua en un vaso de plástico pequeño.

2.- Filtrar a través de gasa húmeda a un tubo de ensayo utilizando un embudo de plástico.

3.- Centrifugar el tubo a 2500 rpm durante un minuto.

4.- Descartar el sobrenadante.

5.- Añadir nuevamente agua al sedimento y con ayuda de un aplicador agitar perfectamente la muestra.

6.- Volver a centrifugar a 2500 rpm por un minuto.

7.- Descartar el sobrenadante.

8.- Al sedimento se agregan unos pocos mililitros de Sheather y agitar con un aplicador hasta suspender totalmente el sedimento, agregar más solución de Sheather hasta un centímetro abajo del borde del tubo de ensayo, sin dejar de agitar.

9.- Centrifugar a 2500 rpm durante un minuto.

10.- Sacar el tubo cuidadosamente de la centrífuga y colocarlo en la gradilla.

11.- Remover una o dos asadas de la película superficial y colocarlas sobre un portaobjetos, esterilizar el asa por flameo.

12.- Colocar una gota de yodo lugol.

13.- Colocar el cubreobjetos mezclando ambas gotas.

14.- Sellar la preparación con parafina.

15.- Observar al microscopio examinando sistemáticamente la preparación, utilizando el objetivo de 10X y confirmar con 40X.

**ANEXO 7: CALIBRACIÓN DE MICROSCÓPIO Y MEDICIÓN MICROSCÓPICA  
DE PARÁSITOS.**

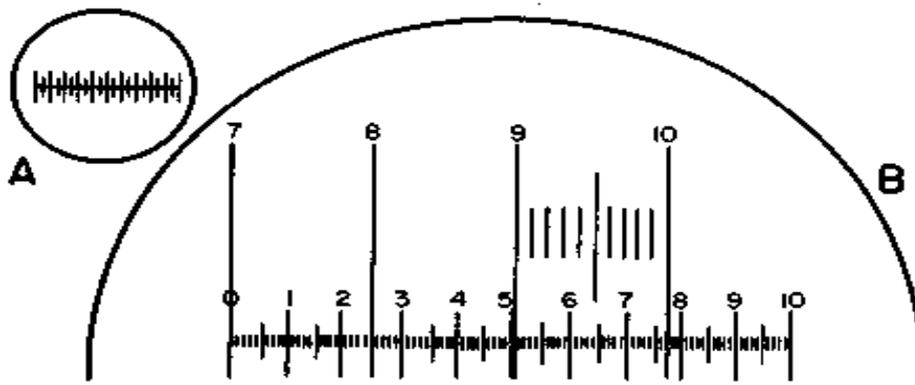


Fig. 207. A, Micrómetro ocular; B, micrómetro ocular superpuesto sobre una porción de la escala del micrómetro objetivo.

Tomado de:

[http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias\\_quimicas\\_y\\_farmacenticas/apbot-farm2g/41.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmacenticas/apbot-farm2g/41.html)

1.- **OBJETIVO DEL PROCEDIMIENTO:** 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.

**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 intercambiados con los componentes correspondientes de otro microscopio.

**Coefficiente micrométrico:**

Es una cifra que expresa la equivalencia en micras 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 3 coeficientes micrométricos para cada microscopio usando un solo ocular micrométrico y los objetivos 10X y 45X (seco débil y seco fuerte) y de 90X o 100X (de inmersión), pero puede hacerse cualquier combinación de ocular y objetivo. Para obtener el coeficiente micrométrico hay que seguir la siguiente técnica.

**MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO:**

*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 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  $\mu$ m.

*Ocular micrómetro de platina con divisiones de 01 y 0.01 mm.* Es esencialmente similar al micrómetro, 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 en él.

*Micrómetro objetivo.* Es un portaobjetos en cuyo centro se halla grabada una escala de 1 o 2 mm, dividida en 100 o 200 partes, cada división mide 10  $\mu$ m.

*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.

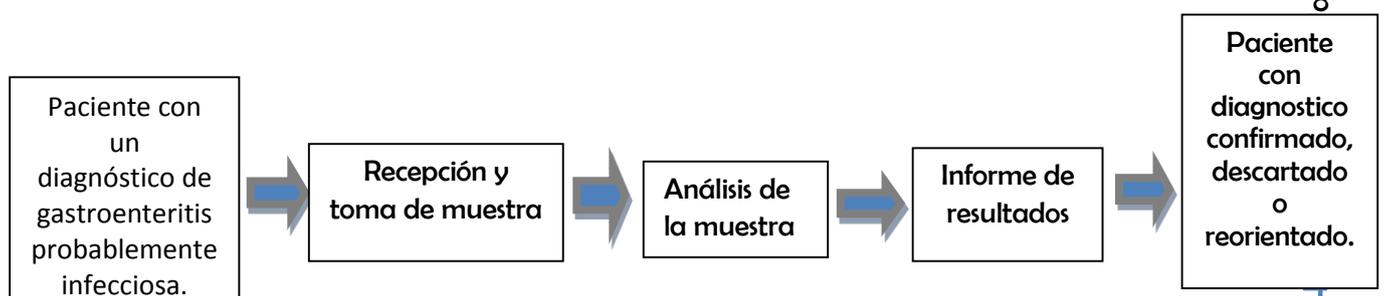
#### CÁLCULOS

El objeto de la calibración es determinar cuanto mide en  $\mu$ m cada división de la escala ocular cuando se calibra contra la escala del micrómetro objetivo. Por ejemplo, si 40 unidades de la escala ocular equivalen a 0.09 mm de la escala del micrómetro de la platina y cada división del ocular es igual a  $0.09 \text{ mm}/40$ , o sea 0.00225 mm. Dado que hay 1000  $\mu$ m en cada milímetro, cada división del micrómetro ocular en la calibración ilustrada es igual a  $0.00225 \times 1000$  o sea 2.25  $\mu$ m. Este mismo cálculo sirve para calibrar cualquier juego de oculares y objetivos, sustituyendo los números adecuados.

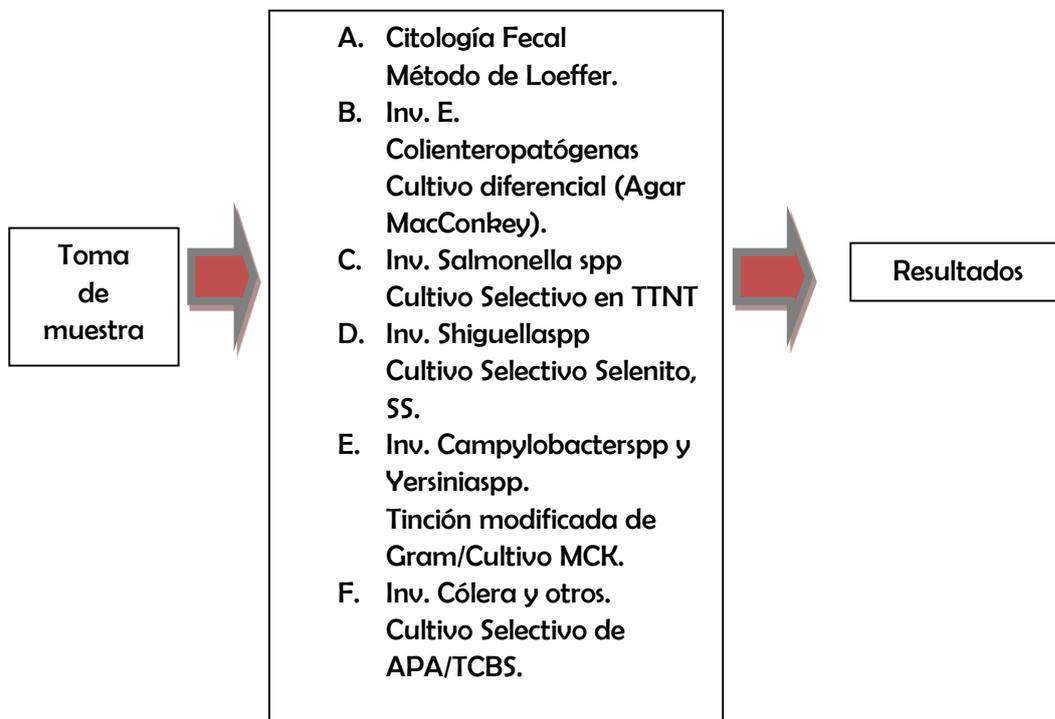
#### ALGORITMOS

- a) Guía para la interpretación de resultados: Conociendo la equivalencia en micras de la escala en los diferentes objetivos, medir las formas parasitarias observadas<sup>38</sup>.

#### ANEXO 8: PROCESO DE TRABAJO PARA COPROCULTIVOS.



p  
infecciosa



### 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 37 C durante 18 a 24 horas y se observan colonias.

### Identificación Bioquímica 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
- ✓ Urea.

**Procedimiento:**

- 1.- Colocar 1 gota de yodo-lugol y 1 de verde brillante a un tubo con caldo tetrionato.
- 2.- Con un hisopo, agregar una pequeña cantidad de materia fecal al caldo tetrionato.
- 3.- Sembrar la materia fecal en 1 placa de MacConkey y 1 de EMB.
- 4.- Incubar el caldo Tetrionato 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 tetrionato 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.



Tomado de: <http://labnegra.blogspot.mx/2011/06/el-brote-de-la-e-coli-es-una-cepa-nueva.html>.

**ANEXO 9: EXTRACCION DE ADN**

**QIAGEN**

**Puntos importantes antes de comenzar:**

Para la detección de las células que son difíciles de lisar, tales como las de algunas bacterias y parásitos, la temperatura de lisis en el paso 3 se puede aumentar a 95 C, si es necesario.

Todas las etapas de centrifugación se llevan a cabo a temperatura ambiente (15-25 C) a 20,000 x g (aproximadamente 14,000 rpm). Aumentar el tiempo de centrifugación proporcionalmente si la centrifuga no puede proporcionar 20,000 x g (por ejemplo, en lugar de la centrifugación durante 5 min a 20,000 x g, se centrifuga durante 10 min a 10,000 x g). Los tubos de 2 mL usados en el paso 5 deben ser suficientemente anchos para acomodar una tableta Inhibitex.

**Cosas que hacer antes de empezar:**

Asegúrese de que AW1 Buffer y AW2 Buffer han sido preparados de acuerdo con las instrucciones de las etiquetas.

Mezclar todos los tampones antes de su uso.

Si un precipitado se ha formado en Tampón ASL o AL Buffer, disolver mediante la incubación a 70 C.

Preparar un baño de agua 70 C para su uso en los pasos 3 y 12.

#### Procedimiento

1. Pesar 180-220 mg heces en un tubo de microcentrífuga de 2mL (no incluido) y colocar el tubo en hielo.  
También se puede utilizar con cantidades más pequeñas de heces. No hay necesidad de reducir las cantidades de tampones o matriz Inhibitex cuando se utilizan cantidades más pequeñas de materia fecal.  
Si la muestra es líquida, pipeta de 200µL en el tubo de microcentrífuga. Corte el extremo de la punta de la pipeta para pipetear más fácil.
2. Añadir 1.4 mL de Tampón ASL para cada muestra de heces. Vórtice de forma continúa durante 1 min o hasta que la muestra de heces se homogeneizó a fondo.  
Nota. Es importante vórtice las muestras a fondo. Esto ayuda a asegurar la máxima concentración de ADN en la elución final.
3. Calentar la suspensión durante 5min a 70 C.  
Este paso de calentamiento aumenta el rendimiento total de ADN de 3 a 5 veces y ayuda para lisar las bacterias y otros parásitos. La temperatura de lisis se puede aumentar a 95 C para las células que son difíciles de lisar (tales como bacterias Gram-positivas).
4. Vórtice durante 15 seg la muestra y se centrifuga a máxima velocidad durante 1 min para sedimentar las partículas de heces.
5. Pipetear 1.2 mL del sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2mL (no incluida) y desechar el sedimento.

**Nota:** Los tubos de 2 mL utilizados deberían ser lo suficientemente amplios como para acomodar una tableta de Inhibitex.

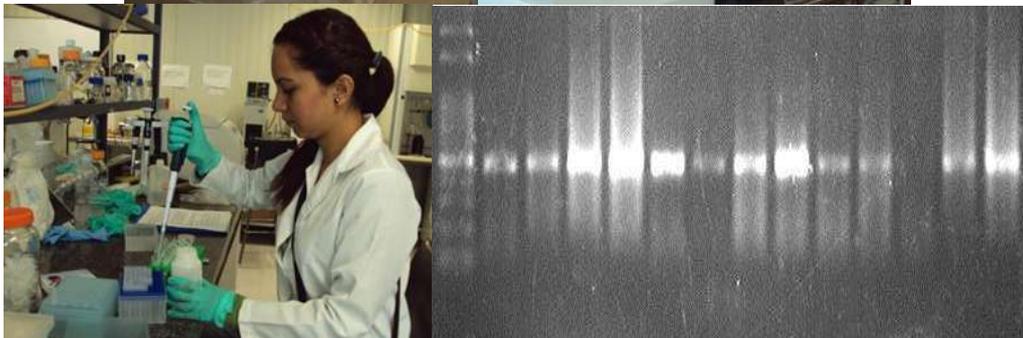
Transferencia de pequeñas cantidades de material sedimentado no afectará al procedimiento.

6. Añadir 1 tableta Inhibitex a cada muestra y vórtice inmediatamente y continuamente durante 1 min a hasta que la tableta se suspenda completamente. Incubar la suspensión durante 1 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar la muestra a toda velocidad durante 3 min.
8. Pipetear todo el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL (no incluido) y desechar el sedimento. Centrifugar la muestra a máxima velocidad durante 3 min.  
Transferencia de pequeñas cantidades de material granulado de la etapa 7 no afectará al procedimiento.
9. Pipetear 15  $\mu$ L de proteinasa K en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL (no incluido).
10. Pipetear 200  $\mu$ L sobrenadante de el paso 8 en el tubo de microcentrífuga de 1.5 mL que contenía la proteinasa K.
11. Añadir 200  $\mu$ L Buffer AL y agitar durante 15 seg.  
**Nota:** No agregue proteinasa K directamente al Buffer AL.  
Es esencial que la muestra y el tampón de AL se mezclen completamente para formar una solución homogénea.
12. Incubar a 70 C durante 10 min.  
Centrifugar brevemente para eliminar gotas del interior de la tapa del tubo (opcional)
13. Añadir 200  $\mu$ L de etanol (96-100%) al lisado y mezclar con el vórtex.  
Centrifugar brevemente para eliminar gotas del interior de la tapa del tubo (opcional)
14. Etiquetar la tapa de una columna QIAamp spin que se colocara en un tubo colector de 2 mL. Aplicar cuidadosamente el lisado completo de la etapa 13 a la columna de centrifugación QIAamp sin humedecer el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a máxima velocidad durante 1 min.  
Colocar la columna de centrifugación QIAamp en un nuevo tubo de colector de 2 mL y desechar el tubo que contiene el filtrado.  
Cierre cada columna spin para evitar la formación de aerosoles durante la centrifugación. Si el lisado no ha pasado completamente a través de la

Laboratorio de Microbiología y Parasitología

columna después de la centrifugación, se centrifuga de nuevo hasta la columna de centrifugación QIAamp está vacía.

15. Abra cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp y añadir 500  $\mu$ L de AW1 Buffer. Cerrar la tapa y centrifugar a máxima velocidad durante 1min. Colocar la columna de centrifugación QIAamp en un nuevo tubo colector de 2 mL y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
16. Abra cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp y añadir 500  $\mu$ L Buffer AW2. Cerrar la tapa y centrifugar a máxima velocidad durante 3min. Desechar el tubo de colector que contiene el filtrado.  
Nota: Buffer AW2 residual de la elución puede causar problemas para la utilización en PCR, por lo que se recomienda realizar el paso 17.
17. Recomendación: Colocar la columna de centrifugación QIAamp en un nuevo tubo colector de 2 mL (no incluida) y desechar el tubo de colector con el filtrado.  
Centrifugar a máxima velocidad durante 1 min.  
Este paso ayuda a eliminar la posibilidad de un remanente de Buffer AW2.
18. Transferir la columna de centrifugación QIAamp en un nuevo tubo de microcentrífuga rotulado de 1.5 mL (no incluido). Abra cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp y pipeta 100  $\mu$ L Buffer AE directamente en la membrana QIAamp.  
Cierre la tapa y se incuba durante 1min a temperatura ambiente, luego se centrifuga a máxima velocidad durante 1 min para eluir el ADN.<sup>65</sup>



### ANEXO 10: PCR PARA DIAGNÓSTICO DE *BLASTOCYSTIS*

a) Santín y Colaboradores. <sup>(97)</sup>

Se llevó a cabo la amplificación de la SSU rADN del gen de este PCR tiene desarrollado el uso de primers para la conservación de regiones que edita Genbank para la secuencia de nucleótidos de *Blastocystis*.

Los primers de *Blastocystis* son de 505–532 (5' GGA GGT AGT GAC AAT AAATC 3') e inverso 998–1017 (5' TGC TTT CGC ACT TGT TCATC 3'). La amplificación de un fragmento es de 500 (479) bp.

La localización de los primers en referencia a la secuencia de nucleótidos U51151 son a nucleótidos positivos 445–464 y 905–924.

Cada 50- $\mu$ L PCR contiene 1 $\times$  PCR de buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP, 2.5 U Taq, 2.5  $\mu$ L BSA (0.1 g/10 mL) y 1  $\mu$ M de cada primer. Un total de 35 ciclos, consistentes de 95 C por 30 s, 54 C por 30 s y 72 C por 30 s, tiene ejecutado: un paso de calor inicial a 95 C por 4 minutos y un paso al final también incluido a 72 C por 5 min.

Los Productos de PCR se analizan en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio.

Para la determinación de los subtipos 1 y 3, se utiliza el mismo procedimiento, consultando en GenBank, incluyendo el subtipo 1, 351 pb y el 3, 526 pb.<sup>66</sup>

b) ITS

Este primer fue propuesto y elaborado por la D.C. Ghiedani Villalobos, colaboradora en la realización de este proyecto, dándole el nombre de Espaciador transcrito interno (ITS), estandarizó este primer a semejanza del primer Santin.

### ANEXO 11: PURIFICACIÓN DE ADN DE *BLASTOCYSTIS* (KIT AXY PREP PCR CLEAN-UP)

El Kit emplea una solución de unión, junto con una membrana cromatográfica para la recuperación de fragmentos de ADN.

Este producto está diseñado para purificar fragmentos de ADN mayores a 75 pb de PCR's y otras reacciones enzimáticas, con un porcentaje de recuperación del 70-90%.

Todos los buffer son estables por al menos 12 meses a partir de la fecha de recepción cuando son almacenados bajo condiciones ambientales. Evite la exposición directa a la luz solar y temperaturas extremas.

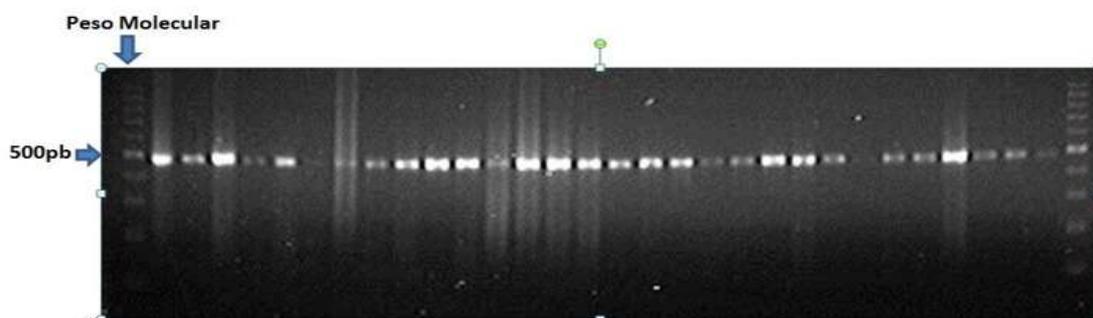
-Buffer PCR-A: Buffer para unir el ADN. Almacenar a temperatura ambiente.

-Buffer W2 concentrado: Buffer para eliminar sales. Antes de usar el kit, agregar el volumen especificado en la etiqueta de la botella y mezclar adecuadamente. Puede utilizarse etanol desnaturalizado al 100% o al 95%. Almacenar a temperatura ambiente.

-Eluyente: Tris-HCl 2.5mM. Almacenar a temperatura ambiente. También puede usarse agua desionizada.

### Procedimiento

1. Agregue 3 volúmenes del Buffer PCR-A a su reacción. Vortexee adecuadamente para homogenizar adecuadamente.
  2. Colocar una columna de PCR en un tubo de microfuga de 2mL (incluido en el Kit). Agregue la reacción del paso 1 a la columna de PCR. Centrifugue a 12000xg por 1 minuto.
  3. Descarte el filtrado del tubo de microfuga de 2mL. Coloque nuevamente la columna de PCR en el tubo de 2mL. Agregue 700µl del Buffer W2 en la columna y centrifugue a 12000xg por 1 minuto.
- Nota: Asegúrese de que el volumen de etanol especificado en la etiqueta de la botella ha sido agregado al concentrado del Buffer W2.
4. Descarte el filtrado. Regrese la columna de PCR al tubo de microfuga de 2mL. Agregue 400µl del Buffer W2 en la columna y centrifugue a 12000xg por 1min.
  5. Transfiera la columna de PCR en un tubo de microfuga limpio de 1.5mL (incluido en el Kit). Para eluir el ADN, agregar 21µL de Agua (pre-calentada a 65C) al centro de la membrana de la columna. Incube a temperatura ambiente pro 1 min. Centrifugue a 12000xg por 1 min.



### ANEXO 12: SECUENCIACIÓN Y COMPARACIÓN DE DATOS CON EL GENBANK.

Los productos de PCR y los insertos clonados se purificaron, se enviaron a secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM. Las secuencias se analizaron a través de programas ad hoc, con los que se obtuvieron los parámetros del polimorfismo, la diversidad nucleotídica, de diferenciación genética y flujo génico. Con el fin de determinar las relaciones evolutivas, se llevaron a cabo diversos alineamientos empleando los programas CLUSTAL W v1.8 o MUSCLE en MEGA v5.01, el editor BioEdit y se compararon con los datos del GenBank.

# GENÉTICA DE LOS SUBTIPOS DE BLATOCYSTIS EN NIÑOS QUE ACUDEN AL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA

Laboratorio de Microbiología y Parasitología

