



Estandarización de un modelo *in vitro* para evaluar la sensibilidad de antiparasitarios contra *Blastocystis spp*

Standardization of an *in vitro* model to evaluate sensitivity of antiparasitics against *Blastocystis spp*

Villafañá-Becerra D,* Martínez-Méndez L,‡ Dávila-Solís B,‡ Jiménez-Jiménez M,‡ López-Martínez B,§ Parra-Ortega I‡

Palabras clave:

Blastocystis spp.,
metronidazol,
sensibilidad a
antiparasitarios.

Keywords:

Blastocystis spp.,
metronidazole,
antiparasitic
sensitivity.

* Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

‡ Departamento de Laboratorio Clínico.

§ Subdirección de Servicios Auxiliares.

Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Correspondencia:
M. en C. Israel Parra-Ortega

Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital Infantil de México «Federico Gómez».

Dr. Márquez Núm. 162, Col. Doctores, Alcaldía Cuauhtémoc, 06720, CDMX. Tel: 5552289917, ext. 9108

E-mail: i_parra29@hotmail.com

Recibido:
03/10/2019

Aceptado:
10/10/2019

RESUMEN

Introducción: *Blastocystis spp.* es un parásito cromista anaerobio, cosmopolita y eucarionte del tracto gastrointestinal de humanos y otras especies. Es el parásito reportado con mayor frecuencia en los exámenes coproparasitológicos (0.8 a 61.8%). Su papel patógeno aún se discute. El tratamiento incluye antiparasitarios como metronidazol o nitazoxanida. Existen pocos reportes acerca de la sensibilidad de *Blastocystis spp.* a metronidazol. **Objetivo:** Estandarizar un sistema *in vitro* para evaluar sensibilidad a antiparasitarios para *Blastocystis spp.* utilizando el medio suero salino de Barret. **Material y métodos:** Se utilizaron 30 aislamientos de pacientes pediátricos, inoculados en el medio de cultivo suero salino de Barret, y se utilizaron las siguientes concentraciones de metronidazol: 0, 125, 500, 1,250 y 2,500 µg/mL. El desarrollo parasitario se determinó mediante conteo de las células viables en el hemacitómetro. La viabilidad se evaluó por exclusión del colorante eosina al 1%, y se realizaron lecturas a 24, 48 y 72 horas. **Resultados:** El desarrollo de *Blastocystis spp.* fue menor para las tres concentraciones de metronidazol con respecto al control negativo; el menor desarrollo se observó en el control positivo a las 24, 48 y 72 horas ($p < 0.0001$). **Conclusiones:** La metodología propuesta permitió evaluar la sensibilidad a metronidazol de *Blastocystis spp.*, la CIM fue 125 µg/mL.

ABSTRACT

Introduction: *Blastocystis spp.*, is an anaerobic, cosmopolitan eukariotic, chromist parasite of the human gut and other species. It is the most frequently reported parasite in coproparasite testing (0.8 to 61.8%). Its pathogenic role it's still being discussed. The treatment includes antiparasitic drugs such as metronidazol or nitazoxanide. There are few reports about *Blastocystis spp.* susceptibility against metronidazol. **Objective:** Standardize an *in vitro* system for evaluating *Blastocystis* susceptibility against antiparasitic drugs, using Barret's saline-serum culture medium. **Material and methods:** 30 samples were inoculated in Barret's saline-serum culture medium, using the following concentrations: 0, 125, 500, 1,250 and 2,500 µg/mL. The parasitic development was determined through viable cell count, in a hemocytometer. The viability was evaluated through exclusion using the colorant eosine 1%, doing lectures at 24, 48 and 72 hours. **Results:** The development of *Blastocystis spp.* it was lower for the three concentrations of metronidazole, with respect to the negative control; the least development was observed in the positive control at 24, 48 and 72 hours ($p < 0.0001$). **Conclusions:** The proposed methodology allowed us to evaluate the susceptibility of *Blastocystis spp.* against metronidazol, MIC was 125 µg/mL.

INTRODUCCIÓN

Blastocystis hominis es un parásito anaerobio, cosmopolita, eucarionte, que habita en el tracto gastrointestinal de los humanos y otras especies y posee un alto grado de transmisión zoonótica.¹⁻³ Se encuentra distribuido ampliamente en todo el mundo y actualmente es el

organismo reportados con mayor frecuencia en los exámenes coproparasitológicos (0.8 a 61.8%).⁴⁻⁶

Este microorganismo eucarionte anaerobio fue descrito y clasificado por primera vez por Alexeieff (1911), quien le dio el nombre de *Blastocystis enterocola* y fue descrito como una levadura (ascomycete) al presentar estructuras

que lo asemejaban a este grupo de hongos.⁷ La especie *hominis* fue sugerida por Emile Brumpt en ese mismo año.¹

En 1991, Zierdt y colaboradores reclasificaron al parásito en el reino protista a partir de sus características morfológicas.⁵ Para 1993, Boreham y Stenzel complementaron los estudios taxonómicos basados en la morfología con los de tipo molecular. Utilizando el gen de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (18SS-rRNA) se comprobó que no se trata de un hongo y se encontró más relacionado filogenéticamente con el grupo de los *Stramenopila* o *Heterokonta* (reino *Chromista*), taxón que incluye a las algas pardas.

En 2009, Irikov y colaboradores propusieron colocar a este organismo en un sexto reino, llamado *Chromista*, incluido en el súper grupo *Chromalveolata*, que como característica tienen la ausencia de flagelos, ser anaerobios, poseer mitocondrias (pero carecer de las enzimas que llevan a cabo la respiración aeróbica) y presentar dos o más núcleos.⁸ Hasta hace poco, la taxonomía para las especies de *Blastocystis* se había basado en el hospedero del que se aislaba (*B. hominis* de humanos, *B. ratti* de ratas, etc.), pero gracias a estudios filogenéticos se ha logrado documentar la ausencia de especificidad de hospedero para *Blastocystis* además de ser morfológicamente iguales entre sí, y por lo tanto, se ha propuesto nombrarlo *Blastocystis spp.*^{1,2,9}

Epidemiología

Blastocystis spp. es un parásito ubicuo y su prevalencia varía entre regiones y países, debido a la amplia distribución geográfica que tiene; puede estar presente en países desarrollados económicamente como en vías de desarrollo.¹

Las frecuencias de infección dependen de las condiciones socioeconómicas de los grupos en los cuales se realiza el estudio. Se han reportado prevalencias de 6.9% en el Reino Unido, en Tailandia de 4-60%, en Indonesia de 34.4%, en España de 7.03% y en Turquía de 0.5-15.24%. Actualmente, *Blastocystis spp.* es considerado como un parásito emergente. En México, se han reportado frecuencias que van de 2.0 a 41.7%. En niños la mayor frecuencia de infección por parásitos intestinales está encabezada por *Blastocystis spp.*, pues se encuentra tanto en niños sanos como en pacientes con manifestaciones gastrointestinales.¹⁰

Las condiciones socioeconómicas, el compromiso inmunológico, la migración, la calidad del agua potable y del agua para beber, la exposición a alimentos contaminados y la higiene personal deficiente son los

principales factores de riesgo asociados con la infección por *Blastocystis spp.*⁴

Variación genética

Presenta una amplia diversidad genética,⁵ debido a esto y a la falta de capacidad para distinguir morfológicamente a las diferentes especies del parásito, se sugiere clasificar a *Blastocystis spp.* en subtipos (ST). Esto se ha logrado gracias a técnicas como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y sus variantes.¹¹ También se han evaluado las SSU-rRNAs (subunidades pequeñas ribosomales). Estas regiones variables y conservadas en 18 SSU-rRNAs constituyen la base para la identificación de relaciones filogenéticas entre las especies y se encuentran correlacionadas con los subtipos y, gracias a esto, se ha reportado la existencia de 17 subtipos en la actualidad.⁸

La diversidad de hospederos en que se puede encontrar es: mamíferos (jabalíes, cerdos, roedores, caballos, humanos), aves, reptiles, anfibios, peces, insectos, etc. y tienen la capacidad de poder cambiar de un hospedero a otro.⁸

De los 17 subtipos que se han registrado hasta ahora, los ST 1-9 infectan humanos. ST1 y ST8 colonizan a humanos principalmente, ST9 sólo se encuentra en humanos y los ST10-17 están presentes en otros hospederos no humanos.¹²

Morfología

Blastocystis spp. presenta seis fases: vacuolar, multivacuolar, avacuolar, granular, ameboide y quística.^{11,13}

Fase vacuolar. Esta forma de *Blastocystis spp.* es la que se encuentra más frecuentemente en heces de individuos infectados. Es esférica y contiene un cuerpo central, que es una vacuola grande que ocupa aproximadamente 90% de la célula, así como posee una pared delgada que limita al citoplasma. El núcleo se encuentra distribuido en la periferia del citoplasma; además esta forma puede presentar hasta siete núcleos.^{8,13}

Fase granular. Tiene una estructura similar a la forma vacuolar, pero con gránulos contenidos dentro del citoplasma y situados al centro en la vacuola central. Los gránulos se pueden clasificar en tres grupos: metabólicos, reproductivos y lipídicos. Los reproductivos y los lipídicos están contenidos en la vacuola central y los gránulos metabólicos se encuentran situados en el citoplasma.⁸

Fase ameboide. Se encuentra como una forma irregular, generalmente con una a dos prolongaciones de la membrana (semejantes a pseudópodos), que le permiten

adherirse a la mucosa intestinal, pero no desplazarse; su tamaño puede variar de 2.6-7.8 μm de diámetro y contiene una vacuola grande en su citoplasma; esta forma puede pasar a la fase de quiste. Ha sido observada en cultivos y ocasionalmente en muestras fecales.^{8,13,14}

Fase quística. Son redondos u ovals y pequeños (3-6 hasta 10 μm) y tienen una pared de multicapas delgada; su citoplasma condensado tiene varios organelos tipo mitocondria y vacuolas de almacenamiento. El número de núcleos que presenta va de uno a cuatro. Es la fase de resistencia del parásito y es una de las formas que se identifican en muestras de heces. Un quiste puede sobrevivir alrededor de un mes expuesto al aire y a una temperatura de 25 °C, lo que permite la diseminación de la infección, y representa la fase infectante para el humano.^{8,15,16}

Fases avacuolar y multivacuolar. Son las formas más dominantes *in vivo* y las más difíciles de identificar en el microscopio, además miden entre 5-10 μm . Se pueden encontrar pequeñas vacuolas y uno o dos núcleos en las formas.^{17,18}

Las formas avacuolares miden aproximadamente 5 μm de diámetro, no contienen vacuola central, contienen de uno a dos núcleos, presentan estructuras tipo mitocondria e inclusiones que están en el interior de la matriz citoplasmática.¹³

Ciclo biológico

El modelo más aceptado inicia con la ingestión de la forma quística e infectante del parásito, se transmite por la ruta fecal-oral entre humanos o entre otras especies. En un hospedero adecuado, *Blastocystis spp.* se desarrolla mediante la exquistación del trofozoito en el intestino grueso, localizándose principalmente en el colon y el ciego.¹⁴

En la luz intestinal, los quistes se desarrollan, primero en la forma vacuolar, y luego se dividen por fisión binaria y puede diferenciarse en fases ameboides, multivacuolares, o formas granulares, antes de pasar a quistes nuevamente. Las formas vacuolares se enquistan en el intestino del hospedero. Las formas multivacuolares pasarán a una forma prequística para generar un quiste de membrana delgada, siendo esta forma una posible causante de autoinfección.^{11,13}

Patogenia

Diversos estudios relacionados con la patogenicidad de *Blastocystis spp.* han generado controversia entre los investigadores que siguen discutiendo si este parásito realmente representa un problema de salud pública.³

La forma amebode de este parásito se encuentra asociada con la causa principal de los síntomas de la blastocistosis, por lo que se le considera como la forma más patógena. El rol de *Blastocystis spp.* como agente patógeno intestinal se relaciona con síndrome del colon irritable y se ha observado asociado a hipoalbuminemia y anasarca, incluso en casos de urticaria aguda y crónica.¹⁹

La asociación estadística entre la detección de *Blastocystis spp.* en heces y el desarrollo de algunas formas clínicas se asume como evidencia indirecta de la patogenicidad de este microorganismo. Hay dos evidencias directas: los individuos con mayor carga parasitaria presentan síntomas con mayor frecuencia y la administración del tratamiento antiparasitario correspondiente conduce, en la mayoría de los casos, a la desaparición de las manifestaciones clínicas.²⁰⁻²²

Los mecanismos de patogenicidad descritos hasta ahora se pueden dividir en:

1. Inducción de secreción de mucinas neutras por las células caliciformes. Se sabe que actúan aumentando la adherencia del parásito a la superficie intestinal.²³
2. Secreción de proteasas dependientes de cisteína. Son predominantemente del tipo cisteíno-dependiente y actúan principalmente en la degradación de la IgA secretoria.
3. Inmunomodulación del hospedero. *Blastocystis spp.* es capaz de producir una respuesta inmune, caracterizada por la producción de citocinas como IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 y la producción de IgE. Este proceso se mantiene en forma crónica en la mucosa intestinal, por lo cual se ha propuesto como causa de dolor abdominal crónico.¹⁷
4. Activación de mecanismos de hipersensibilidad tipo I. Algunos autores han sugerido que esta asociación está vinculada con la activación por moléculas del parásito de un patrón de respuesta Th2, con producción de interleucinas 4, 5 y 13, entre otras, lo que daría lugar a reacciones alérgicas mediadas por IgE. De manera complementaria, también se ha sugerido que *Blastocystis spp.* podría activar la vía alternativa del sistema del complemento, generando moléculas C3a y C5a que actúan sobre mastocitos y basófilos, y estimula la liberación de histamina que contribuye a desencadenar las lesiones cutáneas descritas.^{21,24-26}
5. Aumento de la permeabilidad intestinal (inflamación). La infección por *Blastocystis spp.* puede dar lugar a una disminución de la función de barrera de la pared intestinal y un aumento de la permeabilidad de la mucosa del colon, lo que causa modificaciones en

el citoesqueleto y provoca apoptosis. Esta actividad también se ha descrito en lisados del parásito.²⁷

La microbiota intestinal parece ser esencial para la expresión patógena de organismos entéricos como *Blastocystis spp.*²⁸

Signos y síntomas

Las características clínicas de la blastocistosis son inespecíficas y se manifiestan como dolor abdominal, diarrea aguda/crónica, constipación, fatiga, náuseas, anorexia, y distensión abdominal. La diarrea no se presenta en todos los casos o se alterna con estreñimiento.

Este parásito puede ser identificado en heces de pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Diagnóstico

La identificación de las estructuras de *Blastocystis spp.* se lleva a cabo por microscopia con base en sus características morfológicas a través de la observación directa de materia fecal utilizando diversas tinciones, como por ejemplo la tinción con lugol. Se sugiere utilizar alguna técnica coproparasitoscópica de concentración como la técnica de Faust para aumentar la probabilidad de detección de las estructuras parasitarias.^{8,14}

El cultivo *in vitro* es un método recomendado para la detección y confirmación del parásito. Se utiliza principalmente cuando existe duda en la observación morfológica del parásito.⁴

Tratamiento

Se han utilizado diferentes tipos de medicamentos para tratar esta parasitosis, la mayoría de los estudios reportan el empleo de metronidazol, aunque se han utilizado otros fármacos como nitazoxanida y trimetoprim-sulfametoxazol, entre otros.^{5,29}

El metronidazol es considerado el fármaco de primera elección, pues induce a apoptosis en el parásito y provoca disminución en el tamaño celular, condensación y marginalización de la cromatina, así como vacuolización y formación de cuerpos apoptóticos.³⁰ Con este tratamiento, la mayor parte de los pacientes alcanzan remisión clínica (88%). El metronidazol se indica en dosis que varían desde los 250 hasta los 750 mg tres veces al día, durante 10-14 días.²⁷

Existen reportes que muestran diferencia entre la respuesta clínica y la cura microbiológica en pacientes con blastocistosis tratados con metronidazol. Por un lado, se ha propuesto que puede deberse a la disminución de la

carga parasitaria, lo que produce mejoría clínica, pero sin la erradicación de la parasitosis; por otro lado, el fármaco actúa indirectamente al inhibir otros microorganismos asociados, responsables de algunos signos y síntomas, pero sin erradicar al parásito.³¹

Se ha evaluado la susceptibilidad de *Blastocystis spp.* a fármacos antiparasitarios determinando que, aparentemente, los diversos subtipos del parásito muestran patrones diferentes de susceptibilidad a metronidazol.³

Por lo anterior nos hemos planteado la siguiente pregunta:

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

El objetivo de este trabajo fue estandarizar un sistema *in vitro* para evaluar sensibilidad a antiparasitarios para *Blastocystis spp.* utilizando el medio suero salino de Barret.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se trató de un estudio observacional y descriptivo. Se utilizaron para este trabajo 30 cultivos de *Blastocystis spp.* obtenidos a partir de muestras de heces de pacientes pediátricos, las cuales fueron identificadas como positivas mediante microscopia, con viabilidad mayor a 95%. Los aislamientos se mantuvieron mediante pases cada cuatro días utilizando el medio de cultivo suero salino de Barret (solución salina fisiológica con suero fetal bovino a 10%), el cual se preparó en tubos cónicos de 1.5 mL.

Se ajustaron los cultivos a 200 x 10³ cel/mL mediante conteo en hemacitómetro y la viabilidad se determinó por exclusión del colorante eosina a 1%; se consideraron viables las células sin teñir, y no viables las que se colorearon de rosa. Se realizó el conteo de 100 células y la viabilidad se reportó en porcentaje.

Se prepararon los diferentes sistemas de prueba para sensibilidad a metronidazol, incluyendo testigos positivo y negativo, de acuerdo con la *Tabla 1*.

Se incubaron los sistemas a 37 °C y se evaluó el desarrollo parasitario mediante conteo de células viables en hemacitómetro, a las 24, 48 y 72 horas.

El plan de análisis estadístico incluyó un análisis de varianza de dos colas con el programa GraphPad Prism V.6.

RESULTADOS

En este trabajo se incluyeron 30 cultivos provenientes de heces de pacientes pediátricos; se solicitó la bús-

queda intencionada de parásitos y se identificaron por microscopia formas vacuolares de *Blastocystis spp.* El promedio de edad de los niños fue de 11 años con un rango de uno a 18, y 50% fue del género femenino. Se logró observar el desarrollo de fases vacuolares de *Blastocystis spp.* en todos los sistemas de prueba como se muestra en la *Figura 1*.

La sensibilidad a metronidazol se determinó mediante la cuantificación en hemacitómetro (*Figura 2*) de las células viables a las 24, 48 y 72 horas.

El desarrollo de *Blastocystis spp.* fue menor para las tres concentraciones de metronidazol (*Figura 3*) con respecto al control negativo, el menor desarrollo de formas parasitarias viables se observó con una concentración de metronidazol de 2,500 µg/mL (control positivo), a las 24, 48 y 72 horas ($p < 0.0001$), se decidió modificar la escala empleando escala logarítmica para apreciar los datos (*Figura 4*), en esta gráfica debido al cambio de escala quedaron fuera 85 puntos.

Tabla 1: Concentración de metronidazol µg/mL.

Control (-)	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Control (+)
0	125	500	1,250	2,500

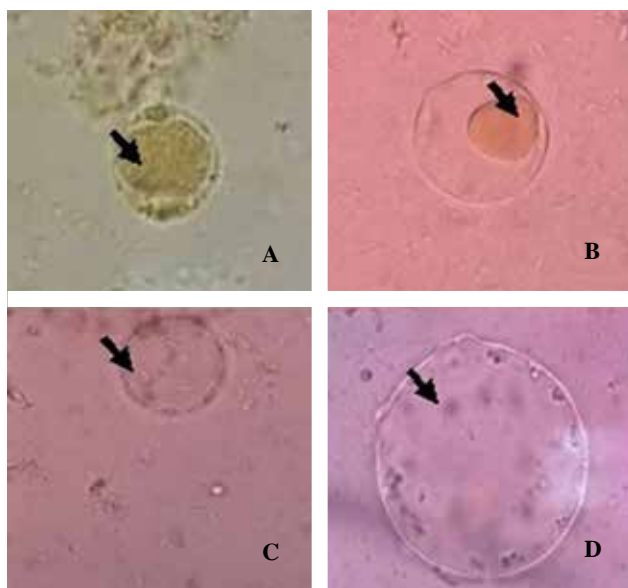


Figura 1: Formas vacuolares de *Blastocystis spp.* A tinción con lugol, B, C y D tinción eosina. Las vacuolas se encuentran señaladas por una flecha. 100x.

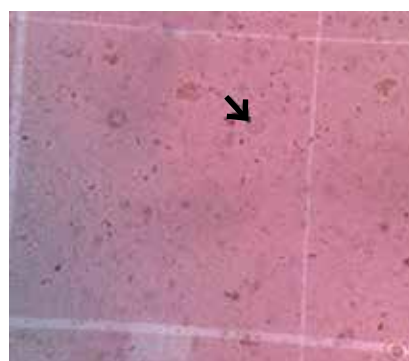


Figura 2: Conteo en hemacitómetro de formas vacuolares de *Blastocystis spp.* 40x.

DISCUSIÓN

Blastocystis spp. es el parásito que actualmente se identifica con más frecuencia en los exámenes coproparasitoscópicos, y aunque su papel patógeno sigue en discusión es necesario proporcionar al médico información que apoye el manejo farmacológico de los pacientes con blastocistosis.

El medio de cultivo utilizado en estas pruebas fue xénico, por lo que se logró obtener buenos resultados en el desarrollo de formas parasitarias de *Blastocystis spp.*; éstas se pueden observar en las imágenes mostradas en la *Figura 1*. Se decidió emplear el medio suero salino de Barret y utilizar sólo un fármaco para fines de estandarización. En este caso fue metronidazol, que es el imidazol más utilizado para tratar infecciones por *Blastocystis spp.*

El desarrollo parasitario se evaluó en un periodo de tiempo 72 horas, con una lectura cada 24 horas a fin de determinar la sensibilidad del parásito al fármaco en relación al tiempo. La evaluación de estos sistemas de cultivo se realizó cuantificando el desarrollo parasitario en el hemacitómetro y midiendo la viabilidad de las células con el colorante vital eosina; así fue posible apreciar las células no viables teñidas de rosa, pues la estructura parasitaria dañada permitió la entrada de colorante.

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza de dos colas con GraphPad Prism 6, y se obtuvo un valor de $p < 0.0001$, lo que implica diferencia significativa al comparar las diferentes concentraciones de metronidazol y del control positivo con el control negativo.

En cada prueba de sensibilidad al metronidazol, se observaron resultados variables con la misma tendencia a la disminución del desarrollo parasitario (*Figuras 3 y 4*).

La concentración inhibitoria mínima CIM para metronidazol, es decir, la menor concentración en donde

se aprecia inhibición parasitaria, fue de 125 $\mu\text{g/mL}$, lo que coincide con lo reportado por Roberts,³² aunque corresponde a la menor concentración empleada en este ensayo y es posible que la CIM se encuentre por debajo de 125 $\mu\text{g/mL}$; de esta manera, se recomienda en un estudio posterior incluir al menos las concentraciones de 64 y 32 $\mu\text{g/mL}$.

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

CONCLUSIONES

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

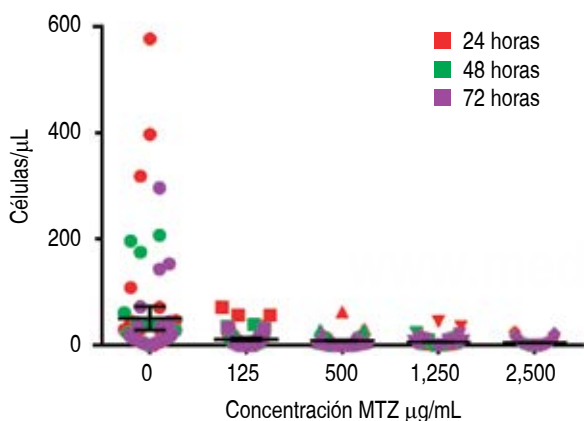


Figura 3: Gráfica concentración de metronidazol versus desarrollo parasitario.

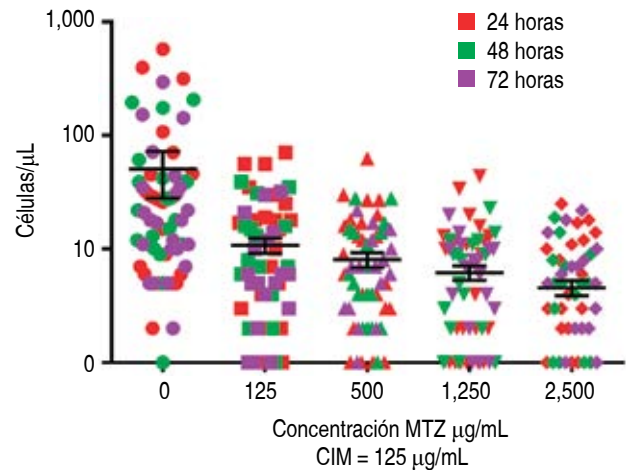


Figura 4: Gráfica concentración de metronidazol versus desarrollo parasitario en escala logarítmica.

REFERENCIAS

1. Tasic N, Milenkovic T, Bujic V, Zdravkovic D, Tasic, A. *Blastocystis hominis*: a mysterious and commonly disregarded parasite. *Facta Universatis*. 2016; 18 (2): 39-47.
2. Sadaf H, Khan S, Urooj K, Asma B, Ajmal S. *Blastocystis hominis*-Potencial diarreico: un agente: una revisión. *IRJP*. 2013; 4 (3): 1-5.
3. Noel C, Dufernez F, Gerbood D. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (1): 348-355.
4. del Coco V, Molina N, Basualdo J, Córdoba M. *Blastocystis spp.*: avances, controversias y desafíos futuros. *Rev Argent Microbiol*. 2017; 49 (1): 110-118.
5. Coyle C, Varughese J, Weiss L, Tanowitz H. *Blastocystis*: to treat or not to treat... *Clin Infect Dis*. 2012; 54 (1): 105-110.
6. Ismail S, Ali I, Fahmy Z, Azmy M, Magdy M. Susceptibility of *Blastocystis hominis* to monolaurine (lauric acid), lactoferine (*Lactobacillus acidophilus*) and metronidazole: an *in vitro* and *in vivo* studies. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2016; 10 (21): 14-25.
7. Cazorla-Perfetti D. *Blastocystis sp.* o *B. hominis*? *Protozoario o Chromista?* Saber. 2014; 26 (3): 343-346.
8. Romero J, Martínez L, Romero J. *Blastocystis spp.*: ¿comensal o patógeno? *Rev Enferm Infecc Pediatr*. 2018; 30 (123): 1243-1248.
9. Lepczyńska M, Białkowska J, Dzika E, Piskorz-Ogórek K, Korycińska J. *Blastocystis*: how do specific diets and human gut microbiota affect development and pathogenicity? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017; 36 (1): 1531-1540.
10. Rodríguez E, Mateos B, González J, Aguilar Y, Alarcón E, Mendoza A et al. Transición parasitaria a *Blastocystis hominis* en niños de la zona centro del estado de Guerrero, México. *Parasitol Latinoam*. 2008; 63: 20-28.
11. Zapata-Valencia J, Rojas-Cruz C. Una actualización sobre *Blastocystis spp.* *Revista Gastrohnp*. 2012; 14 (3): 94-100.
12. Salgado-López J, Rodríguez-Bataz E. Identificación molecular y análisis filogenético de *Blastocystis spp.* *Tlamati Sabiduría*. 2016; 7 (2): 1-10.
13. Aguirre A. Aportaciones sobre la ultraestructura de *Blastocystis hominis*. Ensayo bibliográfico. México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional; 2003.

14. Amaya A, Trejo J, Morales E. *Blastocystis spp.*: revisión literaria de un parásito intestinal altamente prevalente. *Rev Univ Ind Santander Salud*. 2015; 47 (2): 199-208.
15. Chandramathi A, Suresh K, Sivanandam S, Kuppusamy U. Stress exacerbates infectivity and pathogenicity of *Blastocystis hominis*: *in vitro* and *in vivo* evidences. *PLoS ONE*. 2014; 9 (5): e94567. doi: 10.1371/journal.pone.0094567.
16. Marcos L, Canales M, Terashima A. *Blastocystis spp.* epidemiology and evidences of its pathogenic role. *Rev Peru Parasitol*. 2011; 19 (1): 317-325.
17. Vichido-Luna M, Toro-Monrajaz E, Montijo-Barríos E, Huante-Anaya A, Cervantes-Bustamante R, Ramírez-Mayans J. *Blastocystis hominis*, un agente patógeno controversial en la génesis de enfermedades gastrointestinales y alérgicas. *Alerg Asma Inmunol Pediatr*. 2016; 25 (3): 78-83.
18. Grecu D, Neagu A, Hărmănescu E, Moglan I. *In vitro* division modalities developed by *Blastocystis hominis* examined with the acridine orange stain. *Analele Științifice ale Universității "Alexandru Ioan Cuza" din Iași, s. Biologie Animală*. 2013; 59: 13-17.
19. Angelov I, Lukanov T, Tsvetkova N, Petkova V, Nicoloff G. Clinical, immunological and parasitological parallels in patients with blastocystosis. *J of IMAB*. 2008; 1: 55-58.
20. Boroom K, Smith H, Nimri H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G et al. Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit Vectors*. 2008; 1 (1): 40. doi: 10.1186/1756-3305-1-40.
21. Tan K. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis spp.* *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21: 639-665.
22. Tan T, Suresh K, Smith H. Phenotypic and genotypic characterization of *Blastocystis hominis* isolates implicates subtype 3 as a subtype with pathogenic potential. *Parasitol Res*. 2008; 104 (1): 85-93.
23. Tse SK, Chadee K. Biochemical characterization of rat colonic mucins secreted in response to *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun*. 1992; 60 (4): 1603-1612.
24. Charo I, Ransohoff M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006; 354 (6): 610-621.
25. Fabian I, Kletter Y, Mor S, Geller-Bernstein C, Ben-Yaakov M, Volovitz B et al. Activation of human eosinophil and neutrophil functions by haematopoietic growth factors: comparisons of IL-1, IL-3, IL-5 and GM-CSF. *Br J Haematol*. 1992; 80 (2): 137-143.
26. Elwakil H, Hewedi I. Pathogenic potential of *Blastocystis hominis* in laboratory mice. *Parasitol Res*. 2010; 107 (3): 685-689.
27. Sekar U, Shanthi M. *Blastocystis* consensus of treatment and controversies. *Trop Parasitol*. 2013; 3 (1): 35-39.
28. Lepczyńska M, Bialkowska J, Dzika E, Piskorz-Ogórek K, Korycińska J. *Blastocystis*: how do specific diets and human gut microbiota affect development and pathogenicity? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017; 36 (1): 1531-1540.
29. Salinas J, Vildozola H. Infección por *Blastocystis*. *Rev Gastroenterol Perú*. 2007; 27: 264-274.
30. Eida O, Hussein E, Eida A, El-Moamly, Salem A. Evaluation of the nitric oxide activity against *Blastocystis hominis* *in vitro* and *in vivo*. *J Egypt Soc Parasitol*. 2008; 38 (2): 521-536.
31. Batista L, Pérez-Jove J, Rosinach M, Gonzalo V, Saiz E, Loras C et al. Low efficacy of metronidazole in the eradication of *Blastocystis hominis* in symptomatic patients: case series and systematic literature review. *Gastroenterol Hepatol*. 2017; 40 (6): 381-387.
32. Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis spp.* *Gut Pathogens*. 2014; 6 (7): 1-9.