

***Blastocystis* sp. en humanos: actualización y experiencia clínico-terapéutica**

Nathalie Chacón¹, Carmen Durán², María Antonia De la Parte³

¹ Profesor Titular. Cátedra de Medicina Tropical y Sección de Geohelminthiasis. Escuela de Medicina Luis Razetti, IMT Facultad de Medicina UCV.

² Profesor Asistente, Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina Luis Razetti, IMT Facultad de Medicina UCV.

³ Profesor Titular. Cátedra de Microbiología. Escuela de Enfermería. Facultad de Medicina, UCV.

RESUMEN

Blastocystis sp. es uno de los parásitos del humano más frecuentemente identificados en el laboratorio clínico durante el estudio parasitológico de las muestras de heces. En esta revisión se actualizan los aspectos relativos a la diversidad genética y especificidad del huésped, la taxonomía, caracterización molecular, formas clínicas y experiencia terapéutica en pacientes inmuno-competentes y comprometidos, sintomáticos y asintomáticos, de la consulta de la Sección de Geohelminthiasis del Instituto de Medicina Tropical de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, proponiendo el secnidazol como droga de primera elección. Se analiza la presencia de *Blastocystis* como patógeno humano o como comensal, formando parte de la microbiota intestinal. Se considera la tendencia actual entre los diferentes grupos de investigación a mirar la blastocistosis como un problema de salud pública en lugar de una entidad clínica frecuente y se incluyen elementos que pudieran reforzar esta visión. Se incluyen las medidas que pudieran contribuir a prevenir la parasitosis. Dado que la investigación sobre este parásito progresa rápidamente, se recomienda realizar revisiones frecuentes para mantener actualizados los conceptos relacionados con su epidemiología, diagnóstico, tratamiento y prevención en el paciente inmunocompetente así como en el inmunosuprimido.

Palabras clave: *Blastocystis* sp, blastocistosis, parasitosis intestinales, fármacos antiparasitarios.

SUMMARY

Blastocystis sp. is one of the human parasites most frequently identified in the clinical laboratory during the parasitological study of stool samples. This review updates the aspects related to genetic diversity and host specificity, taxonomy, molecular characterization, clinical forms and therapeutic experience in symptom free and symptomatic immune-competent and compromised patients who attended to the Soil Transmitted Helminth Section of the Institute of Tropical Medicine of the Faculty of Medicine of the Central University of Venezuela, proposing secnidazole as the drug of first choice. The presence of *Blastocystis* as human pathogen or as part of the gut microbiota, are analyzed. The current trend among the different research groups is to look at Blastocystosis as a public health problem rather than a common clinical entity and include elements that could reinforce this view. Measures that could help prevent parasitic disease are also included. Since research on this parasite is progressing rapidly, frequent reviews are recommended to keep the concepts related to its epidemiology, diagnosis, treatment and prevention updated in the immunocompetent as well as the immunosuppressed patient.

Key words: *Blastocystis* sp, Blastocystosis, Intestinal parasites, Antiparasitic agents

INTRODUCCIÓN

Uno de los protista cuya significancia clínica no era relevante, hasta hace poco, es el denominado *Blastocystis* sp. (antes *Blastocystis hominis*), considerado no patógeno. Los últimos estudios de secuenciación han permitido a través del método de código de barras llamado *barcoding*, la amplificación de PCR de una sola ronda (*single-round PCR amplification*) y la secuenciación de genes de subunidades pequeñas de ARN ribosomal

Dirección: Sección de Geohelminthiasis. Instituto de Medicina Tropical. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
Teléfono + 58 212 6053555
Correo electrónico: secciondegeohelminthiasis@gmail.com

(sequencing of partial small subunit ribosomal RNA genes) de *Blastocystis* spp. ⁽¹⁾ en individuos, con o sin síntomas gastrointestinales. Se han logrado identificar más de 20 subtipos (linajes ribosomales) y diversos alelos de los subtipos (variación de subtipos). Por varios años, la controversia sobre el papel patogénico de este microorganismo se mantuvo. Tanto bioanalistas como clínicos, lo consideraron un comensal. En 1987, se reportan diarreas posiblemente atribuidas a la presencia de *Blastocystis* sp como único agente, en pacientes con viajes recientes a países subdesarrollados ⁽²⁾. Hoy en día, el *Blastocystis* sp es considerado un agente patógeno. La interrelación entre el sistema inmunitario del individuo y el grado de virulencia demostrado por el subtipo infectante podría estar determinando el abanico clínico y la respuesta a los fármacos en cada individuo. También continúa la controversia sobre si la presencia de *Blastocystis* en el intestino constituye infección o colonización. Esta idea, nos hace pensar sobre si es necesario tratar siempre a un paciente con *Blastocystis* sp. ¿Un paciente inmunocompetente, deberá ser tratado si presenta blastocistosis? ¿Debemos tratar siempre a los inmunocomprometidos? ¿Será que la decisión de tratar va a depender del subtipo del agente etiológico o de la condición de inmunológica del paciente? El estrés crónico ha sido demostrado experimentalmente en animales como un factor determinante en la inmunosupresión ⁽³⁾. Este estudio demostró un aumento de la patogenicidad y de la carga parasitaria de *Blastocystis* en los animales infectados y estresados. Se evidenció un aumento del número de quistes, del nivel de la IgE y un aumento de las proteínas de oxidación. Nuestro trato con pacientes externos ha permitido observar que los pacientes que manejan un estilo de vida estresante, en forma crónica, tienden a tener mayores cargas parasitarias de *Blastocystis* sp. y son de difícil resolución terapéutica. En este tipo de pacientes se recomienda la terapia psico-emocional, como co-adyudante en la respuesta terapéutica al fármaco antiparasitario.

Se han publicado muchos trabajos, tipo resumen, sobre el *Blastocystis* sp. ⁽⁴⁻⁷⁾ en el idioma universal de la ciencia, el inglés y muy pocos en castellano, por lo que la intención de este artículo es hacer una revisión del tema y combinarlo con la experiencia clínica y farmacológica, por más de 10 años, del manejo de pacientes infectados y colonizados con *Blastocystis* sp. en la consulta de Parásitos intestinales de la Sección de Geohelmintiasis del Instituto de Medicina Tropical. La revisión incluye biología, taxonomía y subtipos, los posibles mecanismos patogénicos, la clínica,

el diagnóstico y el tratamiento.

Aspectos biológicos del parásito

Blastocystis sp. es uno de los parásitos más frecuentemente identificados en el laboratorio clínico durante el estudio parasitológico de las muestras de heces humanas. Estos aislados humanos, generalmente son denominados *Blastocystis hominis*, taxonomía binomial que algunos autores prefieren no utilizar debido a la variabilidad genética y especificidad de huésped identificadas ^(1,8).

Morfología

Recientemente, se han identificado que las especies de *Blastocystis* producen quistes, los cuales pueden desarrollarse dentro de formas vegetativas (avacuolar y multivacuolar) ⁽⁹⁻¹¹⁾. El quiste, llega a medir entre 3 y 6 μm . Ha sido aislado de varios hospedadores vertebrados, aparte del hombre. Dentro del amplio espectro de formas evolutivas que presenta *Blastocystis* sp. se conoce la forma vacuolar; esta comprende una gran vacuola central la cual ocupa una porción del espacio celular, limitando al citoplasma y otros componentes intracelulares a la periferia del mismo. Esta forma muestra un amplio rango de tamaño que va desde 3 μm hasta 120 μm de diámetro ⁽¹²⁾. En estudios coprológicos en humanos, se ha determinado un diámetro entre 4 y 63 μm ^(13,14), aunque algunos autores la denominan, forma de cuerpo central (FCC) ⁽¹⁵⁾; estudios previos han relacionado a la FCC, específicamente, con muerte celular programada; este morfotipo presenta una mitocondria única en forma de roseta ⁽¹⁶⁾.

Por otro lado, la forma granular presenta un rango de diámetro entre 15 y 25 μm , llegándose a reportar hasta 80 μm ; exhibe gránulos en el centro del citoplasma, los cuales se han descritos como: metabólicos, reproductivos y lipídicos ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Por su parte, la forma ameboide es más pequeña, midiendo alrededor de 10 μm y presenta pseudópodos, aun así no presenta actividad de locomoción ⁽²⁰⁾.

Mecanismos de infección

El mecanismo de infección descrito sugiere ingesta de alimentos y aguas contaminadas con quistes. Posterior a la ingesta de estos, en el duodeno por acción de los jugos gástricos, es liberada la forma vacuolar ⁽²¹⁾. Dado que la forma ameboide, avacuolar y multivacuolar, ha sido encontrada en heces diarreicas de algunos hospedadores, se propone que esta morfología juega un papel importante en la patogenicidad

(22). La forma vacuolar se enquistada en el lumen intestinal, formando quistes que salen junto con las heces al medio externo.

Reproducción

Se informa que la reproducción de *Blastocystis* incluye, fisión binaria, fisión múltiple, endodiogenia y esquizogonia (23). La fisión binaria ha sido descrita en la forma vacuolar (24); se propone la endodiogenia y la esquizogonia, como el mecanismo de reproducción para la forma granular (25), sin embargo, faltan estudios concluyentes.

Taxonomía

Con el advenimiento de la biología molecular a partir del año 1996, se ha procurado dar a este organismo un “acertado” lugar taxonómico. Análisis moleculares de las subunidades pequeñas del ARN ribosomal, (SSU-rRNA) y el factor de elongación 1 α , autores (26) ubican a este organismo como un eucariota, dentro del phylum, Heterokontophyta (27). Alrededor de 100 000 organismos constituyen el phylum Heterokontophyta, comúnmente denominado heterokonto o estramenófilo. Dentro de los organismos pertenecientes a este grupo se puede mencionar: algas, diatomeas, mohos mucilaginosos y oomicetos; *Blastocystis* es un nuevo miembro de este grupo complejo (20,28). Sin embargo, a pesar de su inclusión dentro del mismo, presenta discrepancias morfológicas con otros organismos, de esta manera se puede establecer que los estramenófilos, por ejemplo, presentan flagelo, al igual que los mastigófora, esta característica está ausente en *Blastocystis*. Por otra parte, algunos autores sugieren colocarlo en un sexto reino, el Chromista(29).

Blastocistosis como zoonosis

Blastocystis es un organismo que ha sido aislado de diversos hospedadores, así encontramos: *B. hominis*, aislado de humanos; *B. ratti*, aislado de ratas; lo que conlleva a suponer una notable transmisión entre animales y humanos (transmisión zoonótica, al igual que otros protozoarios como *Cryptosporidium* spp.) (30). Estas observaciones, también nos acercan a la clasificación de varias especies de *Blastocystis*, mediante el empleo de otras herramientas como microscopía electrónica, analizando elementos ultraestructurales (31,32). La blastocistosis constituye una de las zoonosis más importantes junto a *Cryptosporidium* sp, *Giardia intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi*. Dada su extensa y exitosa radiación adaptativa, han sido identificados subtipos de *Blastocystis* sp. a partir de técnicas

de biología molecular. Basado en el análisis de la subunidad SSU de rDNA, se han descrito al menos 19 subtipos, en sus siglas ST. (1,8 29-32). Dada esta diversidad, se sugiere emplear la nomenclatura “*Blastocystis* species”.

Subtipos de Blastocystis sp

En orden ascendente, los subtipos del ST1 al ST19 han sido descritos en el humano. Sin embargo, no todos los ST son exclusivos de los humanos, ya que ST8, por ejemplo, puede encontrarse en otras especies (33).

A pesar de que los diversos trabajos de subtipaje, no se han obtenidos resultados satisfactorios en relación con los subtipos ST patógenos y no patógenos (1,33). Únicamente, se ha logrado correlacionar subtipos con grados de virulencia.

Otros autores han indicado, por ejemplo, que el ST1, ST3 y ST4 son comunes en Europa, y que además el ST4, no se encuentra en otras regiones. El ST6 es común en Asia y el Medio Este (Egipto, Nepal, Malaisia y Japón) estando ausente en América y Europa (33).

Clasificar a *Blastocystis* sp. por subtipos no aporta todas las respuestas en relación con la patología que podría causar en el hospedador (34-36). La presencia de ciertas formas parasitarias predominantes (forma amebode y/o forma granulosa) en la muestra fecal, en pacientes sintomáticos con diarrea acuosa o con dolor abdominal tipo cólico, llama la atención de varios investigadores (34-37).

Se estudiaron las variaciones del subtipo ST3, observando la presencia de formas ameboides (38,39) en pacientes sintomáticos, cuando uno de los pacientes asintomáticos, quien eliminaba formas de cuerpo central y granulosa, se tornó sintomático coincidiendo con la presencia de formas ameboides en sus muestras de heces. Los pacientes sintomáticos, que asisten a la consulta de parasitosis intestinales de la Sección de Geohelmintiasis del Instituto de Medicina Tropical, generalmente presentan formas granulosas o ameboides y la sola presencia de estas formas parasitarias, constituye uno de los criterios para decidir su tratamiento con fármacos.

Patogenia

La secreción de proteasas y otras enzimas hidrolíticas por *Blastocystis*, identificadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, se les atribuye la responsabilidad de los síntomas gastrointestinales (39,40). Se ha logrado establecer, en medios de cultivo, que *Blastocystis* produce alteraciones citoesqueléticas e induce apoptosis

en las células epiteliales, lo que se traduce en incremento de la permeabilidad⁽³⁹⁾. Las cistein proteasas secretadas por el protozooario, estimulan la mucosa intestinal, produciendo interleuquina 8⁽⁴⁰⁾; este mecanismo, junto con otros, han sido sugeridos como los responsables de la pérdida de líquidos y de inflamación intestinal, en los individuos afectados. Investigadores, han observado la habilidad de cistein proteasas para degradar la inmunoglobulina A secretada por humanos, lo que estimula la evasión de la respuesta inmunológica y promueve la supervivencia del parásito in vivo⁽⁴¹⁾.

Se ha logrado secuenciar todo el genoma del ST7, lo cual ha revelado genes conocidos y desconocidos. Se han logrado identificar genes responsables de inhibir las proteasas del hospedador, alterando su homeostasis. Se han identificado hidrolasas, las cuales son capaces de alterar la capa mucosa del epitelio intestinal, por adhesión^(42,43). Por otro lado, la expresión de las serin proteasas y glico-transferasas, altera la unión de la mucosa del epitelio intestinal, resultando en un incremento en la permeabilidad⁽⁴⁴⁾. Han sido identificados los factores de virulencia de *Blastocystis* sp que producen la anemia por deficiencia de hierro⁽⁴⁵⁾.

Muchos autores le atribuyen el rol de daño a *Blastocystis*, al relacionar, la densidad parasitaria con la severidad de los síntomas clínicos y la duración del daño^(46, 47).

Experiencia Clínica

Formas clínicas agudas y crónicas

Este microorganismo es responsable de cuadros clínicos tanto, asintomáticos como sintomáticos⁽⁴⁸⁾. En pacientes asintomáticos, independiente de la carga parasitaria, se plantea la hipótesis de una colonización del microorganismo versus la infección del mismo. En el caso de la colonización, *Blastocystis* sp.,

no genera ninguna respuesta inmunológica ni produce ningún síntomas en el individuo. En el caso de infección, podría generar una respuesta clínica o inmunológica en determinado momento; el individuo podría convertirse en un paciente sintomático, cuando las condiciones inmunológicas del hospedador o del potencial patógeno, cambien en el transcurso de su evolución clínica⁽⁴⁹⁾.

Cuando un paciente presenta síntomas intestinales, atribuibles a *Blastocystis* sp., debe corroborarse que este microorganismo sea el único patógeno presente y causante de los síntomas⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾; este microorganismo tiende a co-infectar con otros agentes etiológicos de síntomas gastrointestinales que deben ser descartados como: bacterias, virus y hongos.

También se han reportado co-infecciones con otros parásitos intestinales, como han sido reportados en la consulta de la Sección de Geohelmintiasis (Tabla 1). Cuando *Blastocystis* sp. coinfecta con *Cryptosporidium* sp. y *Strongyloides stercoralis* dificulta el tratamiento de ambos agentes oportunistas, en pacientes inmunosuprimidos.

Entre los síntomas agudos encontrados en los pacientes que asistieron en el año 2012 a la Sección de Geohelmintiasis, del Instituto de Medicina Tropical, se citan:

- Síntomas gastrointestinales, caracterizados por dolor abdominal tipo cólico y flatulencia.
- Diarrea acuosa, aguda y en varios episodios por año. Sin deshidratación y muchas veces auto resolutive.
- Otros síntomas menos frecuentes fueron: pacientes ansiosos por su enfermedad, cefalea, rash cutáneo o urticaria, estreñimiento y fatiga.

La mayoría de los pacientes afectados y con síntomas intestinales, tenían una edad comprendida entre los 25 y 45 años. La mayoría de los pacientes trabajaban y realizaban sus

Tabla 1. Co-infecciones en paciente infectados con *Blastocystis* sp. Sección de Geohelmintiasis. Instituto de Medicina Tropical. UCV. 2013-2014.

	<i>Cryptosporidium</i>	Coinfecciones			Total %
		<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Strongyloides tercoralis</i>	Helmintos	
<i>Blastocystis</i>	9	2	4	4	19
Sin (B. sp)	36	4	10	22	72
Total	45	6	14	23	91

Fuente: Datos de la Sección de Geohelmintiasis. 2013-2014

comidas en la calle, no consumía agua potable ni cumplían con el lavado correcto de las manos. En algunos pacientes los síntomas agudos pueden hacerse crónicos y prevalecer por varios meses e incluso años.

En enfermedades crónicas, hemos observado cargas elevadas de *Blastocystis* sp., es decir, más de 5 formas por campo, como por ejemplo en los pacientes HIV-SIDA, sin tratamiento antirretroviral y en los pacientes con micosis profundas, como histoplasmosis y paracoccidiodomicosis (datos no publicados).

Adicionalmente, *Blastocystis* prolifera en el intestino de pacientes con enfermedades inflamatorias de intestino delgado y grueso. Se ha demostrado que este microorganismo es más frecuente en la enfermedad inflamatoria intestinal y en la colitis ulcerativa^(44,51). Y las cargas infectantes son mayores en el síndrome de intestino irritable y en la enfermedad de Crohn's. Esta diferencia no se pudo demostrar con el grupo control no infectado^(36, 52). En los pacientes con enfermedad celíaca, la presencia de *Blastocystis* sp., podría estar relacionada a bajo peso y atrofia de la vellosidades intestinales⁽⁵²⁾. En pacientes con urticaria⁽⁵³⁾ o rash cutáneo, los dermatólogos han observado una mayor frecuencia de *Blastocystis* sp. en sus heces. En el Instituto de Medicina Tropical, en la consulta de Endemias Rurales, descartamos blastocistosis en los pacientes con urticaria. Parte de la terapéutica en estos pacientes incluye el tratamiento antiparasitario es el control de la urticaria se favorece con esta medida diagnóstica y terapéutica. Otras manifestaciones descritas, menos frecuentes incluyen prurito palmo-plantar, angioedema crónico y anemia por deficiencia de hierro^(45, 54, 55).

Diagnóstico integral del paciente con blastocistosis

Diagnóstico Epidemiológico

En la Tabla 2 se resumen los factores predisponentes para la adquisición de la infección por *Blastocystis* sp. También se detallan las medidas preventivas que deben cumplirse para evitar la infección. No existen suficientes trabajos que permitan indicar *prevención basada en la evidencia* de cada una de las medidas higiénico-sanitaria enumeradas, sin embargo, son las recomendaciones que hemos utilizado para contribuir en la disminución o desaparición de la infección parasitaria. El consumo de agua no potable (agua de chorro, de botellón, sin hervir y sin filtrar, agua de manantial, agua del río) es un factor predisponente relevante que ha determinado la infección en nuestros pacientes.

Tabla 2. Epidemiología y Prevención de la Blastocistosis

Factores predisponentes para adquirir Blastocistosis

- Mayor de 18 años.
- Emocionalmente inestable, con síntomas de stress crónico.
- Consumo de agua sin filtrar o sin hervir o directo de la tubería.
- Consumo de agua de botellón.
- Consumo de agua solo tratada con ozono.
- Consumo de agua de manantial infectado zoonóticamente con *Blastocystis* sp.
- Co-lecho o contacto íntimo con un paciente infectado con *Blastocystis* sp.
- Consumo de alimentos con *Blastocystis* sp.
- Contacto con mascotas domésticas.
- Contacto con mascotas exóticas (morrocoy o tortugas, aves, hámster)

Medidas higiénico-sanitarias para prevenir Blastocistosis

- Lavado correcto y frecuente de las manos
- Terapia psicológica para el manejo del stress y el manejo correcto de las emociones.
- Consumir agua clorada, filtrada y hervida.
- Diagnosticar contactos del paciente infectado con *Blastocystis* sp.
- Evitar comida infectada con *Blastocystis* sp.
- Evitar contacto con mascotas, posible fuente de infección.

Fuente: Datos de la Sección de Geohelminthiasis. 2013-2014

Diagnóstico de Laboratorio

El diagnóstico de laboratorio se realiza con un examen coproparasitológico seriado según se ha descrito antes⁽⁵⁶⁾.

Se deben emplear la técnica directa y una técnica de concentración. Para fines de investigación y de verificación de cura parasitológica, se debe realizar el cultivo de heces.

Examen directo: consiste en la realización de un examen macroscópico de las características físicas de las heces y el análisis microscópico mediante un examen directo con solución salina (SS) y lugol. Este examen es utilizado para el diagnóstico de las diferentes formas evolutivas de los *Blastocystis* sp. Se coloca una gota de SS al 0,85 % en el tercio del lado izquierdo de la lámina y en el tercio del lado derecho se coloca una gota de lugol. Con un aplicador de madera se mezcla aproximadamente 2,0 mg de materia fecal en cada preparación, una vez finalizado se cubre con laminillas para ser observadas al microscopio de luz con objetivos de 10X y 40X.

Técnica de concentración por Formol-Acetato de Etilo (FEA): Consiste en una técnica de concentración por centrifugación, utilizando

agitación por vórtex en presencia de acetato de etilo, luego centrifugación y observación del sedimento. Es una técnica de concentración por sedimentación empleada para concentrar formas evolutivas de los *Blastocystis* sp. Se toman aproximadamente 2 gramos de heces y se colocan en un vaso plástico de 1 onza, se le agrega 10 mL de formalina al 10 %. Se homogeniza. Se cuele la suspensión a través de una gasa mojada y se coloca en otro vaso. Colocar en un tubo de ensayo de 10 mL la muestra y agregar 3 mL de acetato de etilo y 0,1 mL de tritón. Centrifugar a 2000 rpm (500 g) por 10 minutos. Se descarta el sobrenadante, conservando ½ mL. Se mezcla el sedimento y se observa al microscopio hasta agotamiento.

Se recomienda reportar el número y los diferentes tipos de formas evolutivas que se observen en el examen directo por campo observado. Esta cuantificación es importante antes y 15 días después del tratamiento farmacológico. En el FEA, también deben reportarse las formas evolutivas observadas.

La forma evolutiva más frecuentemente reportada es la forma de cuerpo central sola o acompañada de la forma granulosa. Las otras combinaciones de formas evolutivas incluyen la presencia del quiste o de la forma globulosa. El quiste fue la forma más frecuente posterior a la terapia farmacológica con secnidazol reportado en un trabajo publicado previamente ⁽³⁴⁾.

Tratamiento presente y expectativas futuras respecto al tratamiento

El fármaco de primera elección a nivel mundial para el *Blastocystis* sp. ha sido el metronidazol ⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾. Algunos autores cuestionan si se debe tratar o no al paciente infectado y si es necesario erradicar al parásito del intestino ⁽⁵⁸⁾. Nuestra experiencia no ha sido satisfactoria con el metronidazol, pero sí con un derivado imidazólico de la misma familia, como lo es el secnidazol ⁽³⁴⁾. Los objetivos del tratamiento en un paciente que asiste al Instituto de Medicina Tropical han sido sintetizados así:

- Lograr la curación clínica, aunque no la parasitológica.
- Disminuir el número de formas evolutivas por campo.
- Disminuir el número de recidivas y las visitas a la consulta médica por causa de la infección de *Blastocystis* sp.
- Mejorar la condición clínica gastrointestinal y el pronóstico de vida en pacientes inmunosuprimidos.
- Contribuir con el mejoramiento de la calidad de vida.

Estos objetivos pueden ser alcanzados entre 6 meses o hasta un año, dependiendo de las condiciones patogénicas del parásito, del estado inmunológico y psico-emocional del paciente tratado. El cumplimiento de las medidas higiénico-sanitarias es fundamental para evitar la auto-infección o reinfección en el individuo tratado.

Nuestra experiencia en el tratamiento de la blastocistosis, incluye monoterapia con un medicamento de primera elección, el secnidazol (Tabla 3). En dos esquemas (A y B) distintos de tratamiento, según la edad y la gravedad de los síntomas clínicos. El tratamiento de segunda línea es con trimetoprim-sulfametoxazol por 10 días: TMP 5 mg/kg, SMX 25 mg/kg dos veces al día, en niños y TMP 160 mg/SMX 800 mg, dos veces al día, en adultos. En caso de pacientes inmunosuprimidos (Tabla 4), co-infectados con parásito oportunista y sin respuesta terapéutica adecuada para este último o si el paciente no mejora su calidad de vida, se puede emplear una triple terapia con secnidazol según esquema B, si es adulto y A si es niño; furazolidona por 10 días (adultos: 100 mg, tres veces al día por 10 días. En niños: 5-7 mg/kg/peso) y nitazoxanida por 10 días (adultos: 500 mg, dos veces al día, niños: Dosis ponderada: 7,5 mg/kg. Dosis por edad 1-4 años 100 mg (5 mL y de 5-11 años: 200 mg (10 mL) cada 12 horas con las comidas, por 10 días.

En Europa, se han propuesto tratamientos experimentales por enemas colónicos en pacientes adultos, con pocos efectos adversos. La triple terapia de nitazoxanida, secnidazol y furazolidona utilizada como infusión colónica ha

Tabla 3. Tratamiento empleado en los pacientes inmunocompetentes infectados con *Blastocystis* sp. Sección de Geohelmintiasis. Instituto de Medicina Tropical. 2013-2014.

Fármaco: secnidazol	Pacientes	
	Sintomáticos: en ayunas	Asintomáticos
Niños	30 mg/kg de peso, día 0 y 15 (Esquema A)	Si solo presenta formas cuerpo central, en
Adultos	2 gramos, días 0 y 15 (esquema A), días 0 y 3 repetir a los 15 días (esquema B), según severidad de los síntomas	número menor de 5 por campo, no requiere tratamiento farmacológico.

Tabla 4. Triple terapia empleada en los pacientes inmunocomprometidos infectados con *Blastocystis* sp y coinfectados con otros parásitos. Sección de Geohelminthiasis. Instituto de Medicina Tropical. 2013-2014

Fármacos	Paciente sintomático
Secnidazol	Esquema A o B (ver tabla 3)
Furozolidona	Adultos: 100 mg cada 8 horas por 10 días. Niños: 5-7 mg/kg/peso por 10 días.
Nitazoxanida	Adultos: 500 mg cada 12 horas por 10 días. Niños menores de 1-4 años: 100 mg cada 12 horas por 10 días. Mayores de 5-11 años: 200 mg cada 12 horas por 10 días

Nota: Deben tratarse las co-infecciones con fármacos de primera elección.

sido efectiva para erradicar el *Blastocystis* sp. en pacientes cuya terapia oral había fallado ⁽⁶⁰⁾.

Nosotros como equipo de trabajo multidisciplinario, recomendamos terapia psicológica a los pacientes que se encuentran ansiosos o emocionalmente inestables por causas como el estrés. El estrés ha sido demostrado como un factor determinante en fallas de respuesta inmunológica innata y efectora, celular y humoral, en el modelo murino ⁽³⁾. Posiblemente, esta evidencia contribuya al aumento de la carga parasitaria en pacientes infectados con *Blastocystis* sp. y cuyos trastornos psico-emocionales estén presentes.

Discusión y recomendaciones para la prevención

Pacientes con inmunodeficiencia variable común, en sus siglas en inglés CVID, desarrollan diarrea y complicaciones del sistema gastrointestinal (GIS) como la segunda causa de morbilidad, después de las afecciones del tracto respiratorio ⁽⁶¹⁾. La experiencia clínica, en la atención de pacientes con blastocistosis ha permitido observar que las infecciones sintomáticas con *Blastocystis* son más frecuentes en pacientes inmunosuprimidos, por causa de co-morbilidades como infecciones por VIH-SIDA, enfermedades oncológicas, trasplantados, por uso de inmunosupresores o por abuso de esteroides. En un estudio para verificar los parásitos

responsables de los trastornos GIS en los pacientes CVID, se encontró al *Cryptosporidium* spp, como el parásito más prevalente de causar diarrea crónica seguido de *Giardia* y *Blastocystis* sp. ⁽⁶¹⁾.

Sin embargo, en los pacientes inmunocompetentes, con infecciones sintomáticas por *Blastocystis* sp., observamos que el estrés de carácter crónico, constituye una causa de inmunosupresión, tan importante, como en el paciente inmunosuprimido por otras causas. El primer trabajo que ha evidenciado el efecto del estrés sobre la infectividad y patogenicidad de *Blastocystis* sp. en el hospedador, modelo animal, fue publicado en 2014 ⁽³⁾ y ha sido evidenciado en humanos sometidos a inmunosupresión ⁽⁶²⁾. Algunos autores han llegado a considerar a *Blastocystis* sp. un agente oportunista ⁽⁶³⁾.

En ambos tipos de pacientes, estresados e inmunosuprimidos, las cargas parasitarias tienden a ser más elevadas y la resolución terapéutica es mucho más difícil para el médico tratante.

Cuando un individuo sintomático tiene *Blastocystis*, le decimos que tiene blastocistosis. Sin embargo, ningún síntoma ha sido demostrado ser específico, como causa-efecto, de ser el *Blastocystis* responsable directo de determinarlo. Principalmente, en pacientes con síndrome del intestino irritable ⁽⁶⁴⁾, enfermedad inflamatoria del intestino y en algunos casos de urticaria crónica ⁽⁶⁵⁾ se ha demostrado la presencia de *Blastocystis* como posible inductor de los síntomas ^(53,61). Pero la desaparición de *Blastocystis* o disminución de la carga no determina la desaparición de la enfermedad intestinal ⁽⁶⁵⁾.

Es común encontrar individuos sanos con *Blastocystis* sp. Cuando nos referimos a individuos sanos, nos referimos a que son individuos asintomáticos en relación con la ausencia de síntomas gastrointestinales, incluyendo la diarrea. Se estiman más de un billon de personas con la presencia de *Blastocystis* en sus intestinos y la mayoría son asintomáticos. Se ha iniciado el debate mundial entre los investigadores de esta área, si este microorganismo podría formar parte de la microbiota del intestino ⁽⁶⁶⁾. En estos individuos se podría hablar de una colonización asintomática. Si estos individuos son portadores y responsables de mantener la infección en la comunidad, siendo la fuente de infección para nuevos individuos susceptibles, aun faltarían estudios que demuestren este hecho.

Por todo lo dicho antes, ¿cómo podríamos nombrar a un portador de *Blastocystis* sp. asintomático? En este caso, podría tratarse de una colonización asintomática y como no causa

daño, no sería una infección. Y al individuo con *Blastocystis* sp y sintomático, podríamos llamarlo infectado con *Blastocystis*, como posible inductor de la patología y resultante en el desarrollo de los síntomas ⁽⁶⁶⁾.

Como podemos ver, existen múltiples interrogantes en relación a cómo enfocar la problemática del *Blastocystis*. El nuevo enfoque está relacionado a elevar la condición clínica a una perspectiva de salud pública ^(66,67). Y nos preguntamos, si la blastocistosis constituye un problema de salud pública. Si se cumplen las tres condiciones, que detallamos a continuación, podría ser considerada un problema de salud pública:

Cuando constituye una causa común de morbilidad o mortalidad. La blastocistosis, presenta una elevada prevalencia en pacientes infectados, sintomáticos y asintomáticos.

Cuando existen métodos eficaces de prevención y de control para evitar la infección. El método que ha demostrado ser útil en el control de esta infección es el consumo del agua potable ⁽⁶⁸⁾ y en muchas comunidades endémicas para la blastocistosis no existe el agua potable.

Cuando dichos métodos no están siendo utilizados de modo adecuado en la comunidad. La no disponibilidad de agua potable para el consumo humano en las diferentes poblaciones donde la blastocistosis es endémica ha determinado una elevada incidencia de la infección. Las otras medidas relacionadas con el control de mascotas o de animales de laboratorio con fines de investigación, las normas higiénicas como el lavado correcto de las manos no han demostrado su efecto en la variación de la incidencia de esta infección.

La disponibilidad y uso de medidas sanitarias como el debido tratamiento del agua para hacerla potable está asociada a la menor probabilidad de infecciones por protozoarios intestinales ⁽⁶⁸⁾. Aquellas intervenciones que se enfoquen en el uso de agua potable y en el cumplimiento de las medidas higiénicas, unido al cumplimiento de hábitos higiénicos, deberán ser mantenidas, con el fin de mantener el control de las infecciones por protozoarios.

En relación al tratamiento de elección, de primera línea, recomendamos el secnidazol, usando el esquema A y B, según la carga parasitaria y las formas evolutivas presentes en la muestra de heces.

Los pacientes asintomáticos y con cargas menores a 5 formas por campo de FCC, no requieren tratamiento, en ese momento. Se les recomienda el cumplimiento estricto de las

medidas preventivas (Tabla 2).

Para los pacientes adultos, tanto estresados como inmunosuprimidos, sugerimos el tratamiento con el esquema B (Tabla 3 y 4), indicando el fármaco de primera elección para las co-infecciones presentes. En el caso de estrongiloidiasis se debe usar ivermectina.

En un estudio "in vitro" para demostrar la respuesta a distintos fármacos contra el *Blastocystis* sp. realizado en un hospital peruano, se comprobó que las concentraciones inhibitorias mínimas para metronidazol y nitazoxanida fueron aceptables y pequeñas cuando se les comparó con trimetoprim sulfametoxazol y eritromicina ⁽⁵⁹⁾. Este estudio no evaluó el secnidazol como fármaco contra el *Blastocystis* sp. Nuestra experiencia clínica con metronidazol no fue aceptable ni mejoró los síntomas en los pacientes, aunado a los efectos adversos del medicamento que determinó el abandono de la terapia (datos no publicados). Otros grupos de investigadores han determinado subtipos resistentes al metronidazol ⁽⁶⁹⁾. La nitazoxanida en nuestra consulta es reservada para los pacientes infectados o co-infectados con *Cryptosporidium* spp.

Los controles *a posteriori* de los tratamientos deberán realizarse a los 15 días de la última toma del fármaco.

La última palabra para el tema de *Blastocystis* sp. no está escrita, esta área de la parasitología, sufre cambios agigantados cada día y lo que hoy decimos sobre la clínica, patogenia y tratamiento, mañana podrá ser distinto o erróneo. Indudablemente el futuro por venir nos dará las respuestas apropiadas para el bienestar de nuestros pacientes.

REFERENCIAS

1. Stensvold CR, Clark CG. Molecular Identification and Subtype Analysis of Blastocystis. *Curr Protoc Microbiol.* 2016;43:20A.2.1-20A.2.10.
2. Kain KC, Noble MA, Freeman HJ, Barteluk RL. Epidemiology and clinical features associated with Blastocystis hominis infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1987;8(4):235-244.
3. Chandramathi S, Suresh K, Sivanandam S, Kuppusamy UR. Stress exacerbates infectivity and pathogenicity of Blastocystis hominis: In vitro and in vivo evidences. 2014;9(5):e94567.
4. Zierdt CH¹. Blastocystis hominis--past and future. *Clin Microbiol Rev.* 1991;4(1):61-79.
5. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):639-665.
6. Scanlan PD Blastocystis: Past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol.* 2012;28(8):327-334.
7. Stensvold CR¹, Clark CG². Current status of Blastocystis: A personal view. *Parasitol Int.* 2016;65(6 Pt B):763-771.

8. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for Blastocystis subtypes: A consensus. *Trends Parasitol.* 2007;23:93-96.
9. Stenzel DJ, Boreham PF. A cyst-like stage of Blastocystishominis. *Int J Parasitol.* 1991;21:613-615.
10. Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, et al. Experimental Blastocystis hominis infection in laboratory mice. *Parasitol Res.* 1997;83:319-325.
11. Anuar TS, Ghani MK, Azreen SN, Salleh FM, Moktar N. Blastocystis infection in Malaysia: Evidence of waterborne and human-to-human transmissions among the Proto-Malay, Negrito and Senoi tribes of Orang Asli. *Parasit Vectors.* 2013;6:40.
12. Lee MG, Stenzel DJ. A survey of Blastocystis in domestic chickens. *Parasitol Res.* 1999;85:109-117.
13. Dunn LA, Boreham PF, Stenzel DJ. Ultrastructural variation of Blastocystis hominis stocks in culture. *Int J Parasitol.* 1989;19:43-56.
14. MacPherson DW, MacQueen WM. Morphological diversity of Blastocystishominis in sodium acetate-acetic acid-formalin-preserved stool samples stained with iron hematoxylin. *J Clin Microbiol.* 1994;32:267-268.
15. Stenzel DJ, Dunn LA, Boreham PF. Endocytosis in cultures of Blastocystis hominis. *Int J Parasitol.* 1989;19:787-791.
16. Nasirudeen AM, Tan KS, Singh M, Yap EH. Programmed cell death in a human intestinal parasite, Blastocystishominis. *Parasitology.* 2001;123:235-246.
17. Suresh K, Howe J, Ng GC, Ho LC, Ramachandran NP, Loh AK, et al. A multiple fission-like mode of asexual reproduction in Blastocystis hominis. *Parasitol Res.* 1994;80:523-527.
18. Tan KS, Stenzel DJ. Multiple reproductive processes in Blastocystis: Proceed with caution. *Trends Parasitol.* 2003;19:290-291.
19. Tan HK, Zierdt CH. Ultrastructure of Blastocystis hominis. *Z Parasitenkd.* 1973;42:315-324.
20. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:639-665.
21. Dhurga DB, Suresh KG, Tan TC, Chandramathi S. Apoptosis in Blastocystis spp. is related to subtype. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106:725-730.
22. Zhang X, Zhang S, Qiao J, Wu X, Zhao L, Liu Y, et al. Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of Blastocystis hominis. *Parasitol Res.* 2012;110:1165-1172.
23. Zhang X, Qiao JY, Zhou XJ, Yao FR, Wei ZC. Morphology and reproductive mode of Blastocystis hominis in diarrhea and in vitro. *Parasitol Res.* 2007;101:43-51.
24. Stenzel DJ, Boreham PF. Blastocystis hominis revisited. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9:563-584.
25. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. *Nature.* 1996;380:398.
26. Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG. Human parasite finds taxonomic home. *Nature.* 1996;380:398.
27. Riisberg I, Orr RJ, Kluge R, Shalchian-Tabrizi K, Bowers HA, Patil V, et al. Seven gene phylogeny of heterokonts. *Protist.* 2009;160:191-204.
28. Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1998;73:203-266.
29. Noël C, Dufernez F, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Ho LC, et al. Molecular phylogenies of Blastocystis isolates from different hosts: Implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:348-355.
30. Stenzel DJ, Lee MG, Boreham PF. Morphological differences in Blastocystis cysts—an indication of different species? *Parasitol Res.* 1997;83:452-457.
31. Cassidy MF, Stenzel DJ, Boreham PF. Electron microscopy of surface structures of Blastocystis sp. from different hosts. *Parasitol Res.* 1994;80:505-511.
32. Stensvold CR. Blastocystis—genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology. *Trop Parasitol.* 2013;3:26-34.
33. Nagel R, Cuttler L, Stensvold CR, Mills PC, Bielefeldt-Ohmann H, Traub RJ. Blastocystis subtypes in symptomatic and asymptomatic family members and pets and response to therapy. *Intern Med J.* 2012;42:1187-1195.
34. Guzmán de Rondón C, Vethencourt M A, Galindo Pérez M, Chacón N, Wagner C, Nessi Paduani A. Comportamiento biológico de Blastocystishominis en pacientes tratados con Secnidazol (Unidazol®). *Rev Soc Ven Microbiol.* [revista en la Internet]. 2008 Jun [citado 2015 Jun 14];28(1):66-71. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562008000100013&lng=es.
35. Zierdt CH, Tan HK. Ultrastructure and light microscope appearance of Blastocystis hominis in a patient with enteric disease. *Z Parasitenkd.* 1976;50:277-283.
36. Tan TC, Suresh KG. Predominance of amoeboid forms of Blastocystis hominis in isolates from symptomatic patients. *Parasitol Res.* 2006;98:189-193.
37. Vassalos CM, 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;133:251-258.
38. Abdel-Hameed DM, Hassanin OM. Protease activity of Blastocystis hominis subtype 3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitol Res.* 2011;109:321-327.
39. Puthia MK, Sio SW, Lu J, Tan KS. Blastocystis ratti induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infect Immun.* 2006;74:4114-4123.
40. Puthia MK, Lu J, Tan KS. Blastocystis ratti contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappaB-dependent manner. *Eukaryot Cell.* 2008;7:435-443.
41. Puthia MK, Vaithilingam A, Lu J, Tan KS. Degradation of human secretory immunoglobulin A by Blastocystis. *Parasitol Res.* 2005;97:386-389.
42. Mirza H, Tan KS. Blastocystis exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitol Res.* 2009;104:355-361.
43. Denoëud F, Roussel M, Noël B, Wawrzyniak I, Da Silva C, Diogon M, et al. Genome sequence of the stramenopile Blastocystis, a human anaerobic parasite. *Genome Biol.* 2011;12:R29.
44. Poirier P, Wawrzyniak I, Vivarès CP, Delbac F, El Alaoui H. New insights into Blastocystis spp.: A potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002545.
45. Yavasoglu I, Kadikoylu G, Uysal H, Ertug S, Bolaman Z. Is Blastocystis hominis a new etiologic factor or a coincidence in iron deficiency anemia? *Eur J Haematol.* 2008;81:47-50.
46. Hegazy MM, Maklouf LM, El Hamshary EM, Dawoud

- HA, Eida AM. Protein profile and morphometry of cultured human *Blastocystis hominis* from children with gastroenteritis and healthy ones. *J Egypt Soc Parasitol.* 2008;38:453-464.
47. Giacometti A, Cirioni O, Antonicelli L, D'Amato G, Silvestri C, Del Prete MS, et al. Prevalence of intestinal parasites among individuals with allergic skin diseases. *J Parasitol.* 2003;89:490-492.
48. Carrero S, Carrero de Pérez M, Pérez Feo M, Carrero Guerra JE. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en pacientes sintomáticos. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes MedULA.* [revista en la Internet]. 1996 Jun [citado 2015 Jun 14]; 5: 49-56. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos30/prevalencia-blastocystis-hominis-pacientes-sintomaticos/prevalencia-blastocystis-hominis-pacientes-sintomaticos.shtml>.
49. Devera R, Velasco V, Vasquez M, Azacom B, Jimenez M. *Blastocystis* hominis: Criterios de Patogenicidad. *Saber universidad de Oriente.* 2000;12:23-28.
50. Cekin AH1, Cekin Y, Adakan Y, Tasdemir E, Koclar FG, Yolcular BO. *Blastocystosis* in patients with gastrointestinal symptoms: A case-control study. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:122.
51. Yamamoto-Furusho JK1, Torijano-Carrera E. Intestinal protozoa infections among patients with ulcerative colitis: Prevalence and impact on clinical disease course. *Digestion.* 2010;82:18-23.
52. Jiménez OM, Carbonell AE, García OM, Rodríguez LW, Triana FP, Fabián LG. *Blastocystis hominis* in symptomatic celiac patients. *Acta Gastroenterol Latinoam.* 2012; 42(3):175-181.
53. Verma R, Delfanian K. *Blastocystis hominis* associated acute urticaria. *Am J Med Sci.* 2013;346:80-81.
54. Kick G, Rueff F, Przybilla B. Palmo plantar pruritus subsiding after *Blastocystis hominis* eradication. *Acta Derm Venereol.* 2002;82:60.
55. Micheloud D, Jensen J, Fernandez-Cruz E, Carbone J. Chronic angioedema and *blastocystis hominis* infection. *Rev Gastroenterol Peru.* 2007;27:191-193.
56. Chacón N, Contreras R, Márquez W, Salinas R, Romero J. Importancia de la Referencia Médica en el diagnóstico de parasitosis intestinales por métodos coproparasitológicos en la Sección de Geohelminthiasis. *Instituto De Medicina Tropical -Universidad Central de Venezuela.* *Rev Fac Med.* 2007;30:90-96.s
57. Dhurga DB, Suresh K, Tan TC. Granular Formation during Apoptosis in *Blastocystis* sp. Exposed to Metronidazole (MTZ). *PLoS One.* 2016;11(7):e0155390.
58. Kurt Ö, Doğruman AI F, Tanyüksel M. Eradication of *Blastocystis* in humans: Really necessary for all? *Parasitol Int.* 2016 Dec;65(6 Pt B):797-801.
59. Silva-Díaz H, Flores-Esqueche L, Llatas-Cancino D², Guevara Vásquez G, Silva-García T. Frequency and in vitro susceptibility antiparasitic of *Blastocystis hominis* from patients admitted to the Hospital Regional Lambayeque, Peru. *Rev Gastroenterol Peru.* 2016;36(3):197-202.
60. Wettstein AR, Borody TJ, Wee T, Torres M. Novel Intra-colonic Infusion of Three Antiparasite Agents for Resistant *Blastocystis hominis* Infections. Disponible en: <http://www.e-learning.ueg.eu/documents-view.html?eprs%5Br%5D=90831912/2012>.
61. Uysal S, Tunal V, Akdur Öztürk E, Ardeniz Ö, Işıkgöz Taşbakan M, Pullukçu H, et al. Incidence of Parasitic Diarrhea in Patients with Common Variable Immune Deficiency. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 2016;40:67-71.
62. Stensvold CR, Christiansen DB, Olsen KE, Nielsen HV. *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84:883-885.
63. AlFD¹, Hökelek M. [Is *Blastocystis hominis* an opportunist agent?]. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 2007;31(1):28-36.
64. Krogsgaard LR, Engsbro AL, Stensvold CR, Nielsen HV, Bytzer P. The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: A population-based case-control study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015; 13:507-513.
65. Lepczyńska M, Chen WC, Dzika E. Mysterious chronic urticaria caused by *Blastocystis* spp.? *Int J Dermatol.* 2016;55(3):259-266.
66. Andersen LO, Stensvold CR. *Blastocystis* in Health and Disease: Are we moving from a clinical to a public health perspective? *J Clin Microbiol.* 2016;54(3):524-528.
67. Turkeltaub JA¹, McCarty TR 3rd, Hotez PJ. The intestinal protozoa: Emerging impact on global health and development. *Curr Opin Gastroenterol.* 2015;31(1):38-44.
68. Speich B, Croll D, Fürst T, Utzinger J, Keiser J. Effect of sanitation and water treatment on intestinal protozoa infection: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2016:87-99.
69. Mirza H, Wu Z, Kidwai F, Tan KS. A metronidazole-resistant isolate of *Blastocystis* spp. is susceptible to nitric oxide and downregulates intestinal epithelial inducible nitric oxide synthase by a novel parasite survival mechanism. *Infect Immun.* 2011;79(12):5019-5026.