

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y ECOLOGÍA

HETEROGENEIDAD GENÉTICA DE BLASTOCYSTIS
HOMINIS: IMPLICACIONES PATOGENICAS

M^a VICTORIA DOMÍNGUEZ MÁRQUEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2003

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 21 d' Octubre de 2003 davant un tribunal format per:

- D. Enrique Hernández Giménez
- D^a. Concepción Gimeno Cardona
- D. Antonio Clavel Parrilla
- D. J. Guillermo Esteban Sanchís
- D^a. Gloria Royo García

Va ser dirigida per:
D. Rafael Borrás Salvador

©Copyright: Servei de Publicacions
M^a Victoria Domínguez Márquez

Depòsit legal:
I.S.B.N.:84-370-5895-3

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

Universitat de València. Estudi General
Departament de Microbiologia i Ecologia

**Heterogeneidad genética de *Blastocystis hominis*:
implicaciones patogénicas.**

Tesis Doctoral

María Victoria Domínguez Márquez

Valencia 2003



VNIVERSITAT  VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA
SECCION DEPARTAMENTAL DE MICROBIOLOGIA
Av. Blasco Ibáñez 17
46010 VALENCIA
Tel./Fax 96 386 46 57

Rafael Borrás Salvador, Profesor Titular de Microbiología de la Universitat de València (Estudi General) y Jefe de Sección de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia, y Carlos Muñoz Collado, Profesor Titular de Microbiología de la Universitat de València (Estudi General)

Informan,

Que la Tesis Doctoral titulada “Heterogeneidad genética de *Blastocystis hominis*: implicaciones patogénicas”, presentada por D^a. María Victoria Domínguez Márquez, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios de la Sección Departamental de Microbiología de la Facultat de Medicina i Odontologia y del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Y para que así conste, firmamos el presente en Valencia a uno de junio de 2003

Fdo: Prof. Rafael Borrás Salvador

Fdo: Prof. Carlos Muñoz Collado

*A Kike
y a Lucía*

Agradecimientos

Al Dr. Rafael Borrás Salvador, Profesor Titular de Microbiología de la Universidad de Valencia y director de la presente tesis, por su generosa dedicación y las muchas horas empleadas en la elaboración de este trabajo. Gracias por su apoyo y comprensión ante las distintas dificultades acontecidas a lo largo de estos años; para él mi admiración y mi cariño.

Al Dr. Carlos Muñoz Collado, Profesor Titular de Microbiología de la Universidad de Valencia y codirector de esta tesis, por su valiosa colaboración en los primeros ensayos, el ánimo y los consejos recibidos.

A mi compañera y amiga la Dra. Reme Guna, por las confidencias compartidas, por su constante disponibilidad y buen humor, imprescindibles en las horas bajas. A Vicen González y Carmen Bordería, las mejores amigas que se puede tener. A mi amiga Nuria, por su constante interés y por haberme dado la oportunidad de trabajar con ella.

A todo el personal del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia que contribuyeron a hacer más agradables las largas sesiones de trabajo, convirtiendo el laboratorio en mi segunda casa.

A Domingo y María, mi padre y mi madre, por su ayuda incondicional y porque me enseñaron que el esfuerzo merece la pena. A Domi, Ana e Isa, mis hermanos y amigos, por su confianza y apoyo. Gracias a todos porque me alegráis la vida.

A mis amigas pucelanas, Lola y Raquel, que me ayudan a seguir siendo fiel a mis raíces. En recuerdo de Andrés Úbeda, a quién debo el haberme dedicado a la Biología.

A todos los que de alguna manera han contribuido a la realización de esta tesis.

Índice

Índice	página
1. Introducción	1
1.1. Primeras descripciones	2
1.2. Taxonomía y afinidades filogenéticas	3
1.2.1. Diversidad genética críptica	5
1.2.2. Especiación	8
1.3. Características biológicas de <i>B. hominis</i>	10
1.3.1. Morfología	10
1.3.1.1. Morfotipos celulares	11
1.3.1.2. Estructuras celulares	16
1.3.2. Ciclo biológico	21
1.3.3. Cultivo in vitro	24
1.3.3.1. Axenización	26
1.3.3.2. Tiempo de generación	26
1.3.3.3. Criopreservación	27
1.3.4. Características bioquímicas	27
1.4. Inmunobiología	29
1.4.1. Respuesta inmune del hospedador	29
1.4.2. Diversidad antigénica	29
1.4.3. Anticuerpos monoclonales	30
1.4.4. Inmunidad celular	31
1.5. Patogénesis	31
1.5.1. Estudios patogénicos en humanos	33
1.5.2. Efectos en los animales de experimentación	35
1.6. Manifestaciones clínicas	36
1.7. Aspectos epidemiológicos	38
1.7.1. Datos de prevalencia en España	40
1.7.2. Mecanismos de transmisión	40
1.8. Tratamiento	41

Índice	página
1.9. Nuevas perspectivas	44
1.9.1. Muerte celular programada	44
2. Objetivos	47
3. Material y métodos	49
3.1. Origen de los aislados	50
3.1.1. Cepas de colección	50
3.1.2. Aislados recientes	50
3.2. Aislamiento en cultivo de <i>B. hominis</i>	51
3.2.1. Preparación del medio de cultivo	52
3.2.2. Cultivo	53
3.2.3. Proceso de axenización	53
3.2.4. Mantenimiento de los cultivos	54
3.3. Detección de variación genética en aislados de <i>B. hominis</i> mediante análisis de RFLP	55
3.3.1. Procedimiento de extracción de ADN	56
3.3.2. Protocolo de Clark (1997)	57
3.3.2.1. Amplificación	57
3.3.2.2. Restricción enzimática del fragmento amplificado	58
3.3.2.3. Separación electroforética de los productos de restricción	58
3.3.2.4. Análisis e interpretación	59
3.3.3. Protocolo de Böhm (1997)	60
3.3.3.1. Amplificación	61
3.3.3.2. Restricción enzimática del fragmento amplificado	61
3.3.3.3. Separación electroforética de los productos de restricción	61
3.3.3.4. Análisis e interpretación	62
3.4. Detección de variación intraespecífica en aislados de <i>B.</i> <i>hominis</i> mediante PCR, con una única pareja de iniciadores ..	62
3.4.1. Amplificación del ADN con los iniciadores TR ₇ y TR ₈ ..	62

Índice	página
3.4.2. Separación electroforética de los productos de amplificación	63
3.4.3. Análisis e interpretación	63
3.5. Análisis isoenzimático	64
3.5.1. Preparación de geles de poliacrilamida	65
3.5.1.1. Gel de separación	65
3.5.1.2. Gel de depósito	65
3.5.2. Preparación de las muestras	66
3.5.3. Separación electroforética	66
3.5.4. Detección de la actividad enzimática	67
3.5.4.1. Revelado	68
3.5.5. Análisis	69
4. Resultados	71
4.1. Resultados del estudio microbiológico	72
4.1.1. Resultados de los cultivos y de la axenización de <i>B. hominis</i>	75
4.2. Patrones RFLP y ribodemas obtenidos según el protocolo de Clark	77
4.2.1. Patrones de RFLP obtenidos tras restricción con Alu I	78
4.2.2. Patrones de RFLP obtenidos tras restricción con Hinf I	81
4.2.3. Patrones de RFLP obtenidos tras restricción con Rsa I	84
4.2.4. Ribodemas obtenidos siguiendo el protocolo de Clark	87
4.3. Patrones RFLP y ribodemas obtenidos según el protocolo de Böhm	92
4.3.1. Patrones de RFLP obtenidos tras restricción con Alu I	92
4.3.2. Patrones de RFLP obtenidos tras restricción con Hinf I	95
4.3.3. Patrones de RFLP obtenidos tras restricción con Rsa I	98
4.3.4. Ribodemas obtenidos siguiendo el protocolo de Böhm	100

Índice	página
4.4. Análisis conjunto de los ribodemas obtenidos según protocolos de Clark y de Böhm	105
4.5. Análisis de la variación intraespecífica de <i>B. hominis</i> según el protocolo de Init.	107
4.5.1. Patrones obtenidos en los aislados axénicos	109
4.5.2. Patrones obtenidos en los aislados no axénicos	112
4.6. Estudio de poblaciones isoenzimáticas en aislados de <i>B. hominis</i>	113
5. Discusión	119
5.1. Sobre la prevalencia y la obtención de muestras	120
5.2. A propósito de los análisis de RFLP del gen del ARN-16S	121
5.3. Acerca de la variabilidad obtenida según protocolo de Init	125
5.4. A propósito del estudio isoenzimático	127
6. Conclusiones	131
7. Bibliografía	135

1. Introducción

Blastocystis hominis es el agente etiológico de la blastocistosis, una parasitosis intestinal humana muy prevalente, pero de significación clínica incierta. Muy poco conocemos sobre su mecanismo de transmisión, su papel como patógeno primario o su ubicación taxonómica; aspectos que provocan controversia y que han suscitado gran interés en los últimos años.

En la Sección Departamental de Microbiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, se ha desarrollado una línea de investigación sobre *B. hominis*, en la que se ha profundizado en aspectos culturales, morfofuncionales, antigénicos, bioquímicos y patogénicos. Los resultados de estas investigaciones se presentaron en las tesis doctorales de Lanuza (1994), Carbajal (1996) y Villar (1997); así como en artículos publicados en revistas especializadas, aportando datos novedosos y abriendo el camino hacia nuevas hipótesis sobre la diversidad intraespecífica de esta especie.

El objeto de este trabajo es el de obtener nuevos datos sobre las diferencias genéticas e isoenzimáticas en aislados clínicos de *Blastocystis hominis*, y la posible asociación entre las variantes detectadas y distinta capacidad patogénica.

1.1. Primeras descripciones

Este organismo es un protozoo intestinal descrito por primera vez a principios del siglo XX, cuando Alexieff en 1911 realiza la primera descripción escrita y dibujada que satisface los requerimientos de nomenclatura. Describe a *Blastocystis* como un hongo imperfecto de la clase de los Adelomicetos, al que denomina *Blastocystis enterocola* (Zierdt, 1991a). Es Brumpt en 1912, quién trabajaba con material fecal humano, el que acuña el nombre específico de *B. hominis*.

Clasificado durante años como un hongo, y ocasionalmente considerado como una célula degenerada o un artefacto, el único interés en su identificación era el de evitar confusiones con *Entamoeba histolytica*; no

obstante, eventualmente aparecían artículos que lo implicaban en la producción de infección intestinal (Zierdt, 1991a).

El interés biomédico se produce cuando Zierdt *et al.* (1967) retoman su estudio y establecen su naturaleza protozoaria basándose en características culturales, morfológicas y fisiológicas; sugiriendo además su posible papel como patógeno primario.

1.2. Taxonomía y afinidades filogenéticas

Aceptada la clasificación de *B. hominis* como un protozoo, se propusieron diversas posibilidades dentro del Reino Protista. Zierdt y Tan (1976a) consideran que se trata de un esporozoo, pero estudios posteriores demuestran la presencia de pseudópodos y división mediante fisión binaria, lo que supone su reclasificación en el subphylum Sarcodina, y la creación del suborden Blastocystina dentro del orden Amoebida (Zierdt, 1988a). La observación de fisión múltiple y endodiogenia llevaron a Jiang y He (1993), a proponer su inclusión entre los Apicomplexa, en el subphylum Blastocysta, de nueva creación. Zierdt (1993b) consideraba que *B. hominis* mostraba más características propias de los Sarcomastigophora, aunque coincidía en la necesidad de crear un subphylum independiente.

Boreham y Stenzel (1993a) en una interesante revisión, insisten en la necesidad de ahondar en los estudios moleculares, y así evitar clasificaciones basadas únicamente en caracteres morfológicos. Los primeros análisis moleculares que trataron de esclarecer la filogenia de *B. hominis*, se deben a Johnson *et al.* (1989) quienes tras analizar parte de la secuencia del ARN de la subunidad menor ribosomal (ssARNr), y no encontrar relaciones monofiléticas con ningún eucariota, sugieren que debe ser considerado como una especie "*incertae sedis*"; opinión compartida por otros autores (Hollebeke y Mayberry, 1994). Nakamura *et al.* (1996), mediante el análisis de la secuencia aminoacídica del factor de elongación-1 α (EF-1 α), un gen altamente conservado utilizado como marcador filogenético, confirman que no se trata de un hongo.

Silberman *et al.* (1996), tras completar la secuenciación génica de la ssARNr, demuestran que este organismo puede ser incluido entre los Stramenopiles aunque como un miembro inusual, ya que posee mitocondrias tratándose de un anaerobio estricto, y carece de flagelos, que se piensa pudo perder secundariamente. Stramenopiles es sinónimo de Heterokonta, un grupo heterogéneo que incluye “protistas unicelulares y multicelulares de metabolismo heterótrofo o fotosintético”. En este estudio se relaciona a *B. hominis* con el flagelado *Proteromonas*, con quién comparte características de su ciclo vital.

De acuerdo a la clasificación en seis reinos realizada por Cavalier-Smith en 1998 (citada por Tan *et al.*, 2002) *B. hominis* es emplazado en la siguiente adscripción taxonómica:

Reino Chromista

Subreino Chromobiota

Infrareino Heterokonta o Stramenopiles

Subphylum Opalinata

Clase Blastocystea

Género *Blastocystis*

Ho *et al.* (2000), retoman los trabajos de Nakamura *et al.* (1996) y comparan la secuencia de nucleótidos del gen del EF-1 α de *Blastocystis* obtenidos de humanos y de animales, al tiempo que los relacionan con el EF-1 α de otros eucariotas. Sus resultados demostraron divergencias entre los aislados incluidos en el género *Blastocystis*; y apuntaban la posibilidad de que *Blastocystis* se incluyera en el subphylum Conosa, junto a *E. histolytica*. Las diferencias entre los datos obtenidos con la ssARNr respecto de los del EF-1 α , son debidas a que la secuencia de éstos últimos está más conservada, ya que el ARNr posee una variación del contenido G+C muy acusada entre especies.

Recientemente, Arisue *et al.* (2002) obtienen un árbol filogenético mediante la combinación topológica de los árboles obtenidos del análisis de diferentes moléculas; lo que les permite comparar secuencias de nucleótidos con secuencias de aminoácidos. Las moléculas utilizadas fueron: EF-1 α , la secuencia ssARNr, la proteína de shock térmico de 70 kDa (HSP 70), el factor de elongación-2 y la subunidad "B" no catalítica de la ATP-asa. El resultado confirmó la inclusión de *Blastocystis* en el grupo de los Stramenopiles, muy cerca de los Alveolata (vgr. *Plasmodium falciparum*). Noël *et al.* (2003), confirman estos resultados, esta vez analizando la secuencia completa de la ssARNr de aislados de *Blastocystis* procedentes de diferentes hospedadores y comparándola con la de otros eucariotas. *Proteromonas lacertae*, resultó el eucariota con el que está más estrechamente relacionado.

Para clarificar definitivamente las afinidades filogenéticas de *Blastocystis* serán necesarios más estudios con nuevos genes candidatos y un mayor número de aislados.

1.2.1. Diversidad genética críptica

Los ensayos encaminados a analizar la filogenia, han permitido además demostrar la gran diversidad genética existente en este parásito. Numerosos aislados de *B. hominis* morfológicamente similares, han sido descritos en humanos y en varios animales. Diversos estudios utilizando SDS-PAGE e inmunoblot (Kukoschke y Müller, 1991; Boreham *et al.*, 1992; Müller, 1994; Lanuza *et al.* 1999), análisis isoenzimático (Mansour *et al.*, 1995; Gericke *et al.*, 1997), cariotipado electroforético (Upcroft *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 1994; Carbajal *et al.*, 1997b), RAPD (Yoshikawa *et al.*, 1996c y 1998; Init *et al.*, 1999), RFLP (Böhm-Gloning *et al.*, 1997; Clark, 1997; Hoevers *et al.*, 2000; Yoshikawa *et al.*, 2000; Kaneda *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2001) han mostrado una heterogeneidad considerable, tanto genética como antigénica, entre aislados de *B. hominis*, lo que sugiere que podemos encontrarnos ante especies diversas, cepas diferentes, o un complejo de especies.

La técnica más comúnmente empleada para la separación de cromosomas es la electroforesis en campo pulsado (PFGE); usando este método, Ho *et al.* (1994) analizaron cinco aislados en los que encuentran patrones cariotípicos similares. Carbajal *et al.* (1997b) describieron una diversidad significativa en 15 aislados de *B. hominis*, con los que obtuvieron 11 perfiles mediante PFGE, que se agruparon en tres cariotipos o *cluster*. La discrepancia puede deberse al estudio de un número inferior de muestras en el primer trabajo.

El análisis del polimorfismo de ADN mediante amplificación “random” (RAPD) o aleatoria, fue la técnica empleada por Yoshikawa *et al.* (1996c) para distinguir entre aislados, tras analizar el patrón de bandas de una cepa humana (HE87-1), un aislado de pollo y una cepa referencia ATCC (50177) de *B. hominis*. El aislado humano y el de pollo resultaron muy similares entre sí, y compartieron bandas con la cepa de referencia, permitiendo suponer que el aislado de pollo fuera una cepa zoonótica de *B. hominis*, o bien que ciertas cepas de *B. hominis* son infectivas para hospedadores distintos. A partir de estos datos, Yoshikawa *et al.* (1998) desarrollan cebadores diagnósticos específicos de subtipo, capaces de diferenciar entre variantes genéticas. Init *et al.* (1999), tras el análisis de 20 aislados mediante la técnica de RAPD, describieron cinco patrones; corroborando de este modo, la existencia de variación intraespecífica o intercepa en *B. hominis*. Arisue *et al.* (2003) comparan las secuencias de la región hipervariable de la ssARNr de aislados de *Blastocystis* humanos y de origen animal, previa amplificación, clonación y secuenciación. Destacan que con la secuenciación se obtiene mayor divergencia, permitiendo el desarrollo de nuevos cebadores específicos de grupo que puedan ser utilizados en diagnóstico.

La diversidad genética también se ha demostrado mediante el análisis de los patrones de RFLP (polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción) obtenidos del gen de la ssARNr y del factor de elongación EF-1 α . Clark (1997) analizó la secuencia de genes ssARNr de 30

aislados de *B. hominis* seleccionados aleatoriamente usando el análisis de RFLP con 11 restrictasas tras amplificación por PCR. Los patrones de RFLP obtenidos se denominan “riboprintings” y permiten agrupar a los diferentes aislados en “ribodemas”. El análisis filogenético se resumió en un dendograma que mostró la existencia de siete ribodemas repartidos en dos líneas principales, entre las que la divergencia era del 7%. Dos de los aislados presentaron riboprintings idénticos al de un aislado de cobaya, aludiendo de nuevo al posible origen zoonótico de *Blastocystis* (Yoshikawa *et al.*, 1996c). Este trabajo de Clark (1997) es un referente y sugiere que la diversidad genética de *B. hominis*, puede ser la responsable de las discrepancias acerca de si produce enfermedad en humanos o no. Kaneda *et al.* (2001) reproducen, con tres de las restrictasas, este estudio de Clark en 64 aislados humanos de población sintomática y asintomática; estableciendo correlación estadística entre la pertenencia a los patrones I, III y VI y la aparición de síntomas.

Existe un estudio de RFLP que abarca un mayor número de aislados (113), el de Böhm-Gloning *et al.* (1997) quienes amplifican parte del gen de la ssARNr, y con tres restrictasas muestran la existencia de cinco subgrupos, ninguno de los cuales estaba asociado significativamente con enfermedad intestinal. Thathaisong *et al.* (2003) reproducen el ensayo del grupo de Böhm-Gloning para comparar los perfiles obtenidos con aislados de procedencia humana, respecto de *Blastocystis* de origen porcino y equino. Sus resultados vuelven a reforzar la hipótesis de la blastocistosis como zoonosis, ya que todos los aislados, con independencia de su origen, se incluyeron en el mismo grupo.

Hoevers *et al.* (2000) examinaron la diversidad genética de 14 aislados procedentes de cuatro localizaciones geográficas mediante análisis por RFLP del gen ssARNr, y obtuvieron 12 genotipos pero sin correlación entre origen geográfico y pertenencia a un determinado patrón. Ho *et al.* (2001) en estudios comparativos de riboprinting y de EF-1 α , descubrieron que el análisis por RFLP del EF-1 α era útil para mostrar diversidad genética en

aislados de *B. hominis*. En consonancia con la terminología de los RFLP obtenidos con los genes ssARNr, utilizan el término “alfatipo o alfaprints” para los aislados que comparten idénticos patrones de RFLP obtenidos a partir del EF-1 α .

De estos estudios se infiere que existe gran diversidad genética en los aislados de *B. hominis*, pese a ser morfológicamente idénticos. Hoevers *et al.* (2000) sugieren que para optimizar estas observaciones y poder comparar datos de RFLP de forma efectiva, se necesita desarrollar un método estandarizado con cepas referencia y un panel común de los enzimas de restricción a utilizar.

1.2.2. Especiación

La investigación dirigida a demostrar que *Blastocystis* es un parásito ubicuo en el reino animal, ha evidenciado la parasitación en un amplio rango de hospedadores describiéndose en primates, ungulados, gatos, perros, cerdos, roedores, pájaros, aves de corral, reptiles, anfibios e incluso insectos como la cucaracha (Teow *et al.*, 1992; Boreham y Stenzel, 1993b; Stenzel *et al.*, 1993; Zaman *et al.*, 1993; Quilez *et al.*, 1993; Yoshikawa *et al.*, 1998; Duda *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999).

Yamada *et al.* (1987b) refieren que la morfología y tamaño de las formas detectadas en animales son muy similares a la de los aislados humanos. Sin embargo, atendiendo únicamente a criterios morfológicos y culturales se han descrito nuevas especies: *B. galli* en pollos, *B. anatis* en patos y *B. anseri* en ocas (estudios de Belova citados por Stenzel y Boreham, 1996). Se requerirían estudios de biología molecular para confirmar que podrían ser especies distintas, ya que se han demostrado variaciones morfológicas de los organismos debidas a condiciones ecológicas desfavorables (Silard, 1979), y durante la adaptación al cultivo (Cassidy *et al.*, 1994; Yoshikawa y Hayakawa, 1996a).

Teow *et al.* (1991) describen una especie, *Blastocystis lapemi*, procedente de serpiente de mar, por diferencias en la temperatura de crecimiento y en el perfil cariotípico, respecto de *B. hominis*. Singh *et al.* (1996) también usan el análisis cariotípico en la descripción de nuevas especies en reptiles (*Blastocystis geocheiloni*, en tortuga; *Blastocystis cycluri*, en iguanas y *Blastocystis phytoni*, en serpiente pitón).

Yoshikawa *et al.* (1998) indican que las diferencias cariotípicas no son suficientes para determinar especiación en *Blastocystis* aislados de reptiles (Teow *et al.*, 1991; Singh *et al.*, 1996), abogando por el uso de técnicas de PCR-RAPD para distinguir entre especies y cepas de *Blastocystis*.

En sentido contrario tenemos otros estudios en los que se ha confirmado la utilidad de los cariotipos en la especiación de *Blastocystis*. Ho *et al.* (2000, 2001) realizan un estudio comparativo de la secuencia de aminoácidos de la región codificante del gen EF-1 α en siete aislados de *Blastocystis* procedentes de ratas y reptiles; evidenciando diferencias entre unos y otros, y de ambos respecto de *B. hominis*. Así cuando se usan los análisis de RFLP tanto de EF-1 α como de ssARNr, los patrones de bandas (ribodemas y alfatipos) de los aislados animales son distintos de los humanos (Ho *et al.* 2001). Snowden *et al.* (2000) analizan por el método de RFLP los genes de ssARNr de ocho aislados de *Blastocystis* procedentes de varios animales (cabra, vaca, oveja, cobaya y mono). Identificaron cinco genotipos, en los que aislados de *Blastocystis* procedentes de especies diferentes compartieron un mismo genotipo y por el contrario, se encontraron múltiples genotipos en aislados originarios de un mismo hospedador.

Estos datos indican que *Blastocystis* no es específico de hospedador, sino que puede dar lugar a infecciones cruzadas con otros hospedadores. Resultados similares son referidos por Abe *et al.* (2003a y 2003b) tras la caracterización molecular de aislados de primates y de aves con cebadores específicos y posterior análisis por técnicas de RFLP.

Así, diferencias cariotípicas, utilizadas conjuntamente con otros métodos discriminatorios (tipos celulares, condiciones de crecimiento, análisis de secuencias génicas), están resultando útiles a la hora de designar especies.

1.3. Características biológicas de *B. hominis*

1.3.1. Morfología

B. hominis es un microorganismo eucariota polimórfico, en el que se cree que el estado fisiológico de la célula y las condiciones medio-ambientales, son las responsables de la diversidad morfológica observada (Boreham y Stenzel, 1993a; Stenzel y Boreham, 1996). El conocimiento de la morfología de *B. hominis* es fundamental en el diagnóstico de esta parasitación (Villar *et al.*, 1996). Algunos laboratorios diagnostican *B. hominis* si se encuentran formas vacuolares en heces formes y formas ameboides en heces diarreicas (Carbajal *et al.*, 1997a). Aunque hay casos en los que los quistes fecales pueden predominar en las muestras (Boreham *et al.*, 1996), y es importante saber reconocer estas formas más pequeñas. El cultivo y los métodos de concentración han aumentado la sensibilidad de la detección (Zaman y Khan, 1994).

El examen microscópico de la preparación húmeda directa, realizada con solución salina al 0,85% o con lugol, se ha mostrado como la técnica de mayor sensibilidad en el diagnóstico (Pérez y Guzmán, 1994). Además han sido ensayadas con éxito diversas tinciones que han permitido distinguir el contenido del cuerpo central como el Giemsa (Zierdt *et al.*, 1967), Wright y tricrómico de Wheatley (Vannatta *et al.*, 1985; Jensen *et al.*, 2000, Windsord *et al.*, 2002), hematoxilina-eosina, mertiolato-yodo-formol (MIF) (Babcock *et al.*, 1985; Reinthaler *et al.*, 1988b). MacPherson y MacQueen (1994) utilizaron la tinción con hematoxilina férrica para evaluar la diversidad morfológica de los parásitos obtenidos tras concentración con formol-éter. Suresh *et al.* (1994b) utilizan la naranja de acridina para diferenciar entre distintos estadios de *B. hominis*. La tinción de auramina -

carbolfuchsin fue probada sin éxito por Casemore *et al.* (1984), ya que no permitió la diferenciación del parásito.

Otro punto importante en el diagnóstico es el de la cuantificación de las células que aparecen por campo microscópico; ya que cada vez son más los autores que establecen relación entre el número de células presentes (> 5 organismos/ campo 40 x) con la aparición de síntomas (Sheenan *et al.*, 1986). Por último es importante resaltar que la emisión de *Blastocystis* ocurre de forma discontinua (Vennila *et al.*, 1999) por lo que es importante analizar más de una muestra para evitar falsos negativos.

1.3.1.1. Morfotipos celulares

B. hominis es un organismo pleomórfico en el que se describen cuatro variantes morfológicas: vacuolar, granular, ameboide y quística. Últimamente se ha descrito la existencia de formas avacuolares y multivacuolares.

- **Forma vacuolar:** Es el morfotipo predominante, tanto *in vivo* como *in vitro*, y presenta grandes oscilaciones de tamaño. Se han descrito valores de entre 2 y 200 μm de diámetro, con un media que oscila entre 4 y 15 μm (Stenzel y Boreham, 1996). Stenzel *et al.* (1989) demostraron que posee vesículas recubiertas de función endocítica en la membrana plasmática, y un revestimiento superficial de espesor variable que rodea a la mayoría de las células. Son formas esféricas, caracterizadas por una vacuola central grande, concéntrica a la membrana externa, que ocupa entre el 50 y el 90% del volumen celular. La vacuola desplaza al citoplasma a una zona periférica estrecha, en la que encontramos el núcleo y el resto de organelas: aparato de Golgi, retículo endoplasmático rugoso rodeando a las mitocondrias (Zierdt *et al.*, 1967; Tan y Zierdt, 1973) y ribosomas adosados a la membrana de la vacuola o cuerpo central (Silard *et al.*, 1983). La vacuola central parece tener una función de reserva y contiene material granular o floculante de densidad electrónica variable (Stenzel y Boreham, 1993). Se han observado porciones de citoplasma invaginadas en la vacuola central,

con material diverso (Suresh *et al.*, 1995) y organelas que recuerdan a las mitocondrias (Stenzel *et al.*, 1991b; Pakandl, 1999; Tan *et al.*, 2001a; Nasirudeen *et al.*, 2001a) dentro de estructuras rodeadas de membrana.

- **Forma granular:** Su diámetro oscila entre 3 y 80 μm con un rango medio de 15 a 25 μm . Parece que derivan de la forma vacuolar (Stenzel y Boreham, 1996) y que la transición puede ser inducida por distintos factores entre los que se incluyen el incremento de las concentraciones de suero en el medio de cultivo, la transferencia de células a medios de cultivo diferentes, la axenización y la adición de ciertos antibióticos. Las formas granulares comparten algunas similitudes con las formas vacuolares, pero se caracterizan por la presencia de numerosos gránulos en la banda estrecha del citoplasma periférico y más comúnmente, en la vacuola central. Existen diferentes tipos de gránulos dentro de la vacuola central, que pueden ser inclusiones del tipo mielinas, pequeñas vesículas, gránulos cristalinos o gotitas lipídicas (Dunn *et al.*, 1989). Hay también evidencias de que la vacuola central puede presentar gránulos reproductivos relacionados con mecanismos de división esquizogónica y endodiogenia (Zierdt *et al.*, 1967; Zierdt, 1991; Suresh *et al.*, 1994). Vdovenko (2000) se replantea la significación de las formas vacuolares y granulares, y mediante la utilización de rojo neutro como colorante marcador de viabilidad, concluye que estas formas representan estadios secuenciales hacia la degeneración celular.

- **Forma ameboide:** Han sido descritas con poca frecuencia y las descripciones morfológicas han producido confusión en la literatura (Dunn *et al.*, 1989; Zierdt, 1991a; Tan *et al.*, 1996b). Han sido observadas en cultivos viejos, tratados con antibióticos, y ocasionalmente en muestras fecales relacionadas con diarreas agudas (Zierdt, 1993b; Carbajal *et al.*, 1997). En los primeros estudios con microscopio electrónico de transmisión (Zierdt y Tan, 1976a) describen la forma ameboide como oval, con uno o dos pseudópodos grandes y carentes de membrana celular. Es un hecho peculiar el que una célula pueda sobrevivir sin membrana plasmática

(Stenzel *et al.*, 1993). Las formas ameboides poseen pseudópodos y son de menor tamaño (entre 2,6 y 7,8 μm). Tan *et al.* (1996b) inducen el crecimiento de colonias de células de *B. hominis* partiendo del tipo ameboide. Estas células, mostraban un contorno irregular y poseían extensiones pseudopódicas diversas (Tan *et al.*, 1996b y 2001a). Estos autores, en contraposición a los estudios de Dunn *et al.* (1989), que describieron formas carentes de mitocondrias o vacuola central; en sus observaciones con el microscopio electrónico de transmisión, revelaron la existencia de vacuola central, numerosos cuerpos de Golgi, RE y mitocondrias en las extensiones pseudopódicas citoplasmáticas; lo que implica a la célula en procesos activos que requieren energía. Actualmente no se ha aclarado si las formas ameboides aisladas de colonias son artefactos de cultivo o representan formas que también se pueden encontrar *in vivo*. Existe escasa información acerca del proceso de diferenciación de la forma ameboide o su papel en el ciclo de vida del parásito. Se ha sugerido que la forma ameboide es un intermedio entre la vacuolar y las formas quísticas y que la ingestión de bacterias provee de nutrientes para el proceso de enquistación (Singh *et al.*, 1995). Stenzel y Boreham (1996) postularon que este morfotipo derivaba de formas morfológicamente idénticas a la forma avacuolar. Se ha observado la presencia de material particulado ingerido por las formas ameboides, bien bacterias o restos celulares procedentes de la muerte de células vecinas (Tan *et al.*, 2001a) con lo que desempeñaría un papel nutritivo o regulador.

- **Forma quística:** La existencia de una forma quística morfológicamente distinta, se ha confirmado y descrito desde hace relativamente poco tiempo (Mehlhorn, 1988; Stenzel y Boreham, 1991a; Moe *et al.*, 1997 y 1999; Zaman *et al.*, 1998b y 1999a). El retraso en estos hallazgos es atribuible a su pequeño tamaño (3 a 5 μm). Los quistes fecales son esféricos u ovoides, tienen una pared quística multilaminada y raramente aparecen en cultivos axénicos. El contenido celular interno incluye de uno a cuatro núcleos, múltiples vacuolas y depósitos lipídicos y glucogénicos (Stenzel y Boreham, 1996; Zaman *et al.*, 1997a; Moe *et al.*, 1999). Los quistes suelen estar rodeados de una capa fibrilar laxa que pierden cuando maduran (Zaman *et al.*, 1997a). Se han detectado

diferencias morfológicas de los quistes de *Blastocystis* aislados de animales comparados con los quistes fecales de *B. hominis*. Boreham y Stenzel (1993b) han descrito formas de hasta 15 μm de diámetro en heces de mono, y en material fecal procedente de pollos se han visto múltiples quistes individuales incluidos en una lámina fibrilar simple. Esta disparidad morfológica puede deberse a la posible existencia de especies distintas de *Blastocystis*. Moe *et al.* (1996) analizan la viabilidad de quistes de *B. hominis* revelando que sobreviven a temperatura ambiente hasta un total de 19 días, demostrando que los quistes son la forma más resistente del parásito; si bien son frágiles en condiciones muy extremas de frío o calor, y frente a los desinfectantes más comunes. Zaman *et al.*, (1995a), ya habían comprobado su resistencia al agua destilada con el desarrollo de un método de concentración para obtener quistes, a partir de muestras fecales o cultivos. Se ha observado que la alteración de la concentración sérica incrementa la aparición de quistes en *B. ratti* (Chen *et al.*, 1999) cuando se cultivan axénicamente en medio Iscove Dulbecco modificado (IMDM), en esta especie los quistes obtenidos *in vitro* son similares a los encontrados en muestra fecal fresca. Suresh *et al.* (1993) describen un método de inducción a la enquistación para *B. hominis*, pero los quistes obtenidos son morfológicamente distintos a los que aparecen en las heces y parecen formas granulares, excepto por la presencia de una estructura semejante a la pared quística, gruesa y osmiófila. Hay estudios de su resistencia a shock hipotónico y a determinar la composición de la pared quística. En este sentido, Villar *et al.* (1998) utilizan la tinción con blanco de calcoflúor demostrando la presencia de residuos β - (1-4)-glicosil. Hay datos de inoculación oral en ratas de laboratorio (Suresh *et al.*, 1994c), encontrando el parásito únicamente en las que habían sido infectadas con quistes. Cuando las formas vacuolares se cultivan en medio de enquistación, la proporción de quistes *in vitro* respecto de las vacuolares se incrementa con el paso de tiempo (Villar *et al.*, 1998). El debate se centra en si existen o no quistes *in vivo* (Stenzel y Boreham, 1996). La exquistación, que es el proceso de diferenciación de los quistes a formas vacuolares, se ha descrito con detalle mediante el uso de TEM en tiempo real (Moe *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999b). Mostraron que los quistes fecales de *B. hominis* y *B. ratti* se

transformaban en formas vacuolares a las 24 horas post-inoculación en medio de crecimiento. A las 3 horas observaban cúmulos en el citoplasma de múltiples vacuolas pequeñas con inclusiones en su interior. Los quistes perdían gradualmente su pared quística en torno a las 6 horas, hecho evidenciado por el alargamiento del parásito que pasaba de 5 a 9 μm , y eventualmente aparecía reemplazada por una gruesa cubierta superficial. El agrandamiento ocurre por la aparente agregación de múltiples pequeñas vacuolas coalescentes, que dan lugar a la vacuola central. Al cabo de 12 horas aparecen las formas vacuolares y granulares típicas, y se pueden observar procesos de fisión binaria. El parásito puede sufrir división mientras aún permanece rodeado por material procedente de la pared quística, observándose en esos casos, hasta cuatro células hijas dentro del quiste (Chen *et al.*, 1999b; Zaman *et al.*, 1999b).

- **Otras formas:** Se han descrito otras formas, además de las ya mencionadas, aisladas de material fecal fresco procedente directamente del intestino. Las primeras detectadas habían sido obtenidas de un paciente con una diarrea profusa (Zierdt y Tan, 1976a), y se las denominó avacuolares, al carecer de vacuola central. Las células aisladas a partir de muestras de colonoscopia son diferentes a las formas vacuolares y granulares convencionales (Stenzel *et al.*, 1991b), y a las obtenidas en cultivo. Carecen de cubierta externa y tienen un diámetro de unas 5 μm , presentando además, importantes diferencias en la morfología de las mitocondrias. También han sido descritas formas multivacuolares en material fecal humano (Stenzel *et al.*, 1991b; Stenzel y Boreham, 1996). Son células rodeadas de una cubierta externa gruesa y contienen múltiples vacuolas de tamaño y contenido variables. De pequeño tamaño, su diámetro oscila entre de 5 y 8 μm . Lanuza *et al.* (1997a) estudiaron 81 muestras fecales y los únicos tipos celulares que describen son los vacuolares y alguno ameboide. Aunque está pendiente de confirmar, Boreham y Stenzel (1993b) sugieren que las formas avacuolares y multivacuolares representan el estadio *in vivo* del parásito, mientras que las formas de vacuola grande y granulares predominan en los cultivos. Las formas multivacuolares tras la coalescencia

de sus múltiples vacuolas formarían la vacuola central; representando un estadio intermedio en el desarrollo a quistes fecales de las formas vacuolares. La rápida desaparición del morfotipo multivacuolar en los cultivos y la consiguiente aparición de formas vacuolares, sugiere que pueden representar estadios transitorios en el ciclo de vida de *B. hominis* (Stenzel *et al.*,1991a). Boreham y Stenzel (1993b) plantean que la forma menos descrita es la multivacuolar porque se interpretan como células en proceso de esquizogonia, confundiendo las multivacuolas con la progenie.

1.3.1.2. Estructuras celulares

B. hominis es un eucariota en el que se diferencian membranas plasmática y nuclear, uno o más núcleos, superficie de membrana, vacuola central, mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, ribosomas y vesículas. En los siguientes apartados se resumen las propiedades de las principales estructuras.

- **Membrana citoplasmática:** Una membrana citoplasmática bilaminar delimita la célula. Tan *et al.* (1974) demostraron con criofractura, la presencia de poros de 50 nm de diámetro en la parte externa; mientras que en la interna se observaron partículas intramembranosas y hendiduras con una distribución similar; sugiriendo que mediante un sistema de poros-hendiduras ambas capas podrían comunicarse. Dunn *et al.* (1989) detectaron cuatro tipos de hendiduras electrodensas (varilla, copa, alveolar y tubular) indicativas de endocitosis. Stenzel *et al.* (1989) evidencian la existencia de vesículas recubiertas de clatrina, confirmando que presentan endocitosis mediada por receptor. Yoshikawa y Hayakawa (1996a) analizaron la organización del colesterol en la membrana plasmática, y encontraron diferencias respecto de la membrana de la vacuola central.

- **Superficie de membrana o cubierta externa:** Se define como una capa fibrilar que se encuentra en la parte externa de la membrana plasmática, de grosor y densidad variables. En las formas fecales, tiene un

grosor entre 0,25 y 0,5 μm y suele presentar bacterias asociadas (Silard y Burghlea, 1985; Dunn *et al.*, 1989; Zaman *et al.*, 1999b). Se sintetiza de forma continua hacia el medio externo y está perfectamente descrita en formas vacuolares y granulares; pero varios estudios refieren la ausencia de esta estructura en muestra fecal procedente de un paciente con diarrea severa (Zierdt y Tan, 1976a), en formas ameboides (Tan y Zierdt, 1973; Dunn *et al.*, 1989) y en células obtenidas por colonoscopia (Stenzel, Boreham y McDoughall, 1991b). Se cree que rodea las formas quísticas (Zaman *et al.*, 1997a) y que podría tener función osmoprotectora; no obstante, la carencia de esta estructura *in vitro*, sugiere que no es necesaria para la supervivencia del organismo en los cultivos y probablemente su función sea la de barrera mecánica que produzca respuesta innata y adquirida en el hospedador (Boreham y Stenzel, 1993b). Esta hipótesis fue corroborada por Tan *et al.* (1997) gracias al uso de anticuerpos monoclonales (mAb) que se unen a la capa superficial de *B. hominis* sin inhibir su crecimiento, mientras que algunos mAb específicos para proteínas de la membrana plasmática, tienen efecto citotóxico para el parásito. Lanuza *et al.* (1996) usando un panel de lectinas marcadas con FITC (isotiocianato de fluoresceína), demostraron que la capa superficial contiene carbohidratos y sugieren su posible intervención tanto en fenómenos de reconocimiento celular, como de citoadherencia. La presencia de una cápsula de naturaleza polisacárida puede evidenciarse mediante tinciones negativas (Bird y Ellis, 1971). La microscopia electrónica (ME) ha permitido ver que se trata de un entramado, que puede alcanzar una longitud de hasta 10 μm (Zaman *et al.*, 1999b). Gracias a la resolución de la ME, se ha observado que si las bacterias que se encuentran en la superficie de membrana son dañadas, se produce una pérdida de densidad electrónica en su citoplasma. Zaman *et al.* (1997a) plantean que el parásito podría entonces beneficiarse absorbiendo los restos bacterianos vía membrana celular, que le servirían como nutrientes.

- **Vacuola central:** Durante mucho tiempo su función ha estado pendiente de determinar, por lo que se le dio el nombre de “cuerpo central”.

Este orgánulo, que ocupa el centro del parásito desplazando el citoplasma hacia la periferia, ha sido observado en las células de morfología vacuolar, granular y quística. Se ha relacionado con el almacenamiento de nutrientes, el metabolismo y la reproducción del parásito (Suresh *et al.*, 1994b; Stenzel y Boreham, 1996). Yoshikawa *et al.* (1988) analizan la vacuola central de *B. hominis* mediante criofractura, encontrando protusiones digitiformes como si estuvieran introduciendo sustancias procedentes del citoplasma. Stenzel, Dunn y Boreham (1989) confirman el proceso de endocitosis en las vacuolas de formas vacuolares y granulares de *B. hominis*, utilizando ferritina como marcador. En la forma vacuolar la ferritina se distribuía formando gránulos discretos; mientras que en la forma granular se observaba como partículas dispersas; demostrando que la vacuola central desempeña un importante papel en el metabolismo y en el almacenamiento de nutrientes. La presencia en la vacuola de cuerpos de inclusión, ha sido demostrada por Tan y Zierdt (1973), mediante tinción con rojo O y negro Sudán; y Matsumoto *et al.* (1987), con hematoxilina férrica de Heidenhein. Dunn *et al.* (1989) distinguieron cuatro tipos de inclusiones dentro de la vacuola central: mielinoideas, pequeñas vesículas, gránulos cristalinos para el depósito de alimento y gotas de lípidos, sobre todo fosfolípidos y ácidos grasos. En un estudio posterior, Yoshikawa *et al.* (1995b) señalaron la presencia de lípidos neutros y ácidos en la vacuola central. La vacuola está implicada en el proceso de división esquizogónica (Zierdt, 1991a); y Suresh *et al.* (1994b) demostraron la existencia de gránulos con función reproductora tiñendo las células con naranja de acridina. Lanuza *et al.* (1996) utilizan lectinas marcadas para mostrar la presencia y la naturaleza de los carbohidratos presentes en el cuerpo central y el citoplasma; que previamente habían sido detectados mediante tinción con ácido periódico de Schiff, tinción de plata y azul alcian (Yoshikawa *et al.*, 1995b). Yoshikawa y Hayakawa (1996a) consideraron esta organela como almacén de carbohidratos y lípidos durante la fase de crecimiento exponencial, para ser utilizados en la fase estacionaria, describiendo siete tipos de células en función de la densidad electrónica observada en la vacuola central. Yoshikawa y Oishi (1997) detectan con técnicas histoquímicas (plata amoniacal y ácido fosfotúngstico

etanólico) proteínas básicas en el cuerpo central, almacenadas durante la fase de crecimiento.

- **Mitocondrias:** *B. hominis* es un anaerobio estricto, por lo que resulta paradójico encontrar cientos de mitocondrias en el citoplasma, normalmente concentradas cerca del núcleo. Se trata de una organela delimitada por una membrana bilaminar, desde cuya capa interna emergen las crestas mitocondriales, las cuales presentan una gran variabilidad morfológica (bulbales, tubulares, vesiculosas o circulares) que puede relacionarse con diferencias en el estado energético (Dunn *et al.*, 1989). Matsumoto *et al.* (1987) constataron la presencia de ADN en el interior de las mitocondrias mediante una tinción fluorescente, el DAPI. Zierdt *et al.* (1988b) confirmaron que se tiñen con verde Jano y rodamina 123, lo que indica que es una membrana fisiológicamente activa. Zierdt (1991a) señala la posibilidad de que dichas organelas tengan como misión la síntesis de lípidos, pero Stenzel y Boreham (1996) sugirieron la posibilidad de que las mitocondrias fuesen hidrogenosomas, al confirmarse la ausencia de enzimas típicos de las mitocondrias (Zierdt, 1986 y 1988b). Todos los organismos en los que existen hidrogenosomas son anaerobios o anaerotolerantes, careciendo de mitocondrias. Tan *et al.* (2002) citan en un estudio propio que al poner en contacto un cultivo de células de *B. hominis* con un agente reductor como el tioglicolato sódico, mediante microscopía electrónica de transmisión observan que la mitocondria se ha transformado en unas estructuras que se parecen extraordinariamente a los hidrogenosomas de *Trichomonas vaginalis*. La confirmación de que *Blastocystis* presenta hidrogenosomas consistiría en detectar actividad hidrogenasa.

- **Núcleo:** El núcleo de *B. hominis* es esférico u ovalado, con un tamaño de 1 μm de diámetro y está rodeado por una membrana que presenta poros (Yoshikawa *et al.*, 1988). El número es variable, si bien predominan las formas mono y binucleadas, sobre las de más de dos núcleos (MacPherson y MacQueen, 1994). La presencia de ácidos nucleicos en el interior de los núcleos ha sido confirmada mediante tinciones específicas, como la tinción de Feulgen (Tan y Zierdt, 1973) o la técnica de

DAPI (Matsumoto *et al.* , 1987). El ARN se encuentra concentrado alrededor del núcleo (Stenzal y Boreham, 1996). La cromatina nuclear está dispersa, excepto en una zona electrodensa con forma de banda semilunar, característica del género; normalmente situada en un polo del núcleo y que ha sido descrita en todos los morfotipos celulares. Esta banda ha sido considerada como el nucleolo (Tan y Zierdt, 1973), al igual que un gránulo adicional de material condensado que se observa en algunas células *in vivo* (Zierdt y Tan, 1976a), sin que se haya confirmado ninguna de las dos hipótesis. No se ha observado la presencia de microtúbulos.

- **Endosimbiontes:** Tan *et al.* (1974) detectan la presencia de endosimbiontes en el núcleo y en el citoplasma de dos aislados de *Blastocystis*, de pato y mono respectivamente. En un estudio posterior, observaron estructuras esféricas o con forma de varilla, similares a bacterias a las que denominaron “partículas alpha”. La observación de que los cultivos de *B. hominis* morían rápidamente cuando se eliminaban estas formas mediante adición de antibióticos como el cloranfenicol, sugirió que la viabilidad del parásito podía depender de la presencia de estas partículas alfa (Zierdt y Tan, 1976b). Stenzel y Boreham (1994b), mediante microscopía electrónica de transmisión, describieron la presencia en el núcleo y en el citoplasma, de unas estructuras baciliformes, rodeadas de membrana y morfológicamente similares a los endosimbiontes descritos en otros protozoos. No observaron procesos de digestión o degeneración en estas estructuras lo que les sugirió que se trataba de verdaderos endosimbiontes.

Se desconoce su función, tal vez relacionada con el aporte de información genética adicional transmitible a la progenie y que podría alterar alguna característica de la célula, o bien favorecer la posible patogenicidad del parásito (Silard, 1979).

1.3.2. Ciclo biológico

Desde su descripción, han sido muchas las hipótesis que han tratado de dilucidar el ciclo biológico de *Blastocystis*. Los estudios realizados por el grupo de Zierdt (Zierdt, 1973; Zierdt y Williams, 1974; Zierdt y Tan, 1976b) diferenciaron cuatro formas asexuales de división en *B. hominis*: fisión binaria, plasmotomía, esquizogonia y endodiogenia (figura 1). Tan y Zierdt (1973) describen que la forma granular contiene gránulos de función metabólica, lípidos o bien gránulos reproductivos. Zierdt (1988a) afirma que la fisión binaria y la plasmotomía son dos tipos distintos de reproducción. Posteriormente, Van Saanen-Ciurea y El Achachi (1983) propusieron un ciclo en el que la forma vacuolar se transforma en ameboide y ésta, mediante esquizogonia, en células vacuolares hijas. Dunn *et al.* (1989) y Boreham y Stenzel (1993b) manifiestan que la fisión binaria es la única forma de división objetivada. Sin embargo, Zaman (1997b), mediante microscopía de contraste de fases, confirma la existencia de las cuatro formas de división descritas por el grupo de Zierdt (figura 1).

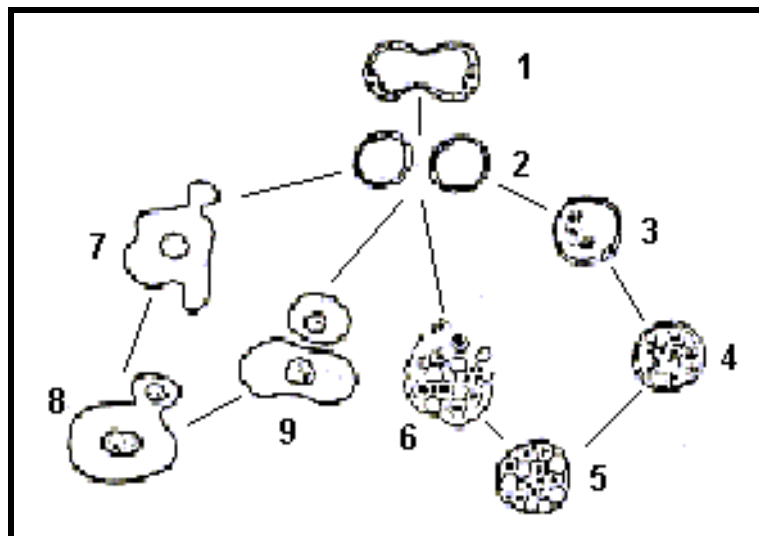


Figura 1. Ciclo biológico propuesto por Zierdt. 1 y 2: formas vacuolares durante y después de la división (fisión binaria); 3, 4, 5 y 6: etapas del desarrollo de formas vacuolares en formas granulares; 7, 8, y 9: formación de una célula hija desde una forma ameboide.

Jiang y He (1993) propusieron un ciclo biológico basado en la observación de tres formas diferentes del morfotipo ameboide. Así, la tercera forma (TF) generaría la forma vacuolar; mientras que la primera y segunda forma (FF y SF) serían estadios intermedios en este proceso. La forma vacuolar, pieza clave en este modelo, daría lugar a los restantes morfotipos mediante fisión binaria o múltiple.

Stenzel *et al.* (1991a), Boreham y Stenzel (1993b), al comparar los morfotipos obtenidos por colonoscopia, heces frescas y cultivos; consideraron que a partir de la forma avacuolar se generarían las restantes, por ser ésta la que se corresponde con el trofozoíto colónico. Postulan que durante el tránsito intestinal, se produciría una coalescencia de pequeñas vesículas que daría lugar a una forma multivacuolar a partir de la cual, se producirían los quistes, o bien formas ameboides. La forma vacuolar surgiría en cultivo a partir de la forma multivacuolar; y la forma granular derivaría de una vacuolar con el cuerpo central constituida por pequeños gránulos. Según estos autores, las formas vacuolar y granular no juegan un papel importante en el ciclo vital de *B. hominis* (figura 2).

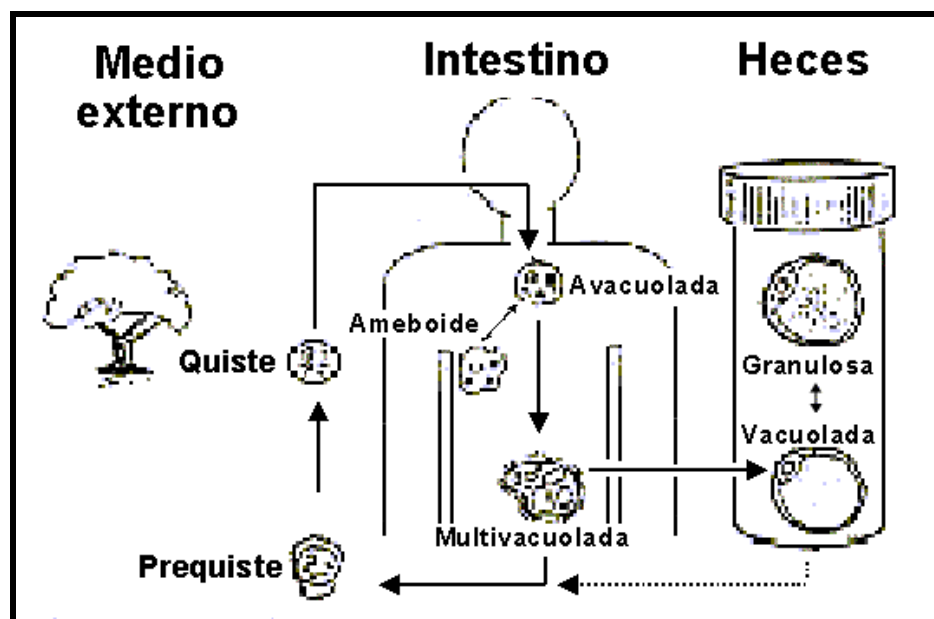


Figura 2. Ciclo propuesto por Boreham y Stenzel (1993b).

Singh *et al.* (1995) postularon un nuevo ciclo biológico basado en dos tipos de formas quísticas: quistes de pared delgada implicados en la autoinfección por multiplicación en el tracto gastrointestinal; y quistes de pared gruesa responsables de la transmisión externa, vía fecal-oral (figura 3).

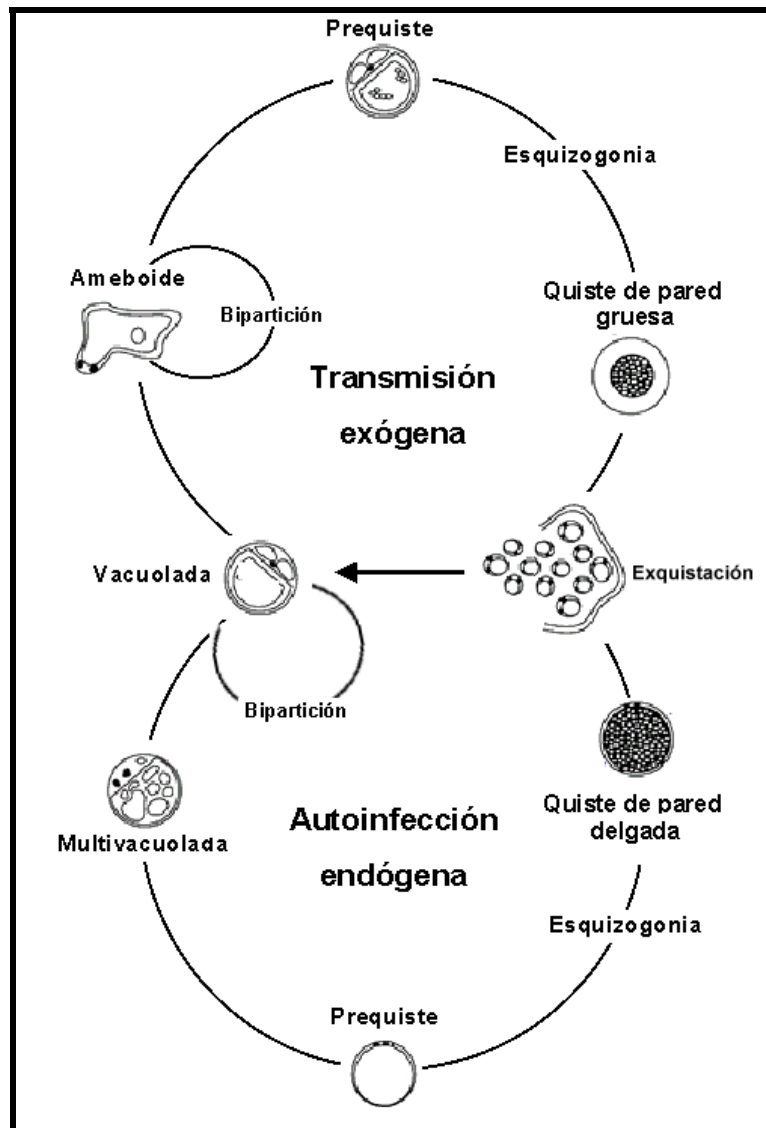


Figura 3. Ciclo propuesto por Singh *et al.* (1995).

La forma vacuolar podría diferenciarse en forma ameboide, ésta daría lugar al pre-quiste, el cual por esquizogonia, formaría quistes de pared gruesa iniciándose un ciclo de transmisión externa. Otra posibilidad es la obtención de una forma multivacuolar a partir de la forma vacuolar, la cual

generaría un estadio prequístico que, por esquizogonia, produciría formas quísticas de pared delgada responsables de la autoinfestación. En ambos casos el ciclo terminaría con la rotura del quiste y la liberación de células hijas que originarán formas vacuolares capaces de división mediante fisión binaria. Singh *et al.* (1995) consideraron que la forma esquizonte descrita por Zierdt (1991a) es la forma granular que generaría las formas quísticas de pared delgada.

Stenzel y Boreham (1996) rechazan el ciclo descrito por Singh *et al.* (1995) basado en la existencia de quistes de pared delgada y gruesa, reiterando su propuesta de ciclo (Boreham y Stenzel, 1993b).

Suresh y Anuar (2002) revisan las últimas hipótesis y sostienen que es posible que *B. hominis* posea un amplio repertorio de mecanismos de reproducción que estén dificultando determinar cual es el correcto, al tiempo que le ayudan a sobrevivir en una amplia variedad de hospedadores.

1.3.3. Cultivo *in vitro*

B. hominis es un organismo cultivable, aunque su cultivo no está exento de dificultades. Zierdt y Williams (1974) constataron que entre los medios de cultivo idóneos para este parásito, el medio bifásico de Boeck-Drbohlav, inicialmente descrito para *E. histolytica*, proporcionaba un adecuado crecimiento para *B. hominis*. Además, observaron mejores resultados en medios pre-reducidos durante 48 horas, con una fase líquida constituida por solución de Locke y suero inactivado (bovino, caballo, conejo o humano) al 30% e incubados a 37°C en atmósfera anaerobia.

Upcroft *et al.* (1989) ensayaron diversos medios monofásicos líquidos, ya que para estudios de biología molecular y quimioterapia es preferible evitar el exceso de proteínas. Comprobaron que el medio MEM (medio mínimo esencial), enriquecido con un 10% de suero de caballo y pre-reducido durante 48 horas, proporcionaba un crecimiento adecuado, aunque

presenta la desventaja de su fácil contaminación. Ho *et al.* (1993) demostraron que el medio de Dulbecco modificado por Iscove, permitía un crecimiento muy superior a los medios MEM, RPM-1640 y BME, comparable al obtenido en el medio Boeck-Drbohlav. Otro medio de cultivo utilizado con éxito es el de Jones, útil en cultivos xénicos (Suresh *et al.*, 1993). Kukoschke y Müller (1991) observaron un incremento en el número de cultivos positivos y un aumento de tamaño en *B. hominis* al utilizar suero de conejo o caballo, en vez de suero humano. Lanuza *et al.* (1997a) señalaron que la adición de glucosa y de sales minerales a la fase líquida, a una concentración igual a la descrita inicialmente para el medio de Boeck-Drbohlav, permite obtener un crecimiento óptimo de este parásito

La capacidad de crecer en medio sólido o semisólido en forma de colonias como poblaciones clonales, está resultando muy útil para estudios bioquímicos, genéticos y de viabilidad. La formación de colonias de *B. hominis* en agar blando en condiciones de anaerobiosis, ha sido descrita por Tan *et al.* (1996b). Con una mezcla de Bacto agar al 0,36%, IMDM y suero de caballo al 10%, se obtienen colonias con un diámetro que oscila entre 1 y 3 mm, por debajo de la superficie del agar, entre los días 5 y 10. Las colonias individuales obtenidas son replicadas en cultivos líquidos.

El crecimiento en colonias es un método empleado en la investigación de anticuerpos monoclonales reactivos en superficie para estudios de citotoxicidad (Tan *et al.*, 1997), y para la axenización de especies de *Blastocystis* aisladas de humanos, reptiles o ratas de laboratorio (Ng y Tan, 1999).

Más recientemente se ha descrito un medio en agar sólido que aumenta la eficacia del crecimiento clonal de *B. hominis* (Tan *et al.*, 2000). Las colonias se exponen en la superficie del agar, lo cual facilita el recuento y la manipulación. Son colonias coloreadas que crecen a los 7 días post-inoculación, alcanzando un diámetro de 2 mm de diámetro. En medio sólido las colonias se muestran viables catorce días, por lo que los subcultivos se

realizan cada dos semanas. Los clones se expanden en medio de cultivo líquido.

1.3.3.1. Axenización

Blastocystis spp se caracteriza porque no puede ser axenizado directamente, primero se ha de establecer el cultivo con flora bacteriana compleja y no definida (Clark y Diamond, 2002). La axenización de *Blastocystis* spp. se ha conseguido con la adición de antibióticos (Zierdt, 1973; Zierdt y Williams, 1974; Kukoschke y Müller, 1991; Ho *et al.*, 1993; Teow *et al.*, 1992; Lanuza *et al.*, 1997a; Ng y Tan, 1999), ya que la fragilidad de la célula impide el empleo de métodos físicos tales como la centrifugación o la filtración (Zierdt y Williams, 1974).

En algunos casos no se logra la axenización (Zierdt, 1991a; Boreham y Stenzel, 1993b; Lanuza *et al.*, 1997a) lo que indica que el parásito puede requerir de la presencia de bacterias para sobrevivir.

Lanuza *et al.* (1997a) consiguen axenizar con éxito 25 de 81 aislados de *B. hominis*, gracias a la combinación de un gradiente de ficoll-ácido metrizóico y la adición progresiva de antibióticos. Otro método recientemente empleado para lograr cultivos puros, consiste en una reducción inicial de la carga bacteriana usando antibióticos, seguida de crecimiento de colonias en medio semisólido (Ng y Tan, 1999).

1.3.3.2. Tiempo de generación

Carbajal *et al.* (1996) estudiaron el crecimiento de *B. hominis* en medio bifásico de Boeck-Drbohlav, y para asegurar el crecimiento utilizaron un inóculo mínimo de 10^6 trofozoitos/ml; obteniendo un tiempo de generación de $8,86 \pm 0,89$ horas. Lanuza *et al.* (1997a) coinciden en el inóculo mínimo necesario para obtener un crecimiento adecuado, y comunicaron un tiempo de generación de entre 6,6 a 12,1 horas.

1.3.3.3. Criopreservación

El protocolo de crioconservación descrito por Zierdt (1991a) implica la adición de dimetil sulfóxido (DMSO), por lo que se requiere un cuidado especial en el momento de la descongelación. Suresh *et al.* (1998) utilizan medio mínimo esencial (MEM), al que añaden glicerol y suero bovino fetal, logrando mejorar los resultados en un 90%. Este estudio sólo se ha realizado con aislados de *B. hominis*, falta por confirmar que esta formulación también sea válida para *Blastocystis* spp.

1.3.4. Características bioquímicas

El estudio electroforético de las proteínas solubles de *B. hominis*, ha sido realizado por diversos autores permitiendo la descripción de diferentes patrones polipeptídicos. Así, Boreham, Upcroft y Dunn (1992) observaron proteínas con pesos moleculares entre 14 y 200 kDa, obteniendo un perfil proteico diferente para cada uno de los aislados estudiados. Kukoschke y Müller (1991) comunicaron dos patrones polipeptídicos, sin citar el rango de pesos moleculares. El grupo de Mansour *et al.* (1995) también describe dos patrones proteicos diferentes, con un rango entre 12 y 95 kDa. En un ensayo más reciente Lanuza *et al.* (1999) obtienen tres patrones proteicos diferentes a partir de la obtención de polipéptidos con diferentes pesos moleculares, los cuales oscilaron entre 24 y más de 200 kDa.

Keenan *et al.* (1992) y Keenan y Zierdt (1994), demostraron que los aislados axénicos de *B. hominis* poseen la capacidad de sintetizar la mayoría de los lípidos celulares; pero que también podían adquirir el colesterol y sus ésteres del medio de cultivo.

En cuanto a las actividades enzimáticas, los primeros estudios estaban encaminados a conocer la dotación enzimática de *B. hominis*. Zierdt (1986) estudió la actividad enzimática de la fracción mitocondrial sin detectar

actividad catalasa, peroxidasa ni la presencia de citocromo, por lo que postuló que las mitocondrias procedían de bacterias anaerobias. Zierdt *et al.* (1988b) pusieron de manifiesto la ausencia de actividad del complejo piruvato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, fosfatasa alcalina glutamato deshidrogenasa, citocromo C oxidasa, γ -glutamil transpeptidasa y creatina kinasa. Sin embargo, demostraron una elevada actividad aspartato amino transferasa, alanino amino transferasa y aldolasa; en menor cuantía, piruvato descarboxilasa e indicios de diaforasa y lactato deshidrogenasa. Stenzel *et al.* (1989) no detectaron la presencia de fosfatasa ácida en la vacuola central, enzima indicadora de actividad digestiva, por lo que sugirieron que el cuerpo central no actuaría como lisosoma. Carbajal *et al.* (1996) comunicaron la ausencia de actividad alcohol deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, alanina deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa, aspartato deshidrogenasa, purina nucleosidil fosforilasa y manosa fosfato isomerasa.

Se han realizado estudios enzimáticos destinados a definir zimodemas a partir de los patrones isoenzimáticos obtenidos, y a buscar asociación entre una presentación clínica y un zimodema determinado. Mansour *et al.* (1995) demostraron la presencia de dos zimodemas, uno de ellos con dos variantes, analizando cinco actividades enzimáticas (enzima málico, fosfoglucomutasa, glucosa fosfato isomerasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa y hexoquinasa). Carbajal (1996) describe tres zimodemas, diferenciados por la presencia de isoenzimas en las siguientes actividades enzimáticas: fosfoglucomutasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, glucosa fosfato isomerasa, glutámico oxalacético transaminasa, enzima málico y malato deshidrogenasa.

Gericke *et al.* (1997) analizaron tres actividades enzimáticas en 119 aislados xénicos, obteniendo 98 zimodemas y concluyendo que *B. hominis* mostraba un elevado polimorfismo; aunque sin hallar asociación significativa entre la pertenencia a un zimodema y la presentación de síntomas.

1.4. Inmunobiología

1.4.1. Respuesta inmune del hospedador

Muy poco conocemos sobre la respuesta inmune del hospedador frente a *B. hominis*. Chen *et al.* (1987) describen la falta de respuesta humoral en cuatro pacientes utilizando la técnica de western-blot para detectar IgG en suero. En contraposición (Zierdt y Nagy, 1993a) hallaron que la respuesta inmunitaria en pacientes sintomáticos presentaba títulos superiores a los detectados en la población control. En estudios posteriores (Zierdt *et al.*, 1995) corroboran estos resultados. Hussain *et al.* (1997) describen un incremento significativo de los niveles de la subclase IgG2 en pacientes con colon irritable e infección por *B. hominis*, sugiriendo una posible relación entre este síndrome y la parasitación por *B. hominis*. Los autores plantean que los anticuerpos de subclase IgG2 son inducidos en respuesta a fragmentos de la cubierta externa del parásito, que han sido transportados del lumen del intestino a los linfocitos y macrófagos. Los anticuerpos IgG2 predominan cuando los antígenos son carbohidratos, lo que explicaría que Chen *et al.* (1987) no encontrasen anticuerpos, ya que los antígenos que utilizaron en el western-blot eran proteicos y no glicosilados. Desde estos pocos estudios, resulta evidente que *B. hominis* puede inducir respuesta inmune en humanos.

1.4.2. Diversidad antigénica

La heterogeneidad antigénica ha sido demostrada en los aislados de *B. hominis* con técnicas como el SDS-PAGE (Kukoschke y Müller, 1991), inmunoblotting (Boreham *et al.*, 1992; Lanuza *et al.*, 1999), inmunodifusión (Müller, 1994; Lanuza *et al.*, 1999), e inmunofluorescencia (Tan *et al.*, 2001b). Müller (1994) había identificado cuatro grupos serológicos distintos, pero sin encontrar correlación significativa con enfermedad intestinal. Lanuza *et al.* (1999) clasificaron 18 aislados de *B. hominis* en dos grupos antigénicos relacionados; los pacientes que sufren diarrea crónica conformaron el grupo antigénico 1, mientras que en el 2 se incluyeron los que sufrían de diarrea aguda. Estos datos permiten postular que serotipos diferentes puedan

relacionarse con diferencias en la patogenicidad. En cualquier caso la diversidad antigénica debe tenerse en cuenta en el desarrollo de pruebas de diagnóstico serológico para las infecciones por *B. hominis*.

1.4.3. Anticuerpos monoclonales

Yoshikawa *et al.* (1995a) analizan un panel de ocho anticuerpos monoclonales (mAb). La mayoría de los mAb fueron IgM y, por inmunomicroscopía electrónica, se observó su unión a epítomos de la cubierta externa. Seis mAbs fueron reactivos frente a *B. hominis* resultando específicos frente a la cubierta externa, mientras que dos mAbs se unieron a material procedente de la vacuola central presentando reactividad cruzada con aislados de *Blastocystis* spp. procedentes de pollo. Estos autores sugieren que existen componentes antigénicos cepa o especie específicos en la cubierta externa, mientras que los que proceden de la vacuola central, no lo son.

Tan *et al.* (1996a) también caracterizaron los mAb inducidos por *B. hominis*. La mayoría fueron IgM reactivos frente a epítomos con múltiples carbohidratos localizados en la cubierta externa. El mismo grupo (Tan *et al.*, 1997) mostró que un determinado mAb (1D5) resultaba citotóxico para el parásito, ya que en presencia de éste el número de colonias decrecía. El mAb 1D5 es una IgM que se une a una proteína asociada a la membrana plasmática de 30 kDa, observada en procesos de apoptosis. Recientemente, Tan *et al.* (2001b) observan clones que sobreviven a la citotoxicidad de 1D5, esos datos proponen que el epítomo 1D5 es específico de cepa y de especie, y sugieren que *B. hominis* está predispuesto a un estado de heterogeneidad en cultivos axénicos (por ejemplo: células susceptibles y células resistentes a 1D5). A diferencia de 1D5, los mAb reactivos frente a carbohidratos de la cubierta externa, no resultaron citotóxicos (Tan *et al.*, 1997). En otros estudios (Hussain *et al.*, 1997; Kaneda *et al.*, 2000) se indica que la principal respuesta inmune se da frente a los carbohidratos de la cubierta externa, la cual serviría como barrera mecánica e inmunológica al parásito; además el hecho de que *in vivo* se sintetice de forma continua y se libere al medio

extracelular (Zaman *et al.*, 1997a) le permitiría actuar como “una cortina de humo”, mecanismo de evasión de la respuesta inmune ya descrito en otros parásitos.

1.4.4. Inmunidad celular

Wang *et al.* (2002) comparan las poblaciones linfocitarias CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ y CD4⁺/CD8⁺ de un grupo de población sintomático respecto de un grupo control, en una población de Huainan, en China. En los individuos sintomáticos infectados por *B. hominis* se encontraron valores inferiores a los normales en todas las poblaciones linfocitarias, excepto en el recuento de CD8⁺, estadísticamente significativos. El descenso en el ratio CD4⁺/CD8⁺, la llave de la inmunoregulación, fue especialmente destacable. La disminución de los linfocitos TH, responsables de la activación de la inmunidad humoral y celular, implicaría mayor dificultad en la curación del proceso diarreico.

1.5. Patogénesis

La patogenicidad de este microorganismo es controvertida por diferentes razones. Narkewicz *et al.* (1989) afirman que no detectan diferencias de prevalencia entre población sintomática y asintomática en parasitados por *B. hominis*. Datos similares son referidos por Senay y MacPherson (1990), Grossman *et al.* (1992), Pena *et al.* (1992) y Udkow y Markell (1993). Steinmann *et al.* (1990) refieren datos de prevalencia similares en tres grupos de estudio: pacientes inmunocompetentes con diarrea, portadores asintomáticos y pacientes VIH con diarrea. Sin embargo, Nimri (1993) y Carbajal *et al.* (1997c) comunicaron prevalencias mayores en población sintomática.

Otro aspecto que apoya la idea de que *B. hominis* es un organismo meramente comensal, se debe a los casos en los que se produce la resolución de los síntomas sin la administración de tratamiento específico previo; tal y como publican Kain (1987), Miller y Minshew (1988) o Sun *et al.*

(1989). Markell y Udkow (1986) afirman que la remisión de los síntomas en respuesta al tratamiento, se debe a la eliminación de otro patógeno no detectado con el que coexiste y que sería el verdadero responsable de la infección. Opinión compartida por Rosenblatt (1990).

Pero son muchas más las publicaciones que implican a *B. hominis* como causa de enfermedad, que las que lo exoneran. *B. hominis* es un organismo anaerobio estricto que reconoce un hábitat colónico primario (Sheenan *et al.*, 1986; Pikula, 1987; Dellers *et al.*, 1992); aunque también se ha detectado en el duodeno y en el ciego de pacientes inmunocompetentes (Vannatta *et al.*, 1985) e inmunosuprimidos (Narkewicz *et al.*, 1989).

No se conocen cuales son los determinantes de patogenicidad, pero existen diferentes hipótesis. Garavelli *et al.* (1991) indicaron que la infección por *B. hominis* depende de la interacción entre el sistema inmune y el microambiente en el intestino del hospedador y propusieron una acción tóxica-alérgica que daría lugar a una inflamación inespecífica de la mucosa colónica.

Lee (1991) detectó niveles bajos de *Escherichia coli* y *Lactobacillus*, un pH fecal elevado y sobrecrecimiento de *Candida*, en casos crónicos de blastocistosis. Ante estos hechos, sospechó que *B. hominis* podría tener una débil patogenicidad que contribuiría a la enfermedad como parte de un gran cuadro que incluiría otros componentes nutricionales y digestivos. Otros autores consideran que se comporta como patógeno en pacientes inmunodeprimidos (Cook, 1987; Llibre *et al.*, 1989; Ayadi *et al.*, 1992).

Zuckerman *et al.* (1994) realizaron ensayos para detectar incrementos en la permeabilidad intestinal con ⁵¹Cr EDTA. El incremento de la permeabilidad puede interpretarse como una evidencia indirecta de daño intestinal; pero sus resultados fueron negativos. Por el contrario, Dagci *et al.* (2002) mostraron un incremento de la permeabilidad intestinal significativo estadísticamente, en pacientes infectados por *B. hominis* respecto de un

grupo control; con valores similares a los obtenidos en *Giardia lamblia*. La molécula utilizada por este grupo fue DTPA (dietil-triamina-penta-ácido acético) marcada con tecnecio 99^m. Este último estudio contribuye a reforzar la idea de *B. hominis* como protozoo patógeno.

En la búsqueda de determinantes de patogenicidad, Long *et al.* (2001) co-cultivan células de *B. hominis* con líneas celulares de epitelio colónico (HT-29 y T-84). Pasadas 24 horas no se observan efectos citopáticos, pero si se detectan incrementos significativos de citoquinas, en concreto IL-8 y el GM-CSF. Estos datos indican que *B. hominis* induce y modula la producción de citoquinas en células del epitelio intestinal, lo cual permiten plantear que durante la infección se produzcan eventos patofisiológicos. Pese a que no se ha encontrado un modelo experimental adecuado para reproducir el ciclo completo del parásito, existen estudios en animales de experimentación y evidencias clínico-biológicas en humanos, que abogan por el carácter patógeno de *B. hominis*.

1.5.1. Estudios patogénicos en humanos

Existe un cierto consenso sobre *B. hominis* como causa de enfermedad cuando se confirma la ausencia de cualquier otro patógeno conocido (bacteriano, vírico o parasitario) y aparece en número elevado en las heces (>5 / 40x). Tal y como publican los siguientes autores: García *et al.* (1984); Ricci *et al.* (1984); LeBar *et al.* (1985); Vannatta *et al.* (1985); Sheenan *et al.* (1986); Kain *et al.* (1987); Pikula (1987); El Masry *et al.* (1988); García Pascual *et al.* (1988); Russo *et al.* (1988); Mai Nguyen y Krech (1989); Zierdt (1991b); Ayadi *et al.* (1992) y Carbajal *et al.* (1997a).

Sin embargo, diversos estudios no encuentran correlación entre el número de *B. hominis* en heces y la aparición de enfermedad (Markell y Udkow, 1986; Kain *et al.*, 1987; Kain y Noble, 1989; Sun *et al.*, 1989; Doyle *et al.*, 1990; Senay y MacPherson, 1990; Steinmann *et al.*, 1990). Asimismo, otros autores consideran a *B. hominis* como un patógeno potencial, independientemente del recuento y del hospedador (Babcock *et al.*, 1985;

Weg *et al.*, 1987; Garavelli *et al.*, 1988; Babb y Wagener, 1989; Guglielmetti *et al.*, 1989; Llibre *et al.*, 1989).

Sheenan *et al.* (1986), Kain *et al.* (1987) y Carbajal *et al.* (1997a) coinciden en que la visión de un gran número de parásitos en heces se asocia más frecuentemente con formas agudas, aunque no es predictivo de diarrea necesariamente; al igual que ocurre con el morfotipo ameboide que predomina sobre el vacuolar en cuadros diarreicos agudos (Zierdt, 1991a; Carbajal *et al.*, 1997a; Lanuza *et al.*, 1997a). Matsumoto *et al.* (1987) no observan este morfotipo en ninguna de sus muestras.

Los estudios anatomopatológicos coinciden en que la parasitación por *B. hominis* no es una infección entero-invasiva (Zierdt y Tan, 1976a; Zuckerman *et al.*, 1990). No obstante, se han comunicado casos de colitis e ileítis terminal con una reacción inflamatoria inespecífica de la lámina propia (Kain *et al.*, 1987; Russo *et al.*, 1988; Tsang *et al.*, 1989). Cohen (1985) no observó invasión, aunque la apariencia endoscópica del sigma y la observación de células inflamatorias en las heces sí sugerían invasión tisular. Galantowicz *et al.* (1993) observaron, mediante biopsia colónica, colitis inespecífica, infiltración focal de glándulas por neutrófilos, infiltrado plasmocitario en lámina propia y cambios epiteliales. Se ha comunicado un caso de proctosigmoiditis hemorrágica, donde mediante biopsia del sigmoides se observó eritema difuso e inflamación moderada (Carrascosa *et al.*, 1996).

Otro de los factores que apoyan la patogenicidad de este microorganismo es la remisión de la sintomatología y la aclaración de las heces tras tratamiento antibiótico (Babb y Wagener, 1989; Qadri *et al.*, 1989; Jeddy y Farrington, 1991; Galantowicz *et al.*, 1993; Carrascosa *et al.*, 1996; Levy, George y Shoenfeld, 1996).

Sin duda la hipótesis que sigue cobrando más fuerza es la existencia de poblaciones de *B. hominis* con diferente potencial patógeno

(Kukoschke y Müller, 1991; Garavelli *et al.*, 1995; Mansour *et al.*, 1995; Zierdt *et al.*, 1995; Clark, 1997; Kaneda *et al.*, 2001).

1.5.2. Efectos en los animales de experimentación

Boreham y Stenzel (1993b) enfatizan en que uno de los principales problemas para verificar el papel de *Blastocystis hominis* como patógeno, es la falta de un modelo experimental adecuado.

Phillips y Zierdt (1976) inocularon, por vía oral y cecal, cultivos axénicos y no axénicos de *B. hominis* en animales de laboratorio y comprobaron que únicamente los cultivos no axénicos producía hiperemia macroscópica y alteraciones microscópicas de la mucosa intestinal. Por este motivo, Narkewicz *et al.* (1989) sugirieron que la flora intestinal desempeña un importante papel en la patogenicidad de este parásito. Silard *et al.* (1977) inocularon intrahepáticamente *B. hominis* asociado a *E. histolytica* y observaron a *B. hominis* en vasos sanguíneos, lo cual les sugirió su posible diseminación hematogena. La producción de una reacción exudativa de tipo alérgico y la supervivencia del parásito en el hígado, les indujo a pensar en la adaptabilidad de este parásito al tejido hepático y su potencial patogenicidad extraintestinal. Zierdt (1991a) en un modelo experimental de asa ileal aislada de conejo, demostró la existencia de una toxina diarreogénica en los filtrados de los cultivos de *B. hominis*.

Moe *et al.* (1997) inoculan ratones jóvenes inmunocompetentes con quistes fecales de *B. hominis* (xénicos) por vía oral, e intracecalmente con formas vacuolares y granulares procedentes de cultivo axénico. Los parásitos se detectaron en heces a los dos días post-inoculación, con infecciones a las dos semanas. La infección producía pérdida de peso y aletargamiento, y la aparición de infiltrado celular y edema en la lámina propia. La conclusión es que se trata de un parásito intestinal no invasivo.

En un estudio relacionado, cuando *B. hominis* era inyectado intramuscularmente en los ratones (Moe *et al.*, 1998) las lesiones que aparecieron se autolimitaron a mionecrosis.

1.6. Manifestaciones clínicas

B. hominis es considerado responsable de un cuadro clínico denominado “blastocistosis” y que, Garavelli *et al.* (1992) y Garavelli y Libanore (1993) han llamado enfermedad de Zierdt-Garavelli. En las infecciones sintomáticas por este organismo la manifestación clínica más frecuente es la diarrea. El cuadro clínico puede ser leve y autolimitado, agudo o crónico, con una duración que oscila entre 3 y 10 días, aunque puede persistir durante meses. Otras manifestaciones clínicas frecuentes son el dolor abdominal, la flatulencia, náuseas, vómitos y molestias abdominales inespecíficas (Zierdt, 1991a; Boreham y Stenzel, 1993b)

Únicamente se ha comunicado un caso de muerte por diarrea refractaria y fulminante de etiología desconocida, en el cual el único enteropatógeno hallado fue *B. hominis* (Zierdt y Tan, 1976a). Jeddy y Farrington (1991) describieron un caso de infección por *B. hominis* en un paciente con colitis ulcerosa en fase activa, tras tratamiento específico frente a la parasitosis se produjo la curación clínica y desaparecieron los síntomas.

Varios estudios refieren eosinofilia periférica en pacientes parasitados por *B. hominis* (Sheenan *et al.*, 1986; Garavelli *et al.*, 1988 y 1991; García Pascual *et al.*, 1988; Krech *et al.*, 1990; Botet *et al.*, 1992; Fleta *et al.*, 1993). Otros autores, sin embargo, no hallaron aumento de eosinofilia en sus series (Weg *et al.*, 1987; Waghorn y Hancock, 1991).

La aparición de cuadros diarreicos crónicos, persistentes o recidivantes es más frecuente en pacientes inmunocomprometidos (Ricci *et al.*, 1984; Cook, 1987; Weg *et al.*, 1987; Garavelli *et al.*, 1989a y 1989b; Lee *et al.*, 1990); observado también en pacientes VIH (Llibre *et al.*, 1989; Narkewicz *et al.*, 1989; Salavert *et al.*, 1989; Garavelli *et al.*, 1990a y 1990b).

Por lo que hay autores plantean la posibilidad de que se trate de un patógeno oportunista (Devera *et al.*, 1998); mientras que otros aseveran lo contrario (Pinel *et al.*, 1999).

Existen pocas referencias en las que *B. hominis* se asocie a cuadros extraintestinales. Lee *et al.* (1990) comunicaron un caso de artritis en la que se visualizó *B. hominis* en el líquido sinovial, responsabilizando al estado de inmunodepresión por el tratamiento antiinflamatorio, de la diseminación hematógica del parásito. Lakhanpal *et al.* (1991) publicaron un caso de artritis reactiva tras enteritis por *B. hominis* y consideraron que este parásito debería tenerse en cuenta en este tipo de procesos.

También se ha descrito manifestaciones alérgicas tales como urticaria, angioedema, prurito, rinitis, asma bronquial, rinoconjuntivitis, artralgas, asociadas a la presencia de *B. hominis* en heces (Muntean y Boceat, 1989; Martín *et al.*, 1992; Bartolomé *et al.*, 1993; Tórtola *et al.*, 1994). Boccardo *et al.* (1996) describieron un caso de peritonitis en un paciente sometido a diálisis peritoneal ambulatoria, en el que se aislaron *Pseudomonas aeruginosa* y *B. hominis*.

Además se han descrito diversos signos y síntomas generales e inespecíficos, tales como fiebre, cefalea, insomnio, mareo, laxitud, anorexia, pérdida de peso, deshidratación, tenesmo, prurito y ocasionalmente estreñimiento (Zierdt, 1991a). Se ha asociado la parasitación por *B. hominis* con el síndrome de colon irritable. Hussain *et al.* (1997) demostraron que los pacientes con síndrome de colon irritable tenían títulos significativamente elevados de IgG2 frente a antígenos carbohidratados de *B. hominis*. En otro estudio realizado por Giacometti *et al.* (1999) se describe asociación entre pacientes con síndrome de colon irritable y la presencia de *B. hominis* en sus heces. No se ha podido confirmar que *B. hominis* sea el agente etiológico primario del síndrome de colon irritable, quizás sea la disrupción de la flora microbiana en estos pacientes la que favorezca las condiciones para que *B. hominis* proliferen.

Coincidiendo con que determinados microhábitats intestinales pueden favorecer el sobrecrecimiento de *B. hominis*; Horiki *et al.* (1999) demuestran que en el caso de cuatro pacientes que presentaban obstrucción intestinal debida a un carcinoma, y en los que el número de parásitos detectados era muy elevado (30/100x); una vez resuelta la obstrucción mediante cirugía y sin administrar terapia específica, la parasitosis remitía hasta desaparecer. Existe otra referencia publicada por Ghosh *et al.* (1998) que incide en el carácter patógeno de *Blastocystis* en un paciente con trasplante alogénico de médula ósea en el que se produce un cuadro agudo de enfermedad intestinal post-trasplante (GVHD), complicado por la presencia de *B. hominis*. El paciente sufrió de diarrea profusa con recuento elevado de parásitos, infiltrado focal neutrofilico en lámina propia demostrado mediante biopsia rectal, y respondió a la terapia con metronidazol.

1.7. Aspectos epidemiológicos

B. hominis es un parásito intestinal de distribución cosmopolita, y el que se detecta con más frecuencia en cualquier parte del mundo. Los datos de prevalencia son dispares, entre el 3 y el 16% en los países desarrollados hasta el 50%, en países en vías de desarrollo (Boreham y Stenzel, 1996). Los datos de menor prevalencia son los publicados en Japón por Horiki *et al.* (1997), quienes tras analizar una población de 6422 asintomáticos, tan sólo encuentran parasitación en 30 de ellos (0,5%).

La carencia de agua, alcantarillado y un incorrecto tratamiento de las aguas residuales, aumentan los riesgos de contraer la infección (Cirioni *et al.*, 1999; Guignard *et al.*, 2000; Taamasri *et al.*, 2000). El incremento del riesgo de infección se asocia también con el lugar de trabajo. En un estudio realizado en Malasia por Rajah Salim *et al.* (1999) analizando la prevalencia en manipuladores de animales, encuentran que el 41% estaba parasitado por *Blastocystis*, con un ratio de un 17% respecto al grupo control. Los autores sugieren que probablemente adquieran la infección por vía oral-fecal.

Herwaldt *et al.* (2001) comprueban, con un grupo de voluntarios en Guatemala, que el riesgo de adquirir la infección es significativamente mayor cuando se trabaja en áreas en las que este parásito es endémico.

No se han encontrado diferencias significativas de prevalencia entre ambos sexos, sólo un ligero predominio en el sexo femenino (García *et al.*, 1984; Reinthaler *et al.*, 1987; Qadri *et al.*, 1989; Sun *et al.*, 1989; Senay y MacPherson, 1990; Grossman *et al.*, 1992; Nimri, 1993; Carbajal *et al.*, 1997a). Pero si hay un mayor un predominio de *B. hominis* en población adulta sobre la población infantil (Kain *et al.*, 1987; Qadri *et al.*, 1989; Doyle *et al.*, 1990; Senay y MacPherson, 1990; Carbajal *et al.*, 1997a; Wang *et al.*, 2002).

Los viajes a países tropicales y subtropicales se han asociado con mayor riesgo de adquirir la parasitosis (Sheehan *et al.*, 1986; Kain *et al.*, 1987; Yamada *et al.*, 1987a; Babb y Wagener, 1989; Narkewicz *et al.*, 1989; Guglielmetti *et al.*, 1989; Pinel *et al.*, 1999; Harms *et al.*, 2002). Parece que el clima también pueda favorecer la incidencia de la infección. Babcock *et al.* (1985), en Nepal, describieron un marcado incremento de *B. hominis* (del 10% al 24,7%) en los meses premonzónicos (abril, mayo y junio). Además, Boreham y Stenzel (1993b) indicaron que se daba un aumento de la prevalencia en los meses calurosos y húmedos del verano. Por el contrario, otros autores no han observado ninguna variación estacional (Garavelli y Scaglione, 1989a).

En cuanto a la parasitosis en inmunosuprimidos, la prevalencia no difiere de la población normal en el caso de pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirido (Borrás *et al.*, 1991c), aunque hay autores que apuntan lo contrario (Devera *et al.*, 1998). La parasitación ha resultado ser especialmente relevante en inmunodeprimidos aquejados de hemopatías malignas (Pinel *et al.*, 1999).

1.7.1. Datos de prevalencia en España

En nuestro país se han realizado diversos estudios epidemiológicos sobre la parasitación por *B. hominis*. Martín *et al.* (1992) estudiaron la prevalencia de este parásito en población infantil y objetivaron la tasa de prevalencia más elevada en niños en edad escolar de entre de 10 a 14 años (10,3%). Además, constataron una tasa del 2,57% en niños hospitalizados, cuyo único enteropatógeno fue *B. hominis*, inferior a la descrita por Clavel *et al.* (1991) en niños hospitalizados con síntomas gastrointestinales.

Borrás *et al.* (1991b y 1991c), mostraron una prevalencia que oscilaba entre 3% y el 30% en pacientes asintomáticos y sintomáticos. En un estudio comparativo entre pacientes infectados (VIH) y no infectados (NVIH) por el virus de la inmunodeficiencia humana, observaron una tasa ligeramente superior, aunque carente de significación, en pacientes VIH (6,2% VIH frente a 5,3% NVIH).

Pena *et al.* (1992) encontraron un 5,5% de pacientes con *B. hominis*; Bartolomé *et al.* (1993) indicaron que este parásito es el más prevalente en pacientes alérgicos; mientras que Tórtola *et al.* (1994) detectaron una tasa del 13,3%. El último estudio publicado es el de Carbajal *et al.* (1997a), quienes comunicaron una prevalencia global del 16,5% y una proporción de portadores asintomáticos del 3,3%. Sin diferencias entre población VIH frente a NVIH (18,6% VIH frente a 17% NVIH) destacables.

1.7.2. Mecanismos de transmisión

La parasitación por *B. hominis* es considerada una zoonosis cuya vía de transmisión es fecal-oral. Diversos estudios encuentran correlación entre esta parasitación y el consumo de agua no tratada (Kain *et al.*, 1987; Reinthaler *et al.*, 1988a). Garavelli y Scaglione (1989a) afirmaron que la transmisión de *B. hominis* se produce por la ingestión de agua, frutas o vegetales contaminados con excrementos de animales. Además de la

existencia de reservorios animales, consideraron la posibilidad de transmisión interhumana por manos sucias, relación orogenital y oroanal. La existencia de brotes epidémicos en instituciones cerradas y en familias constituye otra evidencia que sustenta la transmisión fecal-oral (Yamada *et al.*, 1987b; Guglielmetti *et al.*, 1989). Zaman *et al.* (1994b) aíslan *B. hominis* del alcantarillado. Taamasri *et al.* (2000) en un estudio realizado con soldados, relacionan esta parasitosis con la calidad del agua de bebida.

La descripción de formas quísticas y la demostración, en modelo animal, de que únicamente animales inoculados con estas formas excretaban trofozoítos fecales (Suresh *et al.*, 1993), confirman esta vía de transmisión. En un estudio realizado en viviendas en las que se criaban cerdos, Devera *et al.* (1999) demostraron que en todas las viviendas con cerdos parasitados por *Blastocystis* spp. había casos en humanos; argumentando que los cerdos podrían actuar como reservorios de la infección.

Yoshikawa *et al.* (1996c), mediante técnicas moleculares, señalaron la posibilidad de que esta parasitación sea una zoonosis al demostrar la existencia de variaciones intraespecíficas en aislados de *B. hominis* procedentes de diferentes hospedadores.

La transmisión interhumana se evidencia en un estudio realizado por Yoshikawa *et al.* (2000) en el que al comparar el genoma de cepas procedentes de dos centros de salud diferentes, observaron que el intercambio humano venía acompañado de intercambio de cepas; por lo que consideran la infección por *B. hominis* como una antropozoonosis.

1.8. Tratamiento

Debido a la controversia sobre su patogenicidad, no existe consenso sobre la necesidad terapéutica en la parasitación por *B. hominis*, salvo en el caso de los portadores asintomáticos en el que todos coinciden en no tratar (Haldane, 1988). Las principales razones aducidas para

desaconsejar el tratamiento son: la curación biológica espontánea (Babb y Wagener, 1989), la aparición de efectos secundarios (Narkewicz *et al.*, 1989), el carácter autolimitado de la infección (Zierdt, 1991a) y la persistencia de *B. hominis* tras el tratamiento antibiótico (Cohen, 1985; Markell, 1995). Grossman *et al.* (1992) no encontraron una diferencia significativa entre la ratio de erradicación de *B. hominis* con metronidazol y la desaparición espontánea del parásito en heces.

Sin embargo, hay autores que aconsejan el tratamiento en pacientes sintomáticos, con independencia del estado inmunitario, aún cuando la resolución espontánea pudiese acontecer ocasionalmente (Vannatta *et al.*, 1985; Weg *et al.*, 1987; Haldane, 1988; Russo *et al.*, 1988; Krech *et al.*, 1990; Botet *et al.*, 1992).

García-Martos y Benjumeda (1992) establecen como criterios terapéuticos la persistencia o recurrencia de síntomas, la aparición de eosinofilia y la observación de gran número de *B. hominis*.

El tratamiento en las infecciones por *B. hominis*, se administra de forma empírica, sin estudios de sensibilidad previos. El fármaco de elección es el metronidazol, a dosis entre 250 y 750 mg/8h/vo durante 5 a 10 días (Kain *et al.*, 1987; Qadri *et al.*, 1989; Telalbasic *et al.*, 1991). En niños, Guglielmetti *et al.* (1989) utilizaron este fármaco a dosis de 50mg/kg de peso cada 8 h. Normalmente se consigue la resolución de la sintomatología y el aclaramiento de las muestras tras catorce días de tratamiento; sin embargo, se han comunicado casos donde la eliminación del parásito puede prolongarse entre 3 y 6 meses. También se han descrito recidivas (Weg *et al.*, 1987; Garavelli *et al.*, 1989b y 1991). Zaman y Zaki (1996b) demuestran la ineficacia del metronidazol con dosis de más de 5 mg/ml en un concentrado fecal de quistes, y sugirieron la necesidad de encontrar una droga cistocida que evite recidivas y reduzca el riesgo de transmisión exógena.

La descripción de fallos terapéuticos y de intolerancia a dosis tan elevadas de metronidazol ha motivado el empleo de otros fármacos. Zierdt (1991a) sugiere que en los casos de blastocistosis crónica se aumente la dosis de metronidazol, y si se trata de una blastocistosis refractaria al fármaco, se proceda a la administración de tetraciclinas para eliminar el soporte bacteriano esencial para la supervivencia de *B. hominis*. Dunn y Boreham (1991) valoran la capacidad inhibitoria de 42 drogas encontrando que las más efectivas eran el dihidrocloro emetina, furazolidona, satranidazol y S75 0400A.

Haresh *et al.* (1999) encuentran distinto grado de resistencia al metronidazol en aislados humanos procedentes de diferentes localizaciones geográficas; sosteniendo que la dieta, la respuesta inmunitaria del hospedador o la influencia del medio ambiente, son factores que pueden afectar a la sensibilidad al metronidazol de *Blastocystis*. En los últimos tiempos se realizan los ensayos de sensibilidad a los fármacos utilizando colorantes vitales, como el rojo neutro, que permiten conseguir datos de viabilidad cuantitativos (Vdovenko y Williams, 2000b).

Otras pautas terapéuticas utilizadas con buenos resultados han sido: paromomicina, a dosis de 25 mg/kg/vo cada 8 horas durante 5 a 10 días (Boreham y Stenzel, 1993a), tinidazol a razón de 2 g/d/vo durante 4 semanas (Cohen, 1985; Zaki *et al.*, 1991), el iodoquinol (Zuckerman *et al.*, 1990). Varios estudios comunicaron otros fármacos efectivos para esta parasitación: iodoquinolona (Haldane, 1988), cotrimoxazol (Schwartz y Houston, 1992; Ok *et al.*, 1999), furazolidona (Narkewicz *et al.*, 1989), rifaximina (Amenta *et al.*, 1999).

Yang *et al.* (1996) buscaron nuevas alternativas en la medicina tradicional china realizando un ensayo de sensibilidad *in vitro* con tres cultivos axénicos de *Blastocystis*. De los 20 extractos probados encontraron dos con capacidad altamente inhibitoria (*Coptis chinensis* y *Brucea javanica*).

Actualmente la pauta terapéutica a seguir es el metronidazol o el idoquinol como tratamientos de elección, y en segunda línea el cotrimoxazol y la paromomicina (Stenzel y Boreham, 1996).

1.9. Nuevas perspectivas

Durante la última década se ha realizado un sustancial progreso en la comprensión de la biología de *B. hominis*. Se han mejorado los métodos de cultivo y de axenización, lo que ha permitido conocer mejor su morfología y el modo de transmisión. Las nuevas aportaciones sobre secuenciación génica, permitirán comparar las secuencias que se van obteniendo en las bases de datos existentes, y así investigar el funcionamiento de sus homólogos. Pero a pesar de la nueva información que va surgiendo, los datos sobre su ciclo biológico, su taxonomía o su condición como patógeno primario, siguen sin ser concluyentes y en cierto casos resultan contradictorios; por lo que aún quedan muchos aspectos de la biología básica de *Blastocystis* pendientes de conocer. Uno de los últimos hallazgos se refieren al fenómeno de muerte celular programada.

1.9.1. Muerte celular programada

Se pensaba que la apoptosis se daba únicamente en organismos multicelulares, la observación de fenómenos de muerte celular programada o apoptosis manifestada por algunos parásitos unicelulares, incluido *B. hominis*, se conoce desde hace poco tiempo. La muerte celular programada es un mecanismo que restringe el daño a las células afectadas al mantener intactas las estructuras membranosas de estas células; al contrario que la muerte celular necrótica que implica liberación del contenido intracelular citotóxico, que puede perjudicar a las células vecinas y a los tejidos. Los artículos relativos a muerte celular en bacterias, levaduras y protozoos parásitos plantean que la maquinaria celular de la apoptosis está altamente conservada y probablemente existía desde antes de que apareciera la multicelularidad (Tan *et al.*, 2002). La propuesta para que se produzca apoptosis en organismos unicelulares, sería que bajo condiciones de falta de

alimento una proporción de las células sufriría muerte programada para proveer de alimento a la parte de la población que sobrevive.

Tan *et al.* (2001a) investigan la existencia de estos fenómenos en colonias de *B. hominis* crecidas en agar semisólido. Tras fijarlas *in situ* y procesarlas para TEM, revelan que las células localizadas en el centro de las colonias, sufren una extraña fragmentación en numerosas estructuras membranosas que contienen los distintos orgánulos. Plantean que las estructuras membranosas son análogas de los cuerpos apoptóticos descritos en las células de mamíferos, y que servirían para reducir el número de células que sufrirán daños. En la periferia de las colonias se ven formas ameboides con estas estructuras membranosas en su interior, probablemente ingeridas para ser utilizadas como nutrientes.

Nasirudeen *et al.* (2001a) indujeron la apoptosis en células de *B. hominis*, tras exponerlas a la acción del anticuerpo monoclonal citotóxico 1D5 (Tan *et al.*, 1997). Los efectos observados con el TEM se resumen en: reducción del tamaño celular, condensación del material cromatínico, fragmentación del ADN nuclear, externalización de la fosfatidil-serina y el acúmulo de cuerpos apoptóticos en la vacuola central; manteniendo la integridad de la membrana plasmática.

Con el objetivo de dar aproximaciones nuevas al fenómeno de muerte celular programada, y no las meramente morfológicas o histoquímicas, Nasirudeen *et al.* (2001b) focalizan sus estudios hacia la familia del gen y de las proteínas de la caspasa, evolutivamente muy conservadas, y que juegan un papel crucial en la activación del proceso de apoptosis (Tan *et al.*, 2002). Estudios recientes han mostrado que las proteínas similares a la caspasa-3 existentes en *B. hominis* incrementan significativamente su actividad durante la muerte apoptótica, y han conseguido el aislamiento del gen homólogo de la caspasa-3 por alineación de la secuencia peptídica y PCR.

Estos hallazgos añaden a *B. hominis* en la lista creciente de organismos unicelulares que exhiben fenómenos de apoptosis; dando la oportunidad de identificar y caracterizar nuevas moléculas involucradas en el mecanismo de muerte programada. El hecho de que ciertos reguladores de este fenómeno estén conservados entre los protozoos parásitos, pero sean suficientemente divergentes respecto del de los humanos, plantearía la posibilidad de buscar nuevos fármacos que activaran estas dianas y encaminaran a las células parásitas hacia la apoptosis.

2. Objetivos

En los últimos años, diversos trabajos han puesto de manifiesto la existencia de variaciones intraespecíficas entre aislados de *B. hominis*. La descripción de diferentes perfiles proteicos, cariotipos y zimodemas, constituyen entre otras, pruebas de la posible existencia de poblaciones morfológicamente idénticas que quizás estén dotadas de un potencial patogénico diferente; y aunque actualmente este extremo no ha sido totalmente confirmado, existen evidencias de que esa posibilidad es plausible.

El aislamiento de *B. hominis* en procesos diarreicos agudos y crónicos como único agente causal, frente a su aislamiento en portadores asintomáticos; permite presuponer que, al margen de diferencias en la susceptibilidad individual, existan diferencias en el potencial patogénico de este organismo.

El objeto de este estudio es el de establecer asociaciones entre las variantes moleculares detectadas y su significación clínica, para lo cual nos propusimos:

- 1.- Cultivar y axenizar aislados de *B. hominis* de muestras fecales de pacientes con síndromes diarreicos, así como de portadores sanos.
- 2.- Detectar el grado de variación genética críptica en estos aislados mediante el análisis de los perfiles de RFLP, obtenidos a partir de dos amplicones diferentes.
- 3.- Evaluar el poder discriminatorio del estudio de secuencias repetitivas de ADN mediante PCR, en la detección de variación intraespecífica de aislados de este organismo.
- 4.- Comprobar la posible existencia de zimodemas entre algunas de las actividades enzimáticas expresadas por este parásito.

3. Material y métodos

3.1. Origen de los aislados

Para la realización del presente estudio se utilizaron cepas de colección y aislados recientes de *B. hominis*.

3.1.1. Cepas de colección

Se incluyeron 13 cepas axénicas de colección (BH91-01 y 02; BH92-05,07,08,09,10,12,16 y 17; BH93-18,19 y 20), obtenidas de pacientes sintomáticos: 38,5% con diarrea aguda frente a 61,5% con diarrea crónica; 61,5% hombres frente a 38,5% mujeres; 76,9% adultos frente a 23,1% niños (tabla1) (Carbajal *et al.* 1997, Lanuza *et al.* 1997a), conservadas a -70°C en medio Boeck-Drbohlav modificado (Lanuza *et al.* 1997a).

Tabla 1.- Características de la población origen de las cepas de colección

Caso	Sexo	Grupo etario	Diarrea	Enteropatógenos
BH91-01	H	A	Crónica	
BH91-02	H	A	Crónica	
BH92-05	H	I	Crónica	
BH92-07	H	A	Crónica*	
BH92-08	M	I	Crónica	<i>Salmonella spp.</i>
BH92-09	H	I	Aguda	
BH92-10	M	A	Crónica*	
BH92-12	M	A	Crónica	
BH92-16	H	A	Aguda	
BH92-17	M	A	Aguda	
BH93-18	M	A	Crónica*	
BH93-19	H	A	Aguda	
BH93-20	H	A	Aguda	

H: hombre; M: mujer; A: adulto; I: niño; *: paciente inmunodeprimido

3.1.2. Aislados recientes

Se obtuvieron mediante cultivo de muestras fecales no conservadas de origen humano, remitidas al Servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Durante un periodo de dos años, se procesaron 260 muestras de sendos pacientes (ratio hombre-mujer: 1,13:1; ratio adulto-niño: 4,84:1; ratio diarrea-ausencia de diarrea: 11,38:1; ratio inmunocompetente-inmunodeprimido: 4,91:1), elegidas al azar (tabla 2).

Tabla 2.- Características de la población estudiada

	Población				Totales	
	Infantil		Adulta			
	Nº de casos	%	Nº de casos	%	Nº de casos	%
Hombre	17	45,9	121	54,3	138	53,1
Mujer	20	54,1	102	45,7	122	46,9
Asintomáticos	4	10,8	17	7,6	21	8,1
Sintomáticos	33	89,2	206	92,4	239	91,9
Inmunosuprimidos	0	0	44	19,7	44	16,9
Inmunocompetentes	37	100	179	80,3	216	83,1

El estudio microbiológico incluyó: i) examen macroscópico para la valoración de la consistencia fecal y la detección de estigmas patológicos; ii) examen microscópico directo para la identificación de elementos parasitarios y recuento de *B. hominis* (Carbajal *et al.* 1997a), y para la detección de células inflamatorias, hematíes y cristales de Charcot-Leyden; iii) estudio parasitológico tras concentración por el método de Ritchie modificado (Ridley y Nawgood, 1956). Aquellas muestras positivas para *B. hominis* a las que no se les había solicitado otros estudios microbiológicos, fueron procesadas para el aislamiento de enteropatógenos bacterianos (Murray, 1996), y en el caso de la población infantil se incluyó también la detección de antígenos de rotavirus y adenovirus (Biokit S.A., Barcelona).

3.2. Aislamiento en cultivo de *B. hominis*

Se utilizó el medio Boeck-Drbohlav (Zierdt 1963, 1973) modificado por Lanuza *et al.* 1997a.

3.2.1. Preparación del medio de cultivo

El medio Boeck-Drbohlav modificado (MBDM) es un medio bifásico, compuesto por una fase sólida, obtenida mediante coagulación de una ovosuspensión preparada con solución de Locke, y una fase líquida que contiene suero y la citada solución:

- **Preparación de la solución de Locke:** Se utilizó la solución de Locke modificada por Lanuza *et al.* (1997a): glucosa (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) 0,5% p/v; cloruro sódico (Panreac Química S.A., Montcada i Reixac) 1,6% p/v; cloruro cálcico (Merck, Darmstadt) 0,04% p/v; cloruro potásico (Panreac), 0,04% p/v; cloruro magnésico (Merck) 0,002% p/v; Na₂PO₄ (Merck) 0,4% p/v; bicarbonato sódico (Merck), 0,08% p/v; fosfato monopotásico (Panreac), 0,06% p/v. Los diferentes componentes eran disueltos en agua bidestilada, mediante calor y agitación. Tras 18 horas de reposo a temperatura ambiente se procedía a su filtración, a través de una capa de papel Whatman nº 1 (Whatman International Ltda. Maydstone), y esterilización en autoclave a 121°C, durante 15 minutos.
- **Preparación de la fase sólida:** La fase sólida se preparaba mediante la coagulación de una ovosuspensión en solución de Locke modificada (4:1 v/v), para lo cual: i) el contenido de huevos completos, previamente lavados con agua jabonosa y alcohol de 96°, era emulsionado mediante agitación manual con solución de Locke hasta la obtención de una mezcla homogénea; ii) la suspensión era colada y dispensada en tubos de vidrio de 16 x 160 mm, con tapón de rosca, a razón de 5 ml por tubo; iii) se procedía a la coagulación en baño termostático (80°C, 30 minutos), de forma que quedara una lengüeta

de 3 a 4 cm de longitud; iv) los tubos eran esterilizados en autoclave (121°C, 15 minutos) y conservados a 4°C, hasta su utilización.

- **Preparación del medio completo:** El medio MBDM se obtenía tras la adición, sobre la fase sólida, de 4 ml de la fase líquida preparada extemporáneamente mediante la mezcla (1:1, v/v) de solución de Locke y suero de caballo (Bifakit S.L., Madrid) inactivado a 56°C, durante 30 minutos.

3.2.2. Cultivo

Alícuotas de 500 µl de las suspensiones fecales en solución salina isotónica, en las que la observación microscópica había revelado la existencia de *B. hominis*, fueron inoculadas en dos tubos de MBDM, previamente pre-reducidos; uno de ellos con solución antibiótica básica (Zierdt y Williams, 1974), de modo que la concentración final de los antibióticos en la fase líquida fuese de: ampicilina (Gobemicina®, Lab. Normon S.A., Madrid), 4mg/ml; estreptomicina (Estreptomicina sulfato®, CEPA, Madrid), 1,25 mg/ml; anfotericina B (Fungizona®, Squibb, Industria Farmacéutica S.A.) 0,006 mg/ml.

Los cultivos eran incubados a 37°C en atmósfera anaeróbica, obtenida mediante la adición de 1 ml de parafina líquida estéril (Merck). Una vez adaptado el parásito a las condiciones *in vitro*, que se constataba mediante examen microscópico, semanalmente se efectuaban subcultivos en MBDM pre-reducido, con y sin antibióticos, al tiempo que se realizaba el aislamiento en cultivo de las bacterias aerobias y anaerobias, para su identificación y estudio de sensibilidad a los antibióticos.

3.2.3. Proceso de Axenización

La eliminación de las bacterias cocultivadas con *B. hominis* resistentes a los antibióticos de la mezcla antibiótica básica, se realizó en MBDM según el protocolo de Lanuza *et al.* (1997a), que combina la

purificación parcial de *B. hominis* en gradiente de densidad y su inoculación en medio fresco suplementado con antibióticos activos frente a las bacterias:

- **Preparación del gradiente de densidad:** Se ha utilizado el método del ficoll-ácido metrizóico, preconizado por Upcroft *et al.* (1989), que se preparaba mezclando 96 ml de la solución de ficoll 400 (Pharmacie, Uppsala) con 40 ml de ácido metrizóico al 33% (Sigma) y ajustando la densidad de la mezcla a 1.077 g/ml. Dicha solución era esterilizada en autoclave (121°C, 15 minutos) y conservada a 4°C al abrigo de la luz hasta su utilización.
- **Protocolo:** La eliminación de las bacterias se realizó de modo secuencial para facilitar la adaptación del parásito al cultivo *in vitro*, en ausencia de otros organismos, para lo cual: i) el sedimento del cultivo en MBDM era depositado sobre 10 ml de la solución de ficoll-ácido metrizóico, y centrifugado a 500 g durante 30 minutos; ii) la banda situada a 0,5 -1 cm del menisco de la solución era recogida y lavada tres veces (500 g, 10 minutos) con solución salina isotónica estéril; iii) el sedimento obtenido era inoculado en MBDM pre-reducido adicionado de antibióticos (vgr. imipenem -Tienam®, Merck; ceftazidima -Fortam®, Glaxo Welcome, PTM, Madrid; fosfomicina -Fosfocina®-CEPA, Madrid; vancomicina -Diatracin®, Lab Normon; ciprofloxacino -Rigoran®, VITA, Barcelona), de modo que la concentración final en la fase líquida del medio fuese de 1,25 mg/ml.
- **Comprobación:** La adecuada axenización de los cultivos de *B. hominis* se determinó mediante exámenes microscópicos directos, tinción de Gram, y aislamiento en cultivo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

3.2.4. Mantenimiento de los cultivos

Con la finalidad de evitar los riesgos de contaminación microbiana y de deriva genética, los cultivos axénicos y monoxénicos de *B. hominis*

fueron criopreservados, según los protocolos de Zierdt (1974) y Suresh *et al.* (1998), hasta su posterior utilización:

- **Protocolo de Zierdt (1974):** Los cultivos en fase logarítmica de *B. hominis* eran envueltos con algodón, congelados a -20°C durante 24 horas, y posteriormente mantenidos a -70°C . Para su recuperación, se procedía a su descongelación e inoculación en MBDM pre-reducido.
- **Protocolo de Suresh *et al.* (1998):** El sedimento de los cultivos en MBDM era transferido a 10 ml de medio de Dulbecco Iscove modificado (IMDM, Gibco, Life Technologies, Scotland, UK) suplementado con suero de caballo al 20% (v/v) (Bifakit) inactivado a 56°C durante 30 minutos, y el medio era sellado con 1 ml de parafina líquida estéril (Merck) para garantizar las condiciones de anaerobiosis. Al cabo de 3 o 4 días de incubación a 37°C , los cultivos eran centrifugados (500 g, 2 minutos), y los sedimento transferidos a criotubos (Nunc, Nalge International, Denmark) que contenían 2 ml de medio de congelación (70 μl de suero bovino fetal, Gibco; 150 μl de glicerol, Merck; 1.780 μl de medio Mínimo Esencial, Gibco). Los criotubos tras permanecer 30 minutos a temperatura ambiente eran congelados secuencialmente a -20°C y -70°C durante 2 y 12 horas, respectivamente, y finalmente eran conservados en nitrógeno líquido. Para su recuperación el contenido de los criotubos, previamente descongelado, era lavado dos veces con IMDM (500 g, 2 minutos) con el fin de eliminar el medio de congelación, e inoculado en MBDM pre-reducido.

3.3. Detección de variación genética en aislados de *B. hominis* mediante análisis de RFLP

Con el objetivo de examinar el grado de variación genética crítica en los aislados de *B. hominis* de origen humano objeto de estudio, se utilizaron distintas técnicas de “riboprinting” (Böhm-Gloning *et al.*, 1997; Clark, 1997), consistentes en la amplificación de una región de ADN que

codifica para ARN ribosómico y posterior análisis la longitud de los fragmentos obtenidos tras restricción enzimática de dicha región.

3.3.1. Procedimiento de extracción de ADN

Se comparó la eficacia de dos procedimientos, el primero fue el descrito por Böhm-Gloning *et al.* (1997), para lo cual: i) el sedimento de los cultivos en MBDM era lavado dos veces (300 g, 5 min) con tampón fosfato salino (PBS, Oxoid, Hampshire), y la biomasa era resuspendida con 1 ml del mismo tampón; ii) la suspensión celular era depositada en un gradiente de percoll (Pharmacie, Biotech AB, Amersham) al 40%, y la mezcla era centrifugada (300 g, 10 minutos); iii) las células localizadas en la interfase eran recogidas cuidadosamente y lavadas dos veces (300 g, 5 minutos) con PBS (Oxoid); iv) el sedimento obtenido era resuspendido en un tubo eppendorf con 200 μ l de agua bidestilada estéril y conservado a 4°C, hasta su utilización.

El segundo método se realizó según el protocolo descrito por Clark (1997), para lo cual: i) el sedimento del cultivo en MBDM era lavado dos veces (300g, 5 minutos) con tampón PBS (Oxoid) y la biomasa obtenida era resuspendida, en un tubo eppendorf, con 180 μ l del mismo tampón; ii) a cada muestra se le añadían 200 μ l del tampón de lisis (0,1M etilendiaminotetracetato disódico -EDTA- pH 8, Sigma; 0.25% dodecilsulfato sódico -SDS-, BioRad; 20 μ l de proteinasa K, Sigma), y la suspensión era incubada en baño termostático (56°C, 2 horas); iii) se agregaban 60 μ l de cloruro sódico 0,7M (Panreac) y 40 μ l de bromuro de hexadeciltrimetilamonio -CTAB- al 1% (Sigma), y se procedía a su incubación en baño termostático (65°C, 20 minutos); iv) se añadían 500 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico -24:23:1 v/v- (Sigma), la mezcla era homogeneizada vigorosamente y centrifugada a temperatura ambiente a 13.000 rpm, durante 10 minutos (Biofuge A, Heraeus Christ, Osterode), y la fase acuosa obtenida era sometida de nuevo al mismo tratamiento; v) la fase acuosa resultante era tratada con 800 μ l de etanol absoluto a -20°C (Panreac) y centrifugada a 13.000 rpm, durante 10 minutos (Biofuge A,

Heraeus Christ); vi) el sedimento era secado en la estufa a 37°C, resuspendido en 200 µl de agua bidestilada estéril y conservado a 4°C, hasta su utilización.

La eficacia de la amplificación fue muy superior en las muestras extraídas según el protocolo de extracción fenólica de Clark (1997), por lo que fue el elegido para el estudio.

3.3.2. Protocolo de Clark (1997)

En este caso la amplificación se realiza con los iniciadores RD₃ y RD₅ que reconocen la secuencia génica completa de la subunidad menor del ARNr de distintos eucariotas inferiores, incluido *B. hominis*. La región de ADNr amplificada, queda comprendida entre los cebadores:

RD ₅	5'-GGAAGCTTATCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3'
RD ₃	5'-GGGATCCTGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC-3'

3.3.2.1. Amplificación

Se definieron en el termociclador (Technec. Progene, Cambrigde) los siguientes parámetros: i) un ciclo a 94°C de 4 minutos; ii) 30 ciclos comenzando por la desnaturalización a 93°C, durante un minuto, el acoplamiento a 65°C, durante 1 ½ minutos, y la extensión a 72°C, durante 2 minutos.

La reacción de amplificación se realizaba en tubos eppendorf estériles que contenían: 5 µl de ADN (100 ng); 1 µl de RD₅ 50pmol/µl, (Tib Molbiol, Syntheselabor, Berlín, Germany); 1 µl de RD₃ 50pmol/µl, (Tib Molbiol); 0,5 µl de Taq 5U/µl (Boehringer Mannheim, Mannheim); 0,4 µl de dNTP 250µM (Boehringer Mannheim); 5 µl de tampón de amplificación 10x

(Boehringer Mannheim); H₂O destilada c.s.p. 50 µl. Los amplificados eran mantenidos a 4°C, hasta su utilización.

La eficacia de la reacción de amplificación se comprobaba mediante electroforesis (EC 3000-90, EC Apparatus Corporation, St Petersburg, USA) horizontal (Mini-Sub-Cell. GT System, BioRad) en gel de agarosa (BioRad) al 1% en tampón TBE 1x (TBE pH8 5x: tris base -Merck-, 5,4% p/v; ácido bórico -Merck-, 2,75% p/v ; 0,5M EDTA -Sigma-, 2% v/v), a un voltaje constante de 60V durante 2 horas. En cada análisis electroforético era incluido un patrón (marcador nº VII, Boehringer Mannheim), con el objeto de comprobar el tamaño y la posible existencia de más de un fragmento amplificado. El gel era teñido con bromuro de etidio (Sigma) (0,5 µg/ml p/v) y visualizado con luz ultravioleta (Spectroline Transilluminator Model TC-312 A, Spectronics Corporation, Westbuney).

3.3.2.2. Restricción enzimática del fragmento amplificado

El ADN amplificado era sometido a tres reacciones diferentes de digestión enzimática con las endonucleasas: Rsa I (Boehringer-Mannheim), Hinf I (Boehringer-Mannheim) y Alu I (Boehringer-Mannheim), que reconocen y cortan las siguientes secuencias:

<i>Rsa I</i>	G [↓] TCGAC C AGCT [↑] G	<i>Alu I</i>	AG [↓] CT TC [↑] GA	<i>Hinf I</i>	GA [↓] NTC CTNA [↑] G
---------------------	-----------------------------------------------	---------------------	------------------------------------------	----------------------	--------------------------------------------

Los amplificados eran incubados con los diferentes enzimas de restricción (amplicón, 10µl; enzima de restricción, 0,5µl; tampón TBE10x, 2,5µl; H₂O bidestilada, c.s.p. 25µl), a 37°C durante 5 horas.

3.3.2.3. Separación electroforética de los productos de restricción

Los fragmentos obtenidos tras el tratamiento con las endonucleasas fueron separados mediante electroforesis horizontal, junto

con los marcadores nº VII y nº VIII (Boehringer Mannheim), de acuerdo al siguiente procedimiento:

- **Preparación del gel:** Un volumen de agarosa (High Strength Ultrapure, BioRad) al 2 % en tampón TBE 1x, con bromuro de etidio (Sigma) al 0,005% (p/v), era depositado sobre la bandeja portageles (Maxicell CE 360 M, BioRad), colocada sobre una superficie nivelada, y antes de la gelificación se insertaba el peine para formar los correspondientes pocillos.
- **Preparación de las muestras:** Las muestras digeridas y los controles eran diluidos (10:1, v/v) con tampón de carga (azul de bromofenol - BioRad-, 0,5% p/v; cianolxileno -Sigma-, 0,5% p/v; EDTA -Sigma-, 1,86% p/v; glicerol -Merck-, 50% v/v; tampón TBE 5x, 50% v/v) y depositados en los pocillos del gel que estaba, sumergido en TBE, en el interior de la cubeta de electroforesis.
- **Separación electroforética y visualización:** Las muestras fueron sometidas a migración electroforética (EC 3000-90) con un voltaje constante de 65 V durante 3 horas, momento en el que el azul de bromofenol había alcanzado el extremo opuesto del gel. Tras lo cual, el gel era depositado sobre el transiluminador de luz ultravioleta, mencionado anteriormente, y la imagen era fotografiada mediante un sistema de captación de imágenes (P66E, Mitsubishi Electric CO, Tokyo Japan).

3.3.2.4. Análisis e interpretación

El tamaño relativo de los fragmentos fue calculado mediante el programa informático 1D Manager versión 2.0 (TDI, Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A., Alcobendas), que mediante comparación con los marcadores convierte las distancias de migración en tamaños relativos (Grimont, 1996).

La similitud entre los aislados se calculó según el coeficiente de Dice, ($SD = 2a / 2a + b + c$; dónde “a” es el número de fragmentos apareados, y “b” y “c” son el número de fragmentos no apareados de las cepas comparadas) según Struelens *et al.* (1996), mediante el programa Lane Manager versión 2.0 (TDI), que además permite la agrupación de los aislados en función del nivel de similitud mediante la comparación de los tamaños moleculares (UPGMA, “*unweighted pair group mathematical average*”) y la obtención de un dendograma de homología.

Los datos se analizaron paralelamente con el paquete estadístico SPSS 10.0 para Windows, aplicando igualmente el coeficiente de Dice, y obteniendo matrices y dendogramas de homología.

El criterio seguido para establecer diferencias entre los patrones de RFLP obtenidos con cada uno de los enzimas de restricción, fue considerar que eran aislados iguales los que tenían el mismo número y tamaño de fragmentos, y distintos aquellos cuyos perfiles diferían en uno o en más fragmentos.

Los ribodemas se definieron tras el análisis conjunto de los patrones de restricción y la aplicación de los criterios de Tenover *et al.* (1995). De modo que los aislados que presentaban un coeficiente de similitud entre el 70% (cepas estrechamente relacionadas) y el 100% (cepas idénticas) eran incluidos en el mismo ribodema. Si la homología entre los ribodemas oscilaba entre el 50% y el 70% eran considerados como posiblemente relacionados, y como no relacionados, si su similitud era inferior al 50%.

Se valoró también la existencia de relación estadísticamente significativa entre la pertenencia a un ribodema y los diagnósticos diarrea aguda o crónica, mediante el programa EpiInfo 2000, versión 1.1.2a, que permite el cálculo de la prueba Chi-cuadrado con el factor de corrección de continuidad de Yates, el riesgo relativo y el coeficiente de correlación de Pearson.

3.3.3. Protocolo de Böhm (1997)

En este caso la amplificación se realizó con los iniciadores F_I y R_I, que fueron construidos a partir de la secuencia del ARNr-16S de *B. hominis* publicada por Johnson *et al.* (1989). La secuencia de estos cebadores es:

F _I	5'- GGAGGTAGTGACAATAAATC- 3'
R _I	5'- CGTTCATGATGAACAATTAC- 3'

3.3.3.1. Amplificación

El ADN extraído según el protocolo de Clark (1997) fue amplificado en el termociclador, citado anteriormente, programado con: i) un ciclo de desnaturalización a 94°C, de 4 minutos de duración; ii) 35 ciclos incluyendo la desnaturalización a 94°C, durante 30 segundos, el acoplamiento a 54°C, durante 30 segundos y la extensión a 72°C, durante otros 30 segundos; iii) un ciclo adicional de 5 minutos a 72°C que favorecía la elongación de la cadena.

La reacción de amplificación se realizaba en tubos eppendorf estériles que contenían: 5 µl de ADN (100 ng); 1 µl de F_I 50pmol/µl, (Tib Molbiol); 1 µl de R_I 50pmol/µl, (Tib Molbiol); 0,5 µl de Taq 1U/µl (Boehringer Mannheim,); 0,4 µl de dNTP 0,2mM (Boehringer Mannheim); 5 µl de tampón de amplificación 10x (Boehringer Mannheim); H₂O destilada c.s.p. 50 µl.

Los productos resultantes de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en tampón TBE 1x, pH8 .

3.3.3.2. Restricción enzimática del fragmento amplificado

Se utilizaron las mismas endonucleasas que en el ensayo anterior, es decir Alu I, Hinf I y Rsa I, cuyos puntos de corte y protocolo de digestión están recogidos en el apartado 3. 3. 2. 2.

3.3.3.3. Separación electroforética de los productos de restricción

El procedimiento utilizado fue el mismo al descrito en el apartado 3. 3. 2. 3. La única diferencia consistió en el porcentaje y en el tipo de agarosa. En este caso, se utilizaron geles de agarosa (Amplisize, BioRad) al 1.5% (p/v) que permiten una mejor resolución de los fragmentos pequeños.

3.3.3.4. Análisis e interpretación

Los cálculos encaminados a conocer el tamaño relativo de los fragmentos de restricción, el grado de similitud entre los aislados, la definición de patrones y ribodemas, y la existencia de asociación estadística entre ribodema-diagnóstico, se realizaron de acuerdo con los criterios establecidos en el apartado 3. 3. 2. 4.

3.4. Detección de variación intraespecífica en aislados de *B. hominis* mediante PCR, con una única pareja de iniciadores

Continuando con el objetivo de constatar la existencia de variaciones genéticas entre aislados de *B. hominis*, se procedió al análisis de las mismas mediante la realización de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con una sola pareja de iniciadores (TR₇ y TR₈), de acuerdo con lo publicado por Init *et al.* (1999). Estos cebadores fueron diseñados para el diagnóstico de *Trichomonas vaginalis* mediante PCR, por Riley *et al.* (1991), y utilizados por Init *et al.* (1999) en el estudio de la diversidad genética de *B. hominis*. La secuencia de los cebadores es de 20 pares de bases:

TR ₇	5'- CTG TTG TCG ACG TTT ATC CA – 3'
TR ₈	5'- GAT CAC CAG TGG AGG GTG TC - 3'

3.4.1. Amplificación del ADN con los iniciadores TR₇ y TR₈

El ADN obtenido tras la extracción, según el protocolo de Clark (1997) (apartado 3. 3. 1), fue amplificado con los cebadores TR₇ y TR₈, que reconocen secuencias ubicuas, de longitud variable, a menudo multicopia y que permiten distinguir diferentes patrones, inter e intraespecíficos.

Los ciclos y las temperaturas para la amplificación se realizaron en el termociclador, citado anteriormente fueron: i) una primera fase a 94°C, durante 7 minutos; ii) 35 ciclos con variaciones secuenciales de 94°C, 50°C y 72°C, de un minuto cada una; iii) un ciclo de extensión a 72°C, durante 7 minutos. La reacción de amplificación se realizaba en tubos eppendorf estériles que contenían: 5 µl de ADN (100 ng); 1 µl de TR₇ 50pmol/µl, (Tib Molbiol); 1 µl de TR₈ 50pmol/µl, (Tib Molbiol); 0,5 µl de Taq 1U/µl (Boehringer Mannheim); 0,4 µl de dNTP 0,2mM (Boehringer Mannheim); 5 µl de tampón de amplificación 10x (Boehringer Mannheim); H₂O destilada c.s.p. 50 µl. Las muestras eran conservadas a 4°C, hasta su posterior análisis.

3.4.2. Separación electroforética de los productos de amplificación

Los productos de amplificación obtenidos fueron analizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (BioRad) al 1.5% en tampón TBE 1x, pH 8, con bromuro de etidio (0,005% p/v). Las muestras y los marcadores (nº VIII, Boehringer Mannheim) eran diluidos en tampón de carga (10:1, v/v), depositados en el gel y sometidos a migración electroforética (EC 3000-90) a un voltaje constante de 60 V, durante 2 horas. Tras lo cual, se procedía a su observación y fotografiado.

3.4.3. Análisis e interpretación

Los resultados se obtuvieron mediante la utilización del programa informático 1D Manager versión 2.0 (TDI). Según Init *et al.* (1999), el fragmento mayoritario, identificado como la banda de mayor intensidad obtenida para cada aislado, permite establecer diferencias intraespecíficas y

asignar la pertenencia a un patrón. Los cálculos encaminados a conocer la similitud entre los aislados y la existencia de asociación estadística entre patrón-diagnóstico, se realizaron de acuerdo con los criterios establecidos en el apartado 3. 3. 2. 4.

3.5. Análisis isoenzimático

El estudio de los enzimas multilocus mediante separación electroforética, sirvió durante años como marcador genético a la hora de responder a cuestiones relacionadas con la estructura y sistemática de las poblaciones naturales (Andrews *et al.*, 1999); utilizándose como método estándar hasta la introducción y el desarrollo de las técnicas de biología molecular. Para determinar la posible existencia de diferentes patrones isoenzimáticos entre los aislados de *B. hominis*, se procedió al estudio de ocho sistemas enzimáticos, previamente ensayados por otros autores (Mansour *et al.* 1995; Gericke *et al.* 1997; Carbajal, 1995) (tabla 3).

Tabla 3.- Sistemas enzimáticos estudiados

Enzima	C.I.	Sigla	Reacción
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	EC 1.1.1.49	G6PD	glucosa-6-P + NADP \Rightarrow 6-fosfogluconato +NADPH
Malato deshidrogenasa	EC 1.1.1.37	MDH	malato + NAD \Rightarrow oxalacetato + NADH
Enzima málico	EC 1.1.1.40	ME	malato + NADP \Rightarrow piruvato + CO ₂ + NADPH
Fosfoglucomutasa	EC 2.7.5.1	PGM	glucosa-1- fosfato \Rightarrow glucosa – 6 – fosfato
Glucosa fosfato isomerasa	EC 5.3.1.8	GPI	fructosa-6- fosfato \Rightarrow glucosa – 6 – fosfato
Glutámico-oxalacético transaminasa	EC 2.6.1.1	GOT	aspartato + α -cetoglutarato \Rightarrow glutamato + oxalacetato
6-Fosfogluconato deshidrogenasa	EC 1.1.1.44	6PGD	6-fosfogluconato + NADP \Rightarrow ribulosa-5-fosfato + NADPH
Hexoquinasa	EC 2.7.1.1	HEX	glucosa + ATP \Rightarrow glucosa–6–fosfato + ADP

(tomado de: Harris y Hopkinson, 1976)

Este análisis se llevó a cabo mediante la separación electroforética en geles de poliacrilamida, en condiciones no reductoras, de los extractos proteicos obtenidos de cultivos axénicos de *B. hominis*, según los procedimientos descritos por Harris y Hopkinson (1976) y Carbajal (1995).

3.5.1. Preparación de geles de poliacrilamida

A partir de una solución base de poliacrilamida al 30% (acrilamida -Sigma-, 29,2 g; bisacrilamida -Sigma-, 0,8 g; agua bidestilada, c. s. p. 100 ml), mediante disolución en tampón Tris-HCl 1,5M pH 8,8 (tris base -Merck-, 18,15 g; agua bidestilada, 50 ml; ácido clorhídrico 1N, c. s. p. pH 8,8; agua bidestilada, c. s. p. 100 ml) y agua bidestilada, se prepararon los geles de separación y de depósito.

3.5.1.1. Gel de separación

Los geles de poliacrilamida al 8% (p/v) eran preparados sobre un sistema nivelador y sustentador, compuesto por dos placas de vidrio con separadores de 1 mm de espesor.

Para la obtención de poliacrilamida al 8%, la solución de poliacrilamida al 30% era disuelta en tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8.8, y agua bidestilada (1:1:1,82, v/v), y la polimerización se obtenía tras la adición de metilenediamina (TEMED, BioRad) y persulfato amónico al 10% (BioRad) (0,0015:0,006 v/v). La poliacrilamida era cuidadosamente distribuida entre las placas de vidrio, evitando la formación de burbujas, y era recubierta con una capa de agua destilada, para facilitar la nivelación y la polimerización del gel.

3.5.1.2. Gel de depósito

Una vez polimerizado el gel de separación, era retirada el agua bidestilada y se añadía el gel de depósito o de concentración, constituido por

poliacrilamida al 5% (poliacrilamida al 30%, tampón Tris-HCL 1,5M pH 8,8, agua bidestilada, TEMED, persulfato amónico al 10% -1:1,5:5,52:0,0015:0,006 v/v-). Una vez distribuido era colocado un peine de 1 mm de espesor para la formación de los pocillos, el cual se retiraba una vez concluida la polimerización.

3.5.2. Preparación de las muestras

Con el objeto de eliminar las posibles interferencias debidas a las proteínas séricas de la solución de Locke, la fase líquida de los cultivos axénicos, en fase logarítmica (Lanuza *et al.*, 1997), era centrifugada a 500g, durante 5 minutos, y lavada dos veces (500g, 5 minutos) con tampón PBS (Oxoid). La biomasa obtenida era ajustada, utilizando el hemocitómetro de Neubauer (Tiefe, 0.100 mm), a una concentración de 2×10^7 células / ml.

El sedimento obtenido tras la centrifugación (500g, 10 minutos) de un volumen de la suspensión 2×10^7 células / ml, era tratado (1: 0,05 : 0,05 v/v) con Triton 100x (Merck) al 1% (v/v) y tampón de muestra preparado extemporáneamente [glicerol -Merck-, 1ml; agua bidestilada, 7,75 ml; tampón Tris-HCl 0.5M pH 6.8, 1.25 ml (tris base -Merck-, 6 g; agua bidestilada, 60 ml; ácido clorhídrico 1N, c. s. p. pH 6,8; agua bidestilada c. s. p. 100 ml)].

La suspensión obtenida era agitada vigorosamente con varillas de vidrio, y centrifugada a 500g, durante 10 minutos. El sobrenadante, que contenía las proteínas solubles, era recogido para realizar la electroforesis.

3.5.3. Separación electroforética

El sistema sustentador conteniendo el gel era introducido en la cubeta de electroforesis vertical (EC Apparatus Corporation EC 120, Minivertical Gel System, BioRad). En los pocillos eran depositados 30 μ l de los extractos proteicos, y en uno de ellos, además, se añadían 5 μ l de azul

de bromofenol (BioRad) al 0.1% (p/v) en agua bidestilada, para controlar el avance de la migración.

Tras lo cual, la cubeta era rellena con tampón de electroforesis (agua bidestilada, 2,5 L; tris base -Merck-, 7,5 g; glicina -Merck-, 36 g; ácido clorhídrico, c. s. p. pH 8,3). La migración electroforética se realizó a voltaje constante de 80V (BioRad Power/Pac 300), durante dos horas, excepto para el enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que se efectuaba a un voltaje constante de 90 V.

3.5.4. Detección de la actividad enzimática

Finalizado el proceso de electroforesis se procedió al revelado, según los protocolos de Selander *et al.* (1986) y Carbajal (1995). El revelador es una disolución tamponada que contiene el sustrato y el coenzima requeridos, para la detección de una determinada actividad enzimática. La composición de los tampones y de los reactivos comunes en la mayoría de las soluciones reveladoras, está recogida en la tabla 4.

Tabla 4.- Tampones y reactivos comunes utilizados en el revelado

Reactivo	Composición	Conservación
Tampón Tris-HCl 0,2 M pH 8	Agua bidestilada, 500 ml; tris base ^a , 12,1 g; HCl ^b c. s. p. PH 8	4°C
Tampón glicil-glicina 0,1 M pH 7,5	Agua bidestilada 1.000 ml; glicil-glicina ^c , 11,3 g; KOH ^a 1M, c. s. p. PH 7,5	4°C
Dimetiltiazoltetrazolio 1,25% (MTT)	agua bidestilada, 100 ml; MTT ^c , 1,25 g	4°C, oscuridad
Fenazina metosulfato 1% (PMS)	Agua bidestilada, 100 ml; PMS ^c , 1 g	4°C, oscuridad
Cloruro magnésico 0.1 M	agua bidestilada, 100 ml; MgCl ₂ .6H ₂ O ^a , 2,03 g	4°C
Ácido málico 2M ¹	agua bidestilada, 25 ml; NaOH ^a , 4g; ácido DL-málico ^c , 6,7 g	4°C, oscuridad

¹: Reacción exotérmica; ^a: Merck; ^b: Panreac; ^c: Sigma.

3.5.4.1. Revelado

Concluida la electroforesis, los geles eran sumergidos en la solución reveladora correspondiente; excepto en el caso de la actividad GPI en la que los geles eran recubiertos con el revelador gelificado con agarosa al 2% (p/v). Los geles y los reveladores eran incubados a 37°C, en cámara oscura, hasta la aparición de las bandas.

Las soluciones y los tiempos de revelado para cada enzima, están recogidos en la tabla 5.

Tabla 5.- Soluciones reveladoras y tiempos utilizados para la detección de las actividades enzimáticas estudiadas.

Actividad	Revelador	Tiempo
G6PD	Glucosa-6-fosfato ^a , 100 mg; Tris-HCl 0.2 M pH8, 50 ml; MgCl ₂ 0.1 M, 1 ml; NADP ^a 1% (p/v), 1 ml; MTT, 1 ml; PMS, 1 ml	30 minutos
MDH	Ácido málico ^a 2M, 6 ml; Tris-HCl 0.2 M pH8, 40 ml; NAD ^a 1% (p/v), 2 ml; MTT, 1 ml; PMS, 0,5 ml	15 minutos
ME	Ácido málico 2M, 6 ml; Tris-HCl 0.2 M pH8, 40 ml; MgCl ₂ 0.1 M, 2 ml; NADP 1% (p/v), 1 ml; MTT, 1 ml; PMS, 0,5 ml	2 horas
PGM	Glucosa -1-fosfato, 5 mg; Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ^a , 160 µl; NADP, 0,5 mg; Tris-HCl 0.2M pH8, 5 ml; MgCl ₂ 0.1 M, 5 ml; MTT, 1 ml; PMS, 0,5 ml; agua bidestilada, 25 ml	1 hora
GPI ¹	Fructosa-6-fosfato ^a , 10 mg; Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 10 µl; NADP, 6 mg; Tris-HCl 0.2 M pH8, 25 ml; MgCl ₂ 0.1 M, 0,3 ml; MTT, 1 ml; PMS, 0,5 ml	15 minutos
GOT	Ácido-L-aspártico ^a , 50 mg; Piridoxal 5'-fosfato ^a , 1 mg; Ácido α-cetoglutarato ^a , 100 mg; Tris-HCl 0.2M pH8, 50 ml; Fast Blue BB Salt ^a , 100 mg	30 minutos
6PGD	Ácido 6-fosfogluconico ^a , 10 mg; Tris-HCl 0.2 M pH8; 20 ml; MgCl ₂ 0.1 M, 10 ml; NADP 1%, 1 ml; MTT, 1 ml; PMS, 0,5 ml	30 minutos
HE	D-Glucosa ^b , 200 mg; ATP ^a , 50 mg; NADP 1%, 1 ml; Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 40 µl; MgCl ₂ 0.1 M, 2 ml; Glicil-glicina 0.1 M pH7.5, 50 ml ;MTT, 1 ml; PMS, 0,5 ml	30 minutos

¹: el gel debe ser recubierto con el revelador gelificado con agarosa al 2% (p/v); ^a: Sigma; ^b: Difco.

3.5.5. Análisis

Finalizado el proceso de revelado, las imágenes obtenidas eran captadas mediante un scanner (Snap Scan 600, Afga), para ser posteriormente analizadas, y los geles eran conservados en bolsas de plástico selladas que contenían ácido acético al 7%.

En el análisis se comparó la movilidad relativa de las proteínas con actividad enzimática de los diferentes aislados, con los resultados obtenidos en la cepa patrón (BH91-01), en la que a la banda de mayor movilidad se le asignaba el valor 100.

Se definió como isoenzima a cada perfil de bandas obtenido para una misma actividad enzimática. La combinación de los isoenzimas permitió incluir a los aislados en zimodemas diferentes.

La similitud entre los aislados y la existencia de asociación estadística entre zimodema y diagnóstico, se calculó de acuerdo con los criterios establecidos en el apartado 3. 3. 2. 4.

4. Resultados

4.1. Resultados del estudio microbiológico

El análisis de los exámenes microscópicos directos y de los concentrados fecales, permitió constatar que en la población estudiada la prevalencia de la parasitación por *B. hominis* era del 21,5% (56 / 260) (figura 4A y 4B, tablas 6a y 6b).

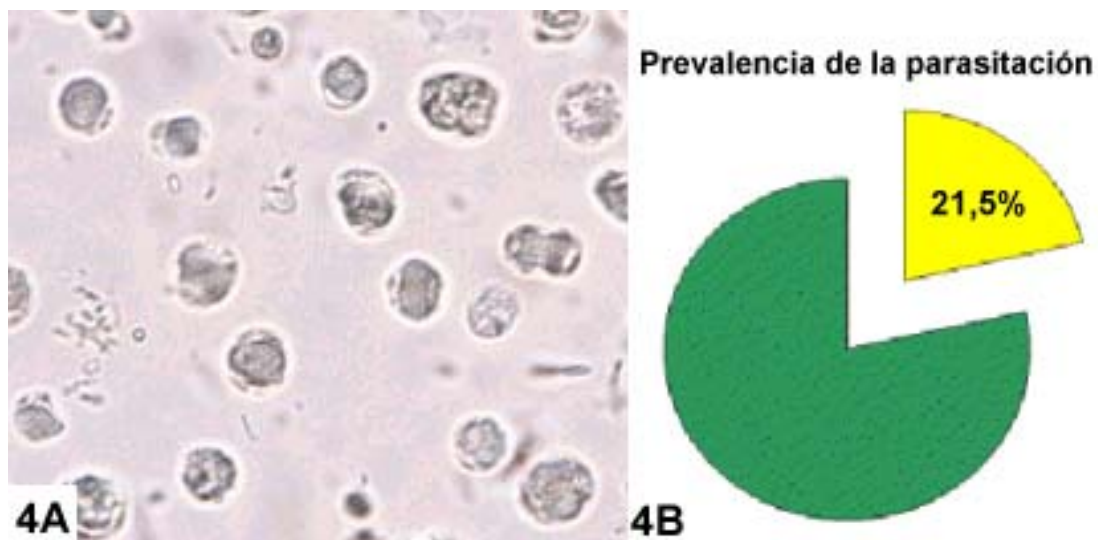


Figura 4. Parasitación por *B. hominis*. A: Observación microscópica de *B. hominis* (40x). B: prevalencia en la población estudiada.

Los pacientes fueron identificados mediante códigos alfanuméricos compuestos por las siglas del organismo (BH), el año en curso (98 o 99), y un número de orden (01, 02,...), separado de la secuencia anterior por un guión (vgr. BH98-01) (tablas 6a, 6b y 6c).

Tabla 6a. Aspectos clínico-demográficos básicos de los pacientes en los que se observó *B. hominis*.

Caso	Sexo	Edad	Inmunosupresión	Síntomas	Microorganismos enteropatógenos
BH98-01	H	9	N	Diarrea aguda	<i>Shigella sonnei</i>
BH98-02	H	45	S	Diarrea aguda	
BH98-03	H	40	S	Diarrea crónica	
BH98-04	H	55	S	Diarrea aguda	
BH98-05	M	7	N	Diarrea aguda	
BH98-06	H	60	N	Diarrea aguda	

H: hombre; M: mujer; N: no; S: sí

Tabla 6b. Aspectos clínico-demográficos básicos de los pacientes en los que se observó *B. hominis*.

Caso	Sexo	Edad	Inmunosupresión	Síntomas	Microorganismos enteropatógenos
BH98-07	H	28	N	Asintomático	
BH98-08	M	8	N	Diarrea aguda	
BH98-09	H	55	S	Diarrea aguda	
BH98-10	H	57	N	Diarrea aguda	
BH98-11	H	33	N	Asintomático	
BH98-12	H	68	N	Diarrea aguda	
BH98-13	H	33	N	Diarrea crónica	
BH98-14	H	47	N	Diarrea aguda	
BH98-15	H	37	N	Diarrea aguda	
BH98-16	H	20	N	Asintomático	
BH98-17	H	68	N	Diarrea aguda	
BH98-18	H	73	N	Diarrea aguda	
BH98-19	H	8	N	Diarrea aguda	<i>Campylobacter jejuni</i>
BH98-20	H	42	N	Diarrea aguda	
BH98-21	H	35	S	Diarrea aguda	
BH98-22	H	32	N	Diarrea aguda	
BH98-23	H	79	S	Diarrea aguda	<i>Campylobacter jejuni</i>
BH98-24	H	70	N	Diarrea aguda	
BH98-25	M	35	N	Diarrea aguda	
BH98-26	M	64	N	Diarrea aguda	
BH98-27	M	51	S	Diarrea aguda	
BH98-28	M	2	N	Diarrea aguda	
BH98-29	H	29	N	Diarrea aguda	
BH98-30	H	21	N	Diarrea aguda	
BH98-31	M	40	N	Diarrea aguda	
BH98-32	H	28	N	Diarrea aguda	
BH98-33	M	30	N	Diarrea aguda	
BH98-34	H	25	N	Diarrea aguda	
BH98-35	M	27	N	Diarrea crónica	
BH98-36	H	22	S	Diarrea aguda	
BH98-37	M	24	N	Diarrea aguda	<i>Giardia lamblia</i>
BH98-38	M	11	N	Diarrea aguda	
BH98-39	M	43	N	Diarrea aguda	
BH98-40	H	29	N	Diarrea aguda	
BH98-41	H	73	N	Diarrea aguda	
BH99-01	H	50	N	Diarrea aguda	
BH99-02	H	63	N	Diarrea aguda	
BH99-03	H	42	N	Diarrea aguda	

H: hombre; M: mujer; N: no; S: sí

Tabla 6c. Aspectos clínico-demográficos básicos de los pacientes en los que se observó *B. hominis*.

Caso	Sexo	Edad	Inmunosupresión	Síntomas	Microorganismos enteropatógenos
BH99-04	M	6	N	Diarrea aguda	
BH99-05	M	28	N	Diarrea aguda	
BH99-06	H	77	N	Asintomática	
BH99-07	M	24	S	Diarrea aguda	
BH99-08	H	2	N	Diarrea aguda	<i>Campylobacter jejuni</i>
BH99-09	H	3	N	Diarrea aguda	
BH99-10	H	40	S	Diarrea aguda	
BH99-11	H	48	N	Diarrea crónica	
BH99-12	M	60	N	Diarrea crónica	
BH99-14	M	60	N	Diarrea crónica	
BH99-15	M	27	N	Asintomática	
BH99-16	M	48	N	Asintomática	

H: hombre; M: mujer; N: no; S: sí

El 78,6% de los pacientes (44/56) estaban diagnosticados de diarrea aguda; el 10,7% (6/56) de diarrea crónica y los otros seis eran portadores. Además, en cinco de ellos se aislaron enteropatógenos (tablas 6a, 6b, 6c). La edad de los pacientes oscilaba entre los 2 y los 79 años, con una media de 38,2 +/- 21 años (figura 5).

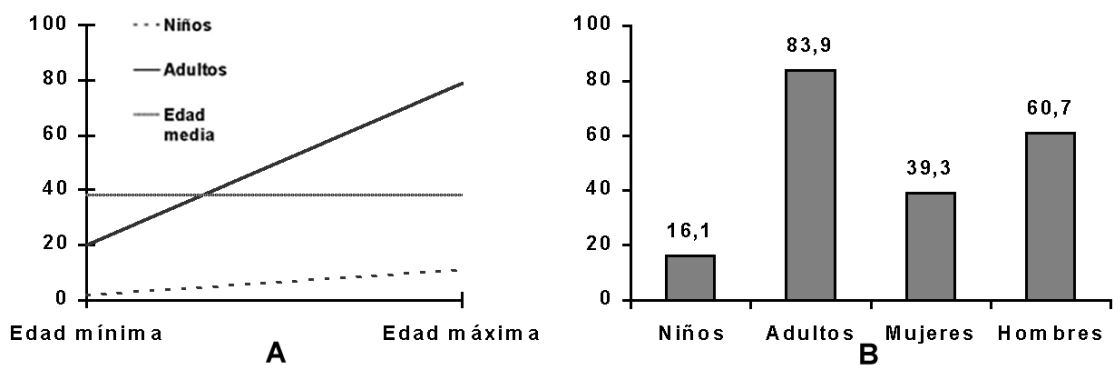


Figura 5. A: Rango y edad media de la población en la que se observó *B. hominis*; B: Proporción de pacientes parasitados en relación con la edad y el sexo.

La parasitación era más común en los adultos de sexo masculino, que en los niños (47/9) y que en las mujeres (34/22), aunque las diferencias no eran significativas (figura 5, tabla 7).

Tabla 7. Resultados del análisis estadístico descriptivo de la población.

Parámetro	Resultado	Significación (p)
Ratio entre adultos y niños	1 : 0,16	0,656
Ratio entre hombres y mujeres	1 : 0,65	0,196
Ratio entre individuos sintomáticos y portadores	1 : 0,12	0,413
Ratio entre pacientes con diarrea aguda y crónica	1 : 0,13	0,060

4.1.1. Resultados de los cultivos y de la axenización de *B. hominis*

El 67,9% (38/56) de los cultivos se adaptaron a las condiciones *in vitro*. La axenización se consiguió en 21 aislados, pero únicamente 18 lograron mantenerse viables *in vitro*, en ausencia de bacterias, lo que supone un éxito en la axenización del 47,4% (18/38) (figura 6).

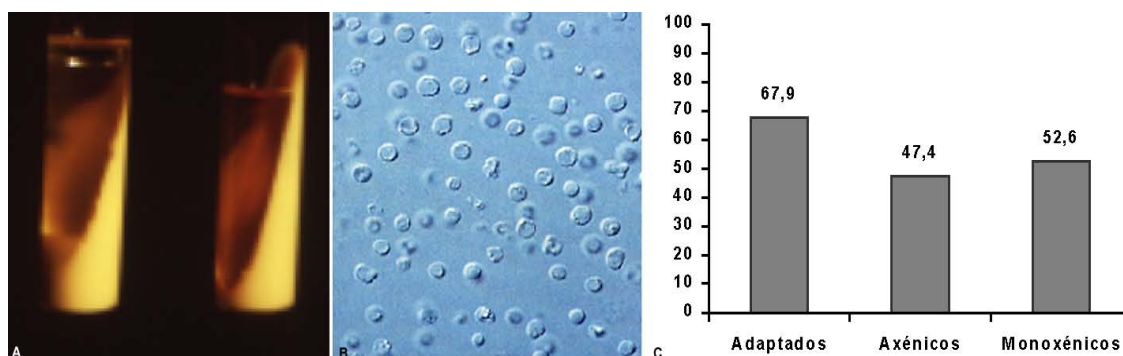


Figura 6. Resultado de los cultivos de *B. hominis*. A: cultivo axénico en medio MBDM en el que puede observarse la transparencia de la fase líquida y el característico sedimento; B: microfotografía (100x) de un cultivo axénico; C: gráfico representativo de los resultados de la adaptación y de la axenización de los cultivos.

Los aislados fueron identificados con el mismo código que había sido asignado a los pacientes, seguido en el caso de los aislados monoxénicos, de la letra "w" (vgr. BH98-03, aislado axénico obtenido del paciente BH98-03; BH98-01w, aislado no axénico del paciente BH98-01) (tabla 8).

Tabla 8. Características semiológicas de las heces a partir de las cuales se consiguió la adaptación *in vitro* y recuento de *B. hominis*.

Aislado	Diarrea	Características semiológicas de las heces			Recuento de <i>B. hominis</i> 40x
		Consistencia	Células inflamatorias	Cristales de Charcot-Leyden	
BH98-01w	Aguda ¹	Líquidas	S	N	>5
BH98-03	Crónica	Formes	N	N	>5
BH98-04	Aguda	Blandas	N	N	>5
BH98-05w	Aguda	Blandas	N	N	<5
BH98-06w	Aguda	Blandas	N	N	<5
BH98-08	Aguda	Blandas	N	N	<5
BH98-09	Aguda	Líquidas	N	N	<5
BH98-12	Aguda	Blandas	N	N	<5
BH98-13	Crónica	Sueltas	N	N	<5
BH98-14	Aguda	Blandas	N	N	<5
BH98-15	Aguda	Blandas	N	N	<5
BH98-16w	No	Formes	N	N	>5
BH98-18	Aguda	Líquidas	N	N	<5
BH98-19	Aguda ²	Blandas	S	S	<5
BH98-20w	Aguda	Blandas	N	N	>5
BH98-21w	Aguda	Blandas	N	N	>5
BH98-23	Aguda ²	Sueltas	S	N	<5
BH98-24	Aguda	Blandas	N	N	<5
BH98-25	Aguda	Blandas	N	N	<5
BH98-26w	Aguda	Blandas	N	N	>5
BH98-27	Aguda	Blandas	N	N	<5
BH98-28w	Aguda	Líquidas	S	N	<5
BH98-29w	Aguda	Blandas	N	N	<5
BH98-30w	Aguda	Sueltas	N	N	>5
BH98-31w	Aguda	Blandas	N	N	>5
BH98-32w	Aguda	Líquidas	S	N	>5
BH98-33	Aguda	Líquidas	S	N	>5
BH98-34w	Aguda	Líquidas	N	N	<5
BH98-36w	Aguda	Líquidas	N	N	>5
BH98-37w	Aguda ³	Blandas	N	N	>5
BH98-39	Aguda	Blandas	N	N	<5
BH98-40	Aguda	Líquidas	N	N	>5
BH98-41w	Aguda	Blandas	N	N	<5
BH99-05w	Aguda	Formes	N	N	<5
BH99-08	Aguda ²	Líquidas	S	N	>5
BH99-11w	Crónica	Formes	N	N	>5
BH99-12w	Crónica	Blandas	N	N	>5
BH99-14w	Crónica	Blandas	N	N	>5

¹: *S. sonnei*; ²: *C. jejuni*; ³: *G. lamblia*; N: ausencia; S: presencia.

El 98,5% (34/38) de los aislados fueron obtenidos a partir de pacientes con heces líquidas o blandas, y diagnóstico de diarrea aguda o crónica. Los restantes lo fueron a partir de heces formes de pacientes

asintomáticos (BH98-16w), y con diarrea aguda (BH99-05w) o crónica (BH98-03 y BH99-11w).

Se detectaron células inflamatorias en el 20,6% (7/34) de los casos, y en cuatro de ellos su presencia estuvo asociada a organismos enteropatógenos. El 52,6% de los aislados se obtuvieron de muestras con recuentos de >5 células de *B. hominis* por campo 40x (tabla 8, figura 7)

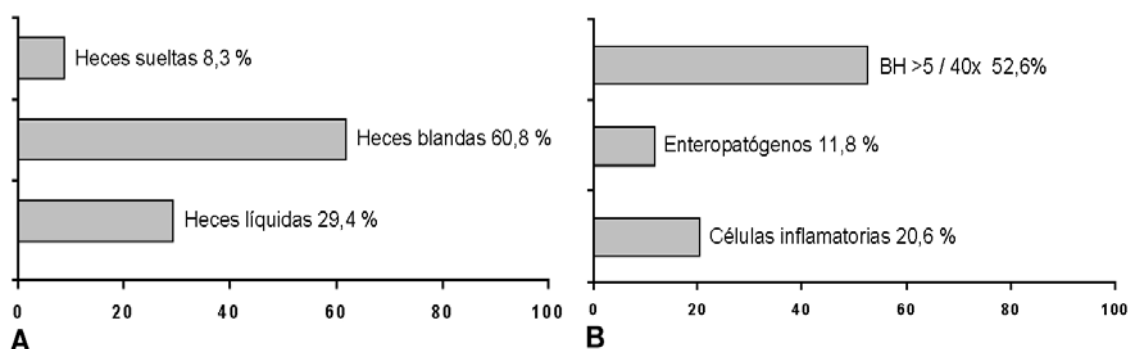


Figura 7. Características semiológicas de las heces a partir de las cuales se logró la adaptación *in vitro* de *B. hominis*. A: consistencia fecal; B: presencia de células inflamatorias, enteropatógenos y recuento de *B. hominis*.

4.2. Patrones RFLP y ribodemas obtenidos según el protocolo de Clark

La amplificación de la región de ADN ribosomal comprendida entre los cebadores RD₃ y RD₅ permitió la detección, tanto en los aislados axénicos como en los monoxénicos, de un único fragmento con un tamaño aproximado de 2.540 pb (fig. 8).

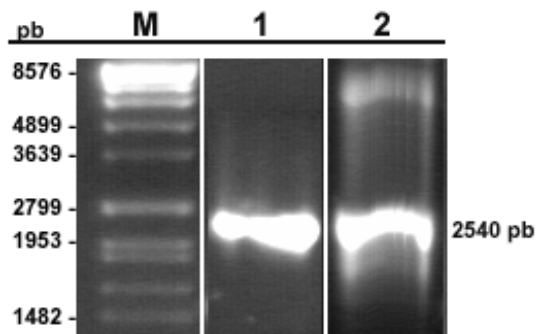


Figura 8. Resultados de la amplificación con RD₃ y RD₅. Carrera M: marcador VII, a su izquierda el tamaño de los fragmentos en pares de bases. Carrera 1: Amplicón del aislado BH91-01. Carrera 2: Amplicón del aislado BH98-31w

4.2.1. Patrones de RFLP obtenidos tras restricción con Alu I

El tratamiento de los amplicones con el enzima Alu I reveló la existencia de diferencias en el número de fragmentos obtenidos, que osciló entre dos y cinco; así como en el tamaño de los mismos, que quedaba comprendido entre 160 y 675 pb (figura 9).

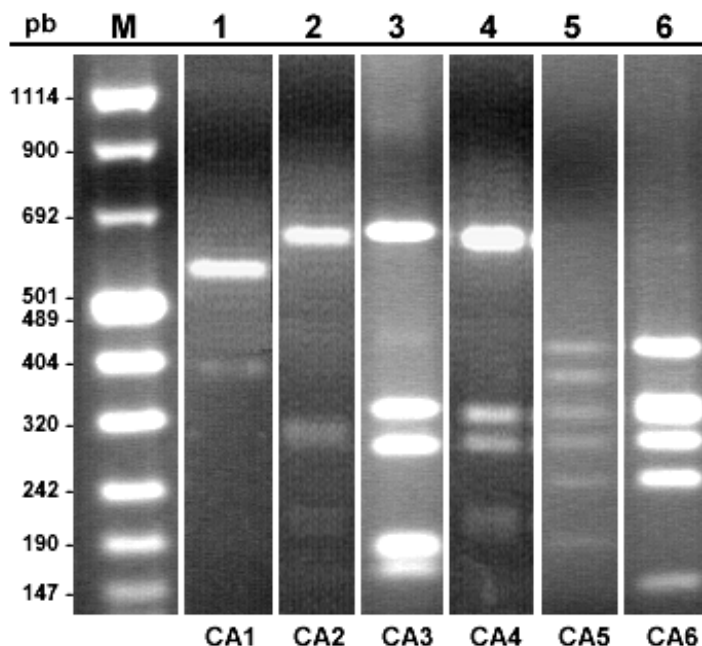


Figura 9. Resultados de la restricción con Alu I. Carrera M: marcador VIII, a su izquierda el tamaño de los fragmentos en pares de bases. Carreras 1 a 6: ejemplo de los patrones de restricción obtenidos con los diferentes aislados; 1: CA1; 2: CA2; 3: CA3; 4: CA4; 5: CA5 y 6: CA6.

El análisis de estos resultados permitió constatar la existencia de seis patrones (figura 9), denominados CA1 a CA6, cuyas características diferenciales están recogidas en la tabla 9.

Los perfiles más frecuentes fueron CA3 y CA4, con 27 y 19 aislados respectivamente; ambos con cuatro bandas, dos de ellas de idéntico tamaño (290 y 330 pb). Tres de los patrones incluían a un único aislado (CA1, CA2 y CA5), y no se observaron patrones mixtos, es decir, compuestos por bandas que pudieran asignarse al sumatorio de dos o más patrones.

Tabla 9. Características de los patrones RFLP obtenidos con Alu I y distribución de los aislados

Patrón RFLP	Características		Aislados
	Nº de bandas	Tamaño relativo (pb)	
CA1	2	400, 550	BH98-31w
CA2	3	210, 290, 650	BH98-36w
CA3	4	190, 290, 330, 675	BH91-01, 02 BH92-07, 09 BH93-19 BH98-01w, 04, 06w, 13, 16w, 18, 19, 20w, 21w, 23, 25, 26w, 28w, 29w, 30w, 32w, 33, 34w, 39, 40, 41w BH99-08w
CA4	4	210, 290, 330, 650	BH92-05, 10, 12, 16, 17 BH93-18, 20 BH98-03, 05w, 08, 09, 12, 14, 15, 24, 27, 37w BH99-05w, 11w
CA5	5	250, 290, 330, 400, 450	BH99-14w
CA6	5	160, 250, 290, 330, 450	BH92-08 BH99-12w

La similitud entre los aislados incluidos en el mismo patrón fue del 100%; mientras que la homología entre los patrones osciló entre el 0% (CA1 frente CA2, CA3 y CA4) y el 85,7% (CA2 frente CA4) (tabla 10, figura 10).

Tabla 10. Grado de similitud entre los patrones RFLP obtenidos tras la restricción con Alu I.

CA1	1.000					
CA2	0.000	1.000				
CA3	0.000	0.286	1.000			
CA4	0.000	0.857	0.500	1.000		
CA5	0.286	0.250	0.444	0.444	1.000	
CA6	0.000	0.250	0.444	0.444	0.800	1.000
	CA1	CA2	CA3	CA4	CA5	CA6

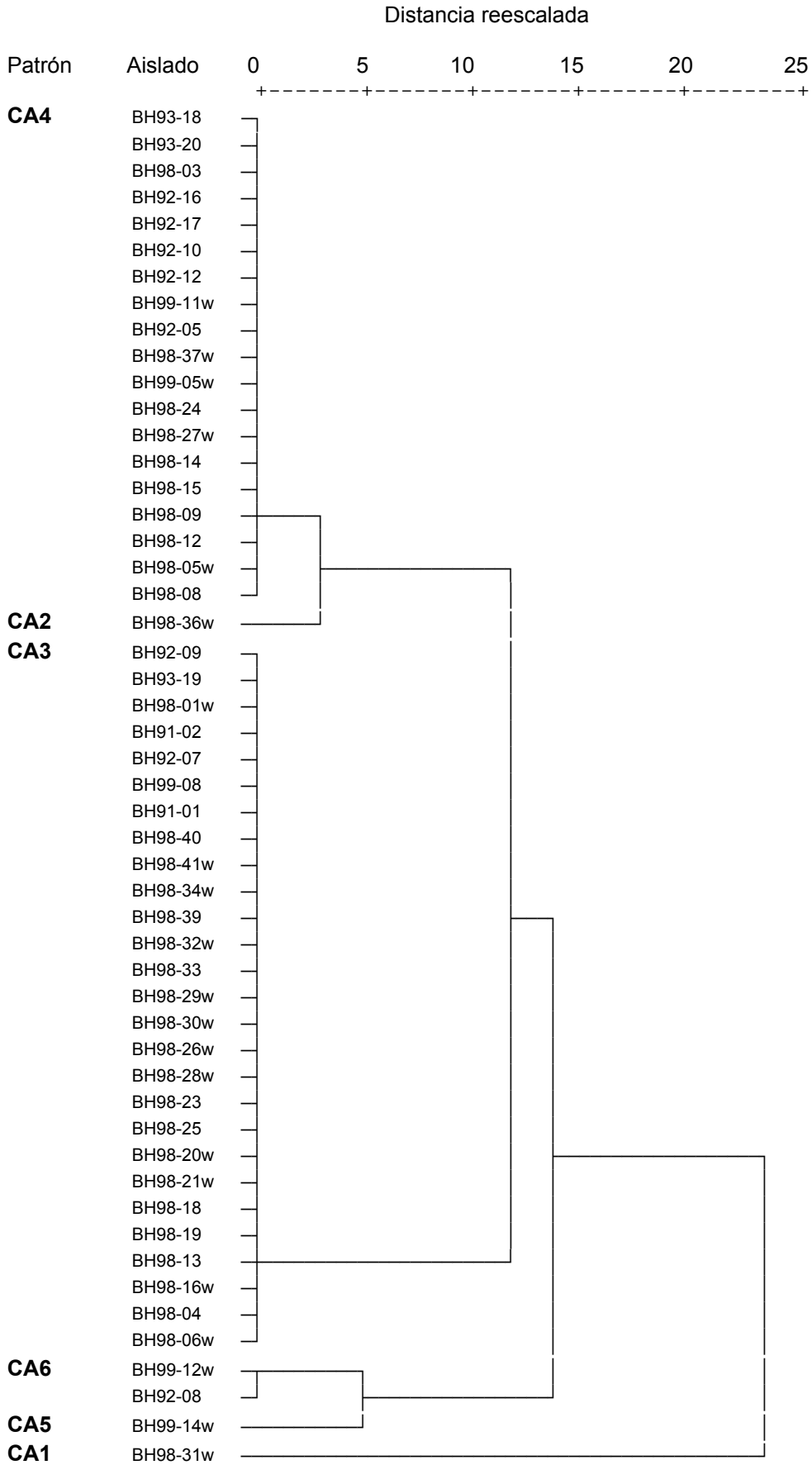


Figura 10. Dendrograma de homología obtenido con la restrictasa Alu I

4.2.2. Patrones de RFLP obtenidos tras restricción con Hinf I

La digestión con el enzima Hinf I permitió constatar la existencia de tres a siete fragmentos con tamaños relativos comprendidos entre 340 y 1.200 pb (figura 11).

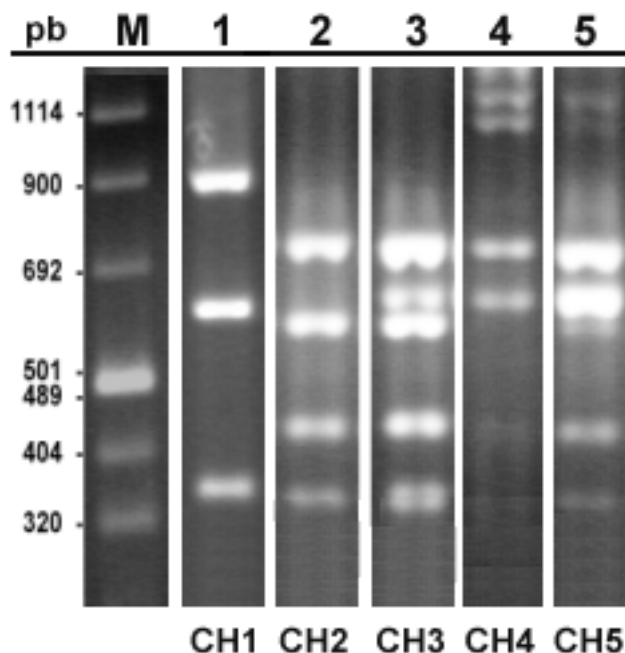


Figura 11. Resultados de la restricción con Hinf I. Carrera M: marcador VIII, a su izquierda el tamaño de los fragmentos en pares de bases. Carreras 1 a 5: ejemplo de los patrones de restricción obtenidos con los diferentes aislados; 1: CH1; 2 : CH2; 3: CH3; 4: CH4 y 5: CH5.

El análisis de estos resultados demostró la existencia de cinco patrones (figura 11), denominados CH1 a CH5, cuyas características diferenciales están recogidas en la tabla 3. Las bandas más frecuentes fueron las de 430 y 625 pb al aparecer en cuatro de los cinco perfiles.

Los patrones más frecuentes fueron CH2 y el CH3 con 30 (58,8%) y 12 (23,5%) aislados, respectivamente. Ambos patrones mostraban un perfil similar con cuatro bandas comunes (340, 430, 550 y 720 pb) y en el caso de CH3 presentaba una banda adicional de 625 pb. No se encontraron patrones únicos, ni tampoco mixtos.

Tabla 11. Características de los patrones RFLP obtenidos con Hinf I y distribución de los aislados

Patrón RFLP	Características		Aislados
	Nº de bandas	Tamaño relativo (pb)	
CH1	3	350, 625, 890	BH92-08 BH99-11w, 12w, 14w
CH2	4	340, 430, 550, 720	BH91-01 BH92-05, 10, 12 BH93-18, 19 BH98-01w, 03, 05w, 06w, 08, 12, 14, 15, 18, 20w, 24, 26w, 28w, 29w, 30w, 31w, 32w, 34w, 36w, 37w, 39, 40, 41w BH99-05w
CH3	5	340, 430, 550, 625, 720	BH91-02 BH92-07, 09, 16, 17 BH93-20 BH98-04, 16w, 23, 25, 27, 33
CH4	5	430, 625, 720, 1.100, 1.200	BH98-13, 19 BH99-08
CH5	7	340, 430, 550, 625, 720, 1.100, 1.200	BH98-09, 21w

El grado de similitud entre los aislados incluidos en un mismo patrón fue del 100%. La homología entre los patrones fue superior a la observada con el enzima Alu I, y fluctuó entre el 0% (CH1 frente a CH2) y el 88,9% (CH2 frente a CH3) (tabla 12, figura 12).

Tabla 12. Grado de similitud entre los patrones RFLP obtenidos tras la restricción con Hinf I

CH1	1.000				
CH2	0.000	1.000			
CH3	0.250	0.889	1.000		
CH4	0.250	0.444	0.600	1.000	
CH5	0.200	0.727	0.833	0.833	1.000
	CH1	CH2	CH3	CH4	CH5

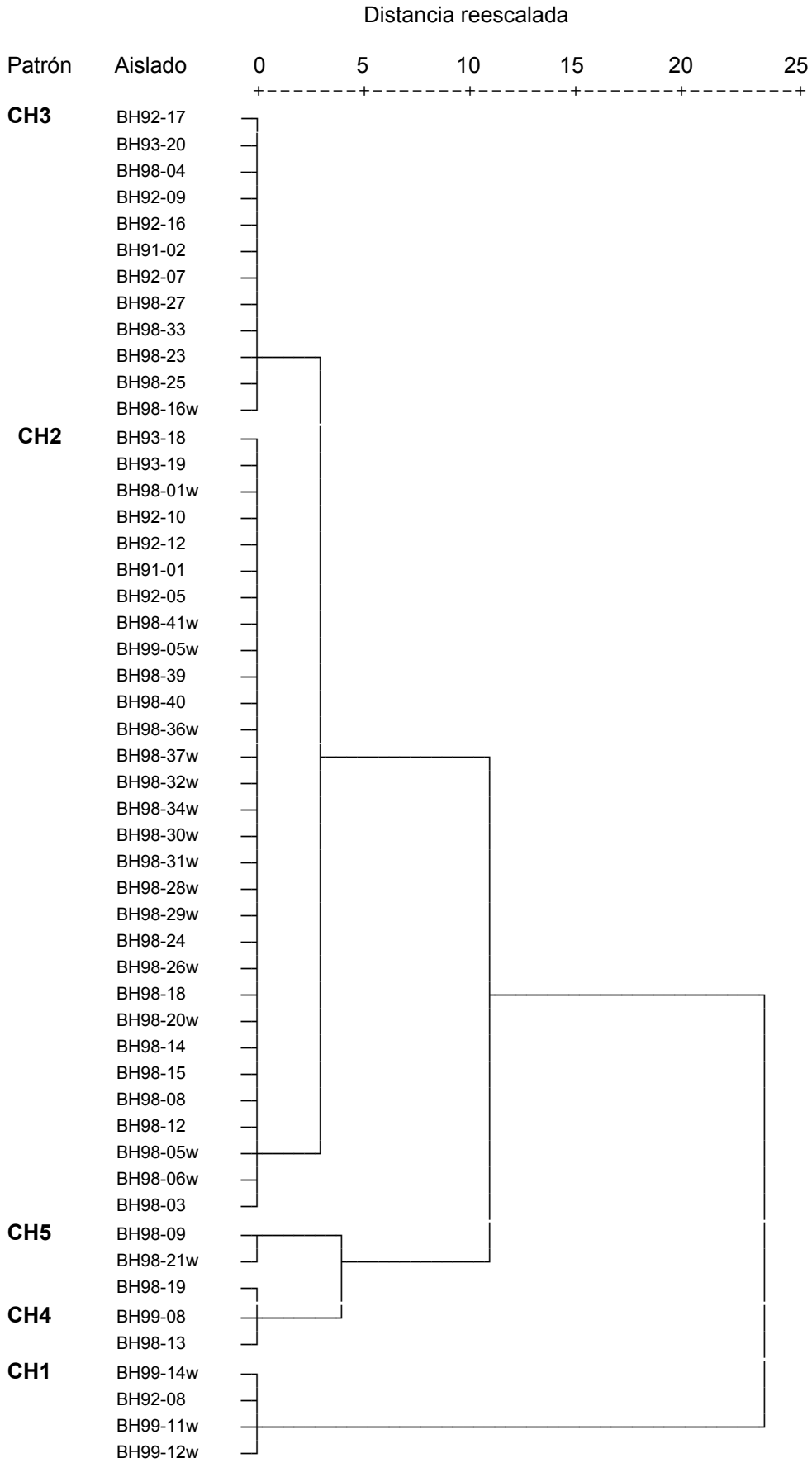


Figura 12. Dendrograma de homología obtenido con la restrictasa Hinf I

4.2.3. Patrones de RFLP obtenidos tras restricción con Rsa I

La restricción con Rsa I permitió la observación de dos a cinco bandas de tamaño relativo comprendido entre 160 y 620 pb. El análisis de estos resultados permitió constatar la existencia de seis patrones, denominados CR1 a CR6 (figura 13), cuyas características diferenciales están recogidas en la tabla 13.

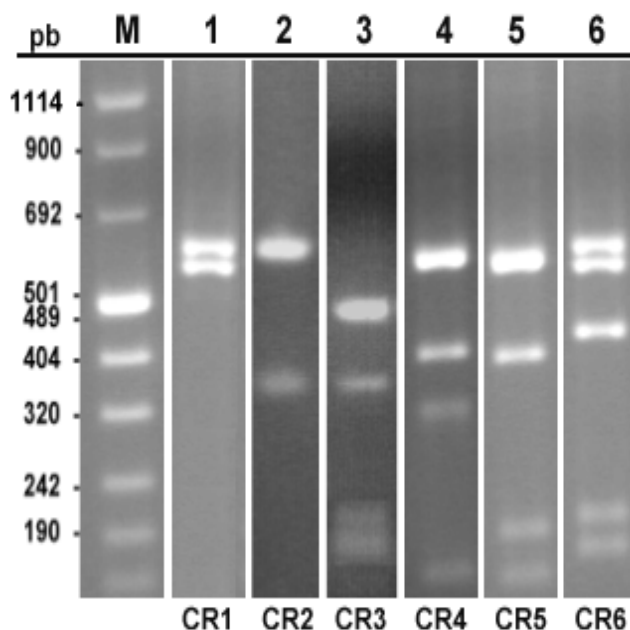


Figura 13. Resultados de la restricción con Rsa I. Carrera M: marcador VIII, a su izquierda el tamaño de los fragmentos en pares de bases. Carreras 1 a 6: ejemplo de los patrones de restricción obtenidos con los diferentes aislados; 1: CR1; 2: CR2; 3: CR3; 4: CR4; 5: CR5 y 6: CR6.

La banda más frecuente fue la de 580 pb, que compartieron cuatro patrones, seguida por las de 180, 400 y 620 pb, que se encontraban en tres de los seis perfiles diferenciados. El patrón más frecuente fue el CR5 en el que se incluyeron 25 aislados, seguido por el CR2 con 15. Se observaron tres perfiles únicos, CR1 (aislado BH99-12w), CR6 (aislado BH99-14w) y CR3 (aislado BH98-36w). Las cepas BH98-36w y la BH99-14w, ya aparecían como patrones únicos en el estudio de los RFLP obtenidos tras digestión con el enzima Alu I. En este ensayo tampoco se observaron patrones mixtos (tabla 13).

Tabla 13. Características de los patrones RFLP obtenidos con Rsa I y distribución de los aislados

Patrón RFLP	Características		Aislados
	Nº de bandas	Tamaño relativo (pb)	
CR1	2	580, 620	BH99-12w
CR2	2	370, 620	BH91-01 BH92-05, 08, 10, 12, 16 BH93-18, 20 BH98- 03, 08, 09, 12, 14, 24, 27
CR3	4	180, 220, 370, 460	BH98-36w
CR4	4	160, 330, 400, 580	BH98-05w, 06w, 34w, 37w, 39, 40, 41w BH99-05w
CR5	4	180, 200, 400, 580	BH91-02 BH92-07, 09, 17 BH93-19 BH98- 01w, 04, 13, 15, 16w, 18, 19, 20w, 21w, 23, 25, 26w, 28w, 29w, 30w, 31w, 32w, 33 BH99-08, 11w
CR6	5	180, 200, 400, 580, 620	BH99-14w

La homología entre aislados pertenecientes a un mismo patrón fue del 100 %, y la similitud entre los diferentes patrones osciló entre el 0% (vgr CR1 frente a CR3) y el 88,9% (CR5 y CR6) (tabla 14, figura 14).

Tabla 14. Grado de similitud entre los patrones RFLP obtenidos tras la restricción con Rsa

CR1	1.000					
CR2	0.667	1.000				
CR3	0.000	0.000	1.000			
CR4	0.286	0.000	0.222	1.000		
CR5	0.333	0.000	0.250	0.667	1.000	
CR6	0.571	0.333	0.222	0.600	0.889	1.000
	CR1	CR2	CR3	CR4	CR5	CR6

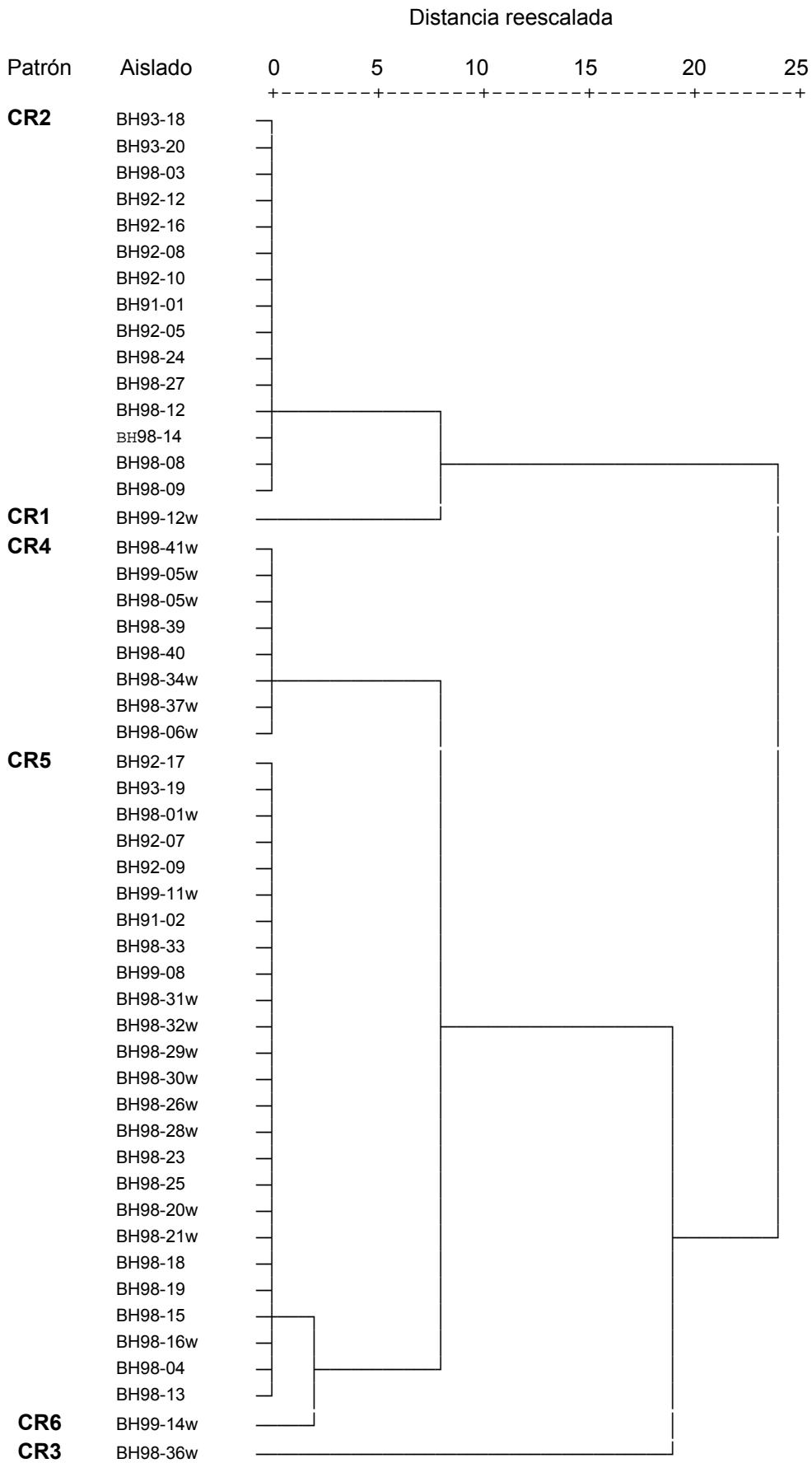


Figura 14. Dendrograma de homología obtenido con la restrictasa Rsa I

4.2.4. Ribodemas obtenidos siguiendo el protocolo de Clark

El análisis conjunto de los resultados obtenidos con las diferentes restrictasas permitió la identificación de seis ribodemas distintos (C1 a C6), con homologías intra e inter-poblacionales del 70 al 100% (vgr. C1) y del 12% (vgr. C2 frente a C5) al 67,2% (vgr. C1 frente a C2), respectivamente (tabla 15, figura 15).

Tabla 15. Grado de similitud entre los ribodemas

C1	0.70-1					
C2	0.672	1.000				
C3	0.599	0.517	0.70-1			
C4	0.405	0.476	0.664	1.000		
C5	0.367	0.120	0.333	0.178	0.72-1	
C6	0.404	0.364	0.613	0.381	0.607	1.000
	C1	C2	C3	C4	C5	C6

En el caso de los ribodemas C1, C3 y C5, en los que la similitud de los aislados incluidos en cada uno de ellos fluctuaba entre el 70% y el 100%, se establecieron subgrupos de homología conformados por aislados con similitud del 100%, que fueron denominados como el ribodema de origen seguido por una letra minúscula. Así, en el caso del ribodema C1 se identificaron cuatro subgrupos de homología (C1a a C1d), ocho en C3 (C3a a C3h) y tres en C5 (C5a a C5c) (figura 15).

El ribodema C1 incluye 14 aislados (27,5%), con una similitud media del 82%, distribuidos en cuatro subgrupos de homología. Este ribodema se caracteriza porque todos los aislados comparten el patrón CR2, y además los subgrupos C1a, C1b y C1c también comparten CA4. Se mantiene como “posiblemente relacionado” con C2 y C3 y “no relacionado” con los restantes ribodemas. Los aislados incluidos en los subgrupos C1a y C1c fueron obtenidos de pacientes con diarrea aguda, mientras que el incluido en C1d y

los aislados BH92-05, BH92-10, BH92-12 y BH93-18, pertenecientes a C1c, lo fueron de diarreas crónicas (tablas 15 y 16).

Tabla 16. Características del ribodema C1

Ribodema	Subgrupos de homología				Aislados	Patrones RFLP
		C1a	C1b	C1c		
C1	C1a	1.000			BH92-16 BH93-20 BH98-27	CR2+CA4+CH3
	C1b	0.947	1.000		BH92-05, 10, 12 BH93-18 BH98-03, 08, 12 14, 24	CR2+CA4+CH2
	C1c	0.909	0.857	1.000	BH98-09	CR2+CA4+CH5
	C1d	0.737	0.778	0.700	1.000	BH91-01

El ribodema C2 incluye un único aislado (BH98-36w) procedente de un paciente diagnosticado de diarrea aguda. Se caracteriza por presentar los perfiles CA2, CR3 y CH2, los dos primeros exclusivos de esta población, y su relación con el resto de ribodemas es de “posiblemente relacionado” con C1 y C3, y de “no relacionado” con C4, C5 y C6 (tabla 15).

El ribodema C3 resultó ser el más frecuente con 31 aislados (60,3%), con una similitud media del 80,5%, distribuidos en ocho subgrupos de homología (C3a a C3h), y su relación con los demás ribodemas es de “no relacionado” con C5 y de “posiblemente relacionado” con los otros (tablas 15 y 17). El 87,1% (27/31) de los aislados procedían de pacientes con diarrea aguda; no obstante, en tres de ellos la parasitación por *B. hominis* se asoció con otros enteropatógenos, en un caso (BH98-01) a *S. sonnei*, y en los restantes (BH98-18, BH98-23) a *C. jejuni*.

El ribodema C4 incluye un único aislado (BH98-31w), obtenido de un paciente diagnosticado de diarrea aguda. Se caracteriza por estar

únicamente relacionado con C3 y por presentar los perfiles CA1, CH2 y CR5, el primero de ellos exclusivo de esta población.

Tabla 17. Características del ribodema C3

Ribodema	Subgrupos de homología								Aislados	Patrones RFLP	
		C3a	C3b	C3c	C3d	C3e	C3f	C3g			C3h
C3	C3a	1.000								BH98-05w, 37w BH99-05w	CA4+CH2+CR4
	C3b	0.880	1.000							BH98-15	CA4+CH2+CR5
	C3c	0.846	0.960	1.000						BH92-17	CA4+CH3+CR5
	C3d	0.700	0.725	0.750	1.000					BH98-13, 19 BH99-08	CA3+CH4+CR5
	C3e	0.700	0.741	0.786	0.929	1.000				BH98-21w	CA3+CH5+CR5
	C3f	0.846	0.720	0.700	0.700	0.786	1.000			BH98-06w, 34w 39, 40, 41w	CA3+CH2+CR4
	C3g	0.720	0.833	0.800	0.800	0.889	0.880	1.000		BH93-19 BH98-01w, 18, 20w, 26w, 28w, 29w, 30w, 32w	CA3+CH2+CR5
	C3h	0.700	0.800	0.846	0.846	0.929	0.846	0.960	1.000	BH91-02 BH92-07, 09 BH98-04, 16w, 23, 25, 33	CA3+CH3+CR5

Los tres aislados que constituyen el ribodema C5 se obtuvieron de pacientes con diarrea crónica, y se distribuyen en tres subgrupos de homología (C5a a C5c), con una similitud media del 81,9%. Todos ellos presentan el patrón CH1 y los subgrupos C5a y C5b comparten el perfil CA6, exclusivo de estos aislados, lo que determina que únicamente estén relacionados con C6 (tablas 15 y 18).

Tabla 18. Características del ribodema C5

Ribodema	Grupos de homología			Aislados	Patrones RFLP	
		C5a	C5b			C5c
C5	C5a	1.000			BH99-12w	CA6+CH1+CR1
	C5b	0.947	1.000		BH92-08	CA6+CH1+CR2
	C5c	0.783	0.727	1.000	BH99-14w	CA5+CH1+CR6

En el ribodema C6 se incluye solo un aislado (BH99-11w), recuperado de un paciente con diarrea crónica, con los perfiles CH1, CA4 y CR5, el primero de ellos como vimos en C5, relacionado con diarreas crónicas. Los índices de similitud determinan su posible relación con C3 y C5 (tabla 15).

El análisis estadístico demostró la existencia de asociaciones estadísticas ($p < 0,05$) entre los aislados del ribodema C3 y diarrea aguda, y el ribodema C5 y diarrea crónica, con riesgos relativos de 1,74 y 4,8 respectivamente (tabla 19).

Tabla 19. Correlación estadística entre ribodema y tipo de diarrea.

Ribodema	Nº de aislados	Ratio DA:DC:ASINT*	Correlación estadística	
			Riesgo relativo	p
C1	14	4 : 3 : 0	< 1	> 0,05
C2	1	1 : 0 : 0	< 1	> 0,05
C3	31	9 : 1 : 0,3	1,74	0,01
C4	1	1 : 0 : 0	< 1	> 0,05
C5	3	0 : 3 : 0	4,8	0,02
C6	1	0 : 1 : 0	< 1	> 0,05

*DA: Diarrea aguda; DC: Diarrea crónica; ASINT: asintomático.

Al comparar los patrones de RFLP que caracterizaron a cada grupo, hemos encontrado correspondencia entre nuestros ribodemas C3, C5 y C6 con los descritos por Clark como 3, 1 y 6, respectivamente.

En la figura 15 se resumen en un dendograma los patrones obtenidos y las relaciones de homología existentes entre ellos.

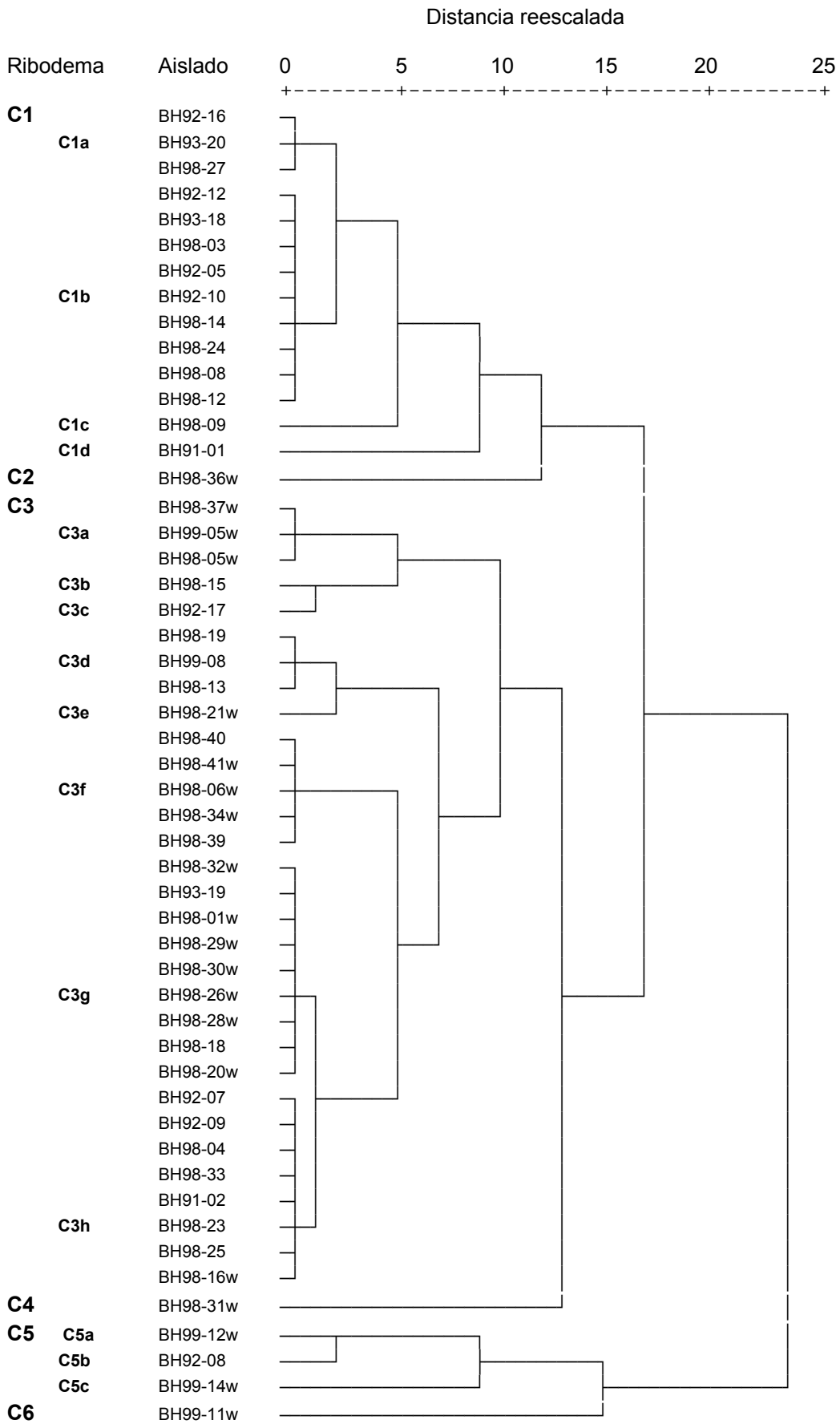


Figura 15. Dendrograma de homología de los ribodemas según el protocolo de Clark.

4.3. Patrones RFLP y ribodemas obtenidos según el protocolo de Böhm

La amplificación del fragmento de ADN comprendido entre los cebadores F_1 y R_1 , permitió la detección en todos los aislados de un único fragmento con un tamaño aproximado de 1.100 pb (figura 16).

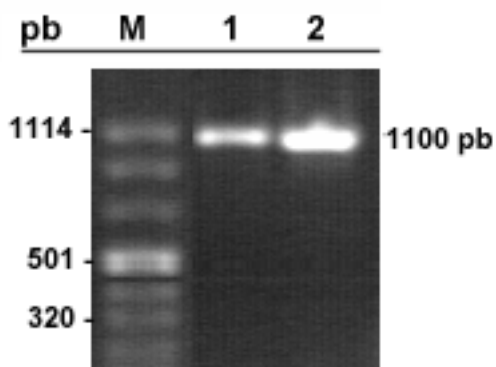


Figura 16. Resultados de la amplificación con F_1 y R_1 . Carrera M: marcador VIII, a su izquierda el tamaño de los fragmentos en pares de bases. Carrera 1: Amplicón del aislado BH91-01. Carrera 2: Amplicón del aislado BH98-31w.

4.3.1. Patrones de RFLP obtenidos tras restricción con Alu I

El tratamiento de los amplicones de 1.100 pb con el enzima Alu I permitió detectar entre uno y cuatro fragmentos, con tamaños relativos comprendidos entre 210 y 675 pb, y la existencia de cinco patrones de restricción (BA1 a BA5) (figura 17, tabla 20).

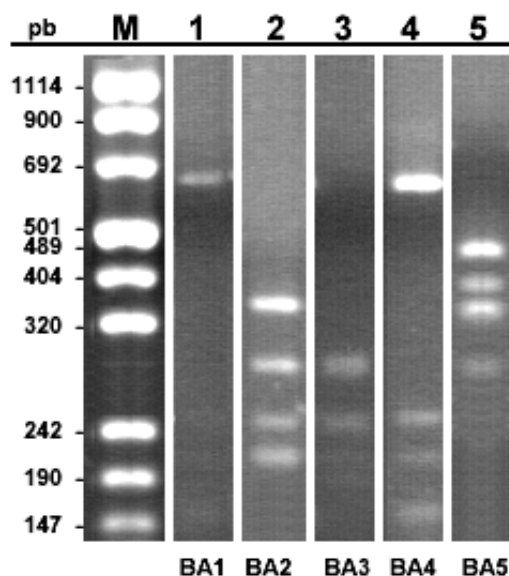


Figura 17. Resultados de la restricción con Alu I. Carrera M: marcador VIII, a su izquierda el tamaño de los fragmentos en pares de bases. Carreras 1 a 5: ejemplo de los patrones de restricción obtenidos con los diferentes aislados, de BA1 a BA5.

El patrón más frecuentemente observado fue BA4 con 27 aislados (53%), seguido de BA1 con 19 (37,2%). No se detectaron patrones mixtos, pero sí un perfil exclusivo de un aislado, el BA3 (tabla 20).

Tabla 20. Características de los patrones RFLP obtenidos con Alu I y distribución de los aislados

Patrón RFLP	Características		Aislados
	Nº de bandas	Tamaño relativo (pb)	
BA1	1	675	BH91-01 BH92-10, 12 BH93-18 BH98-01w, 13, 14, 15, 26w, 27, 28w, 29w, 30w, 31w, 32w, 36w, 41w BH99-05w, 08
BA2	4	210, 250, 310, 400	BH92-05 BH99-14w
BA3	2	250, 310	BH99-12w
BA4	3	210, 250, 675	BH91-02 BH92-07, 09, 16, 17 BH93-19, 20 BH98-03, 04, 05w, 06w, 08, 09, 12, 16w, 18, 19, 21w, 23, 24, 25, 33, 34w, 37w, 39, 40 BH99-11w
BA5	4	310, 350, 400, 475	BH92-08 BH98-20w

El grado de similitud entre los aislados incluidos en el mismo patrón fue del 100%, mientras que la homología encontrada entre los diferentes patrones osciló entre el 0 % (vgr. BA1 frente a BA2) y el 66,7% (vgr. BA2 frente a BA5) (tabla 21, figura 18).

Tabla 21. Grado de similitud entre los patrones RFLP obtenidos tras la restricción con Alu I.

BA1	1.000				
BA2	0.000	1.000			
BA3	0.000	0.571	1.000		
BA4	0.500	0.500	0.400	1.000	
BA5	0.000	0.667	0.333	0.000	1.000
	BA1	BA2	BA3	BA4	BA5

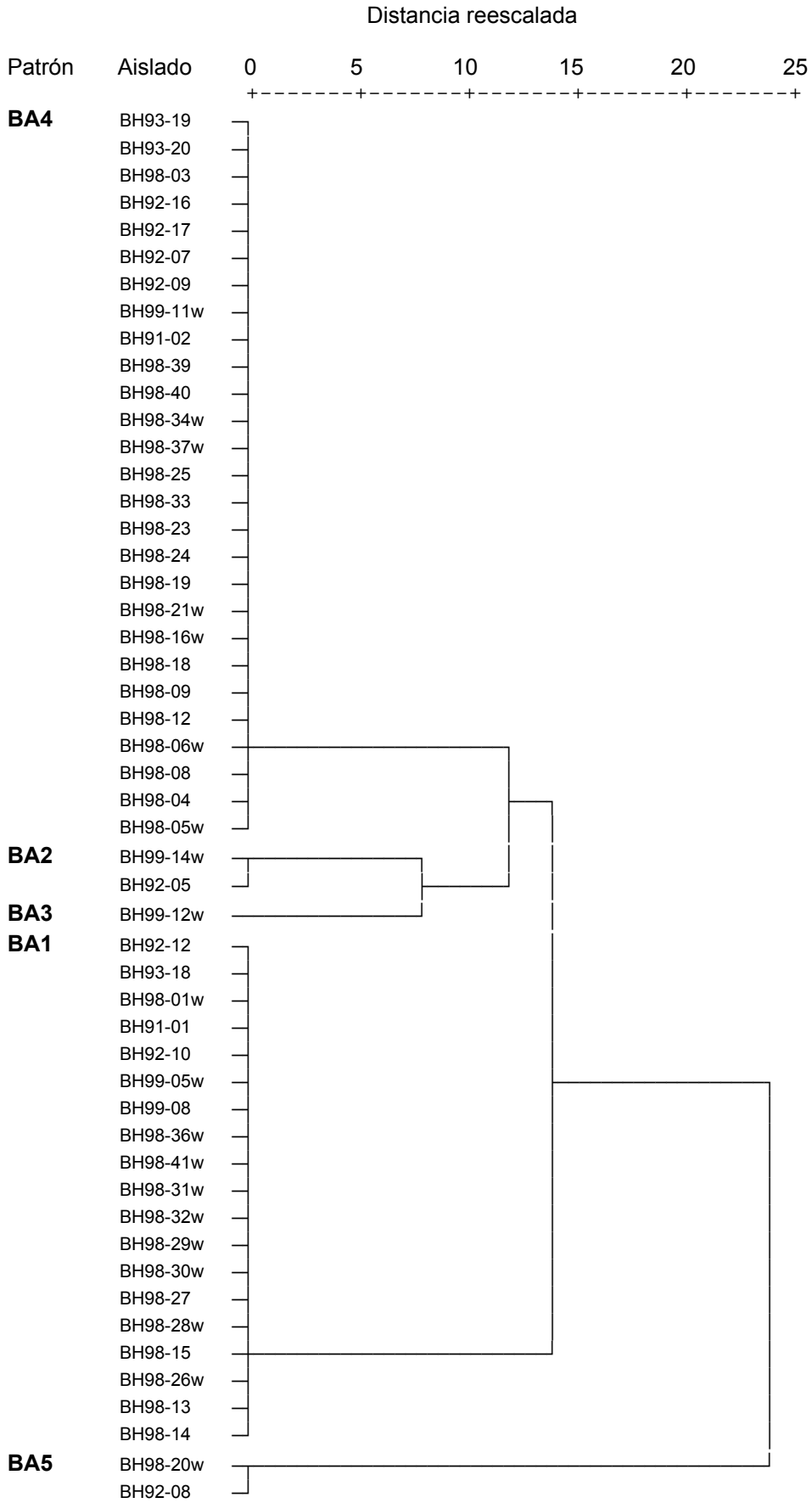


Figura 18. Dendrograma de homología obtenido con la restrictasa Alu I

4.3.2. Patrones de RFLP obtenidos tras restricción con Hinf I

Tras la digestión con el enzima Hinf I se detectaron de dos a cinco fragmentos, con tamaños relativos comprendidos entre 190 y 850 pb. El análisis de los perfiles de restricción permitió constatar la existencia de seis patrones, denominados BHi1 a BHi6 (figura 19).

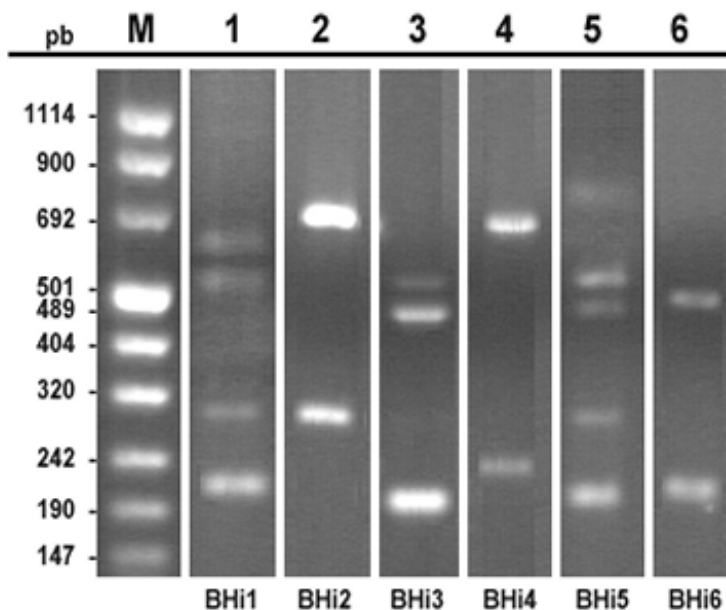


Figura 19. Resultados de la restricción con Hinf I. Carrera M: marcador VIII, a su izquierda el tamaño de los fragmentos en pares de bases. Carreras 1a 6: ejemplo de los patrones de restricción obtenidos con los diferentes aislados, de BHi1 a BHi6.

El fragmento más frecuentemente encontrado fue el de 575 pb, detectado en cuatro de los seis patrones, seguido por el de 310 pb (tabla 22).

Se observó un patrón claramente mayoritario, el BHi6, en el que se incluyeron el 82% de los aislados estudiados (42/51). Se detectaron tres patrones únicos (BHi1, BHi3 y BHi5) y no apareció ningún patrón que pudiera considerarse mixto (tabla 22).

Analizados los patrones obtenidos, determinamos que esta restrictasa es la que permite discriminar entre un mayor número de patrones distintos a partir del amplicón de Böhm (tabla 22).

Tabla 22. Características de los patrones RFLP obtenidos con Hinf I y distribución de los aislados

Patrón RFLP	Características		Aislados
	Nº de bandas	Tamaño relativo (pb)	
BHi1	4	200, 310, 575, 650	BH92-07
BHi2	2	310, 775	BH92-08 BH98-12, 33 BH99-14w
BHi3	3	190, 490, 575	BH98-32w
BHi4	2	230, 775	BH98-01w BH99-11w
BHi5	4	200, 310, 490, 575, 850	BH93-19
BHi6	2	190, 575	BH91-01, 02 BH92-05, 09, 10, 12, 16, 17 BH93-18, 20 BH98- 03, 04, 05w, 06w, 08, 09, 13, 14, 15, 16w, 18, 19, 20w, 21w, 23, 24, 25, 26w, 27, 28w, 29w, 30w, 31w, 34w, 36w, 37w, 39, 40, 41w BH99-05w, 08, 12w

La homología entre los aislados pertenecientes al mismo patrón fue del 100%, y el índice de similitud entre los diferentes patrones variaba del 0% (vgr. BHi1 frente a BHi4) al 88,9% (vgr. BHi1 frente a BHi5) (tabla 23).

Tabla 23. Grado de similitud entre los patrones RFLP obtenidos tras la restricción con Hinf I.

BHi1	1.000					
BHi2	0.333	1.000				
BHi3	0.333	0.000	1.000			
BHi4	0.000	0.500	0.000	1.000		
BHi5	0.889	0.286	0.444	0.000	1.000	
BHi6	0.333	0.000	0.667	0.000	0.286	1.000
	BHi1	BHi2	BHi3	BHi4	BHi5	BHi6

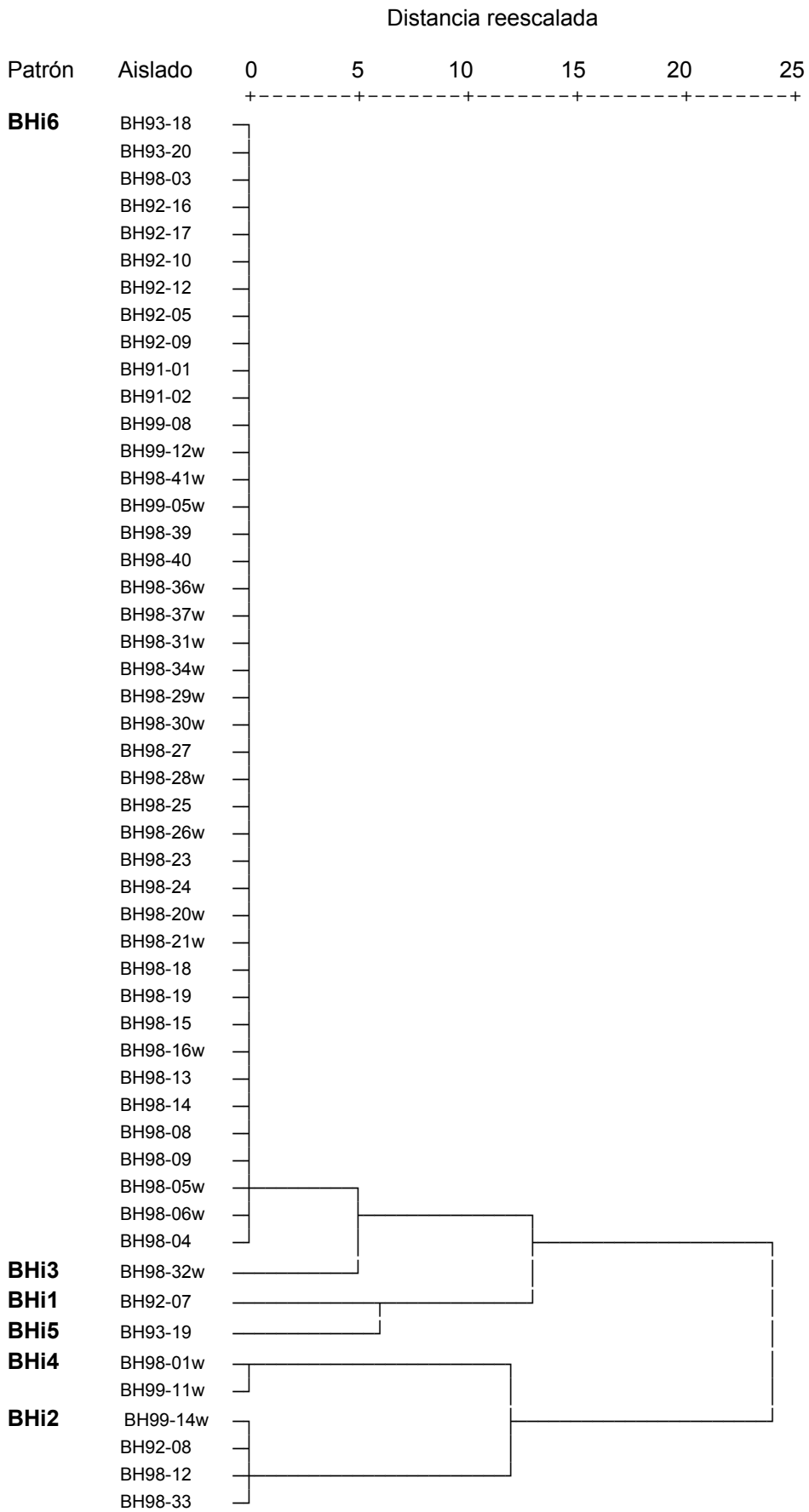


Figura 20. Dendrograma de homología obtenido con la restrictasa Hinf I

4.3.3. Patrones de RFLP obtenidos tras restricción con Rsa I

La restricción de los amplicones con este enzima permitió la observación de dos patrones diferentes, denominados BR1 y BR2, con dos y tres fragmentos, respectivamente, de tamaños relativos comprendidos entre 190 y 625 pb (figura 21, tabla 24).

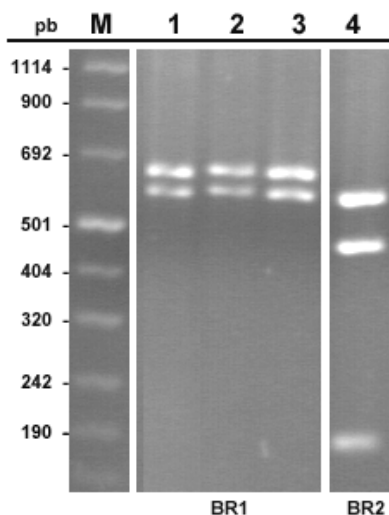


Figura 21. Resultados de la restricción con Rsa I. Carrera M: marcador VIII, a su izquierda el tamaño de los fragmentos en pares de bases. Carreras 1 a 4: ejemplo de los patrones de restricción obtenidos con los diferentes aislados, de BR1 a BR2.

Tabla 24. Características de los patrones RFLP obtenidos con Rsa I y distribución de los aislados

Patrón RFLP	Características		Aislados
	Nº de bandas	Tamaño relativo (pb)	
BR1	2	560, 625	BH91-01, 02 BH92-05, 07, 08, 09, 10, 12, 16, 17 BH93-18, 19, 20 BH98-01w, 03, 04, 05w, 06w, 08, 09, 12, 13, 14, 15, 16w, 18, 19, 20w, 21w, 23, 24, 25, 26w, 27, 28w, 29w, 30w, 31w, 32w, 33, 34w, 36w, 37w, 39, 40, 41w BH99-05w, 08, 11w
BR2	3	190, 450, 560	BH99-12w, 14w

La similitud entre los aislados pertenecientes al mismo patrón fue del 100%, y la homología entre ambos patrones (BR1 frente a BR2) fue del 40%. Encontramos un patrón claramente mayoritario (BR1) en el que se incluyen la totalidad de los aislados, a excepción de BH99-12w y BH99-14w, que constituyen el segundo patrón (BR2). Estos dos aislados presentaron patrones exclusivos en varios de los análisis realizados.

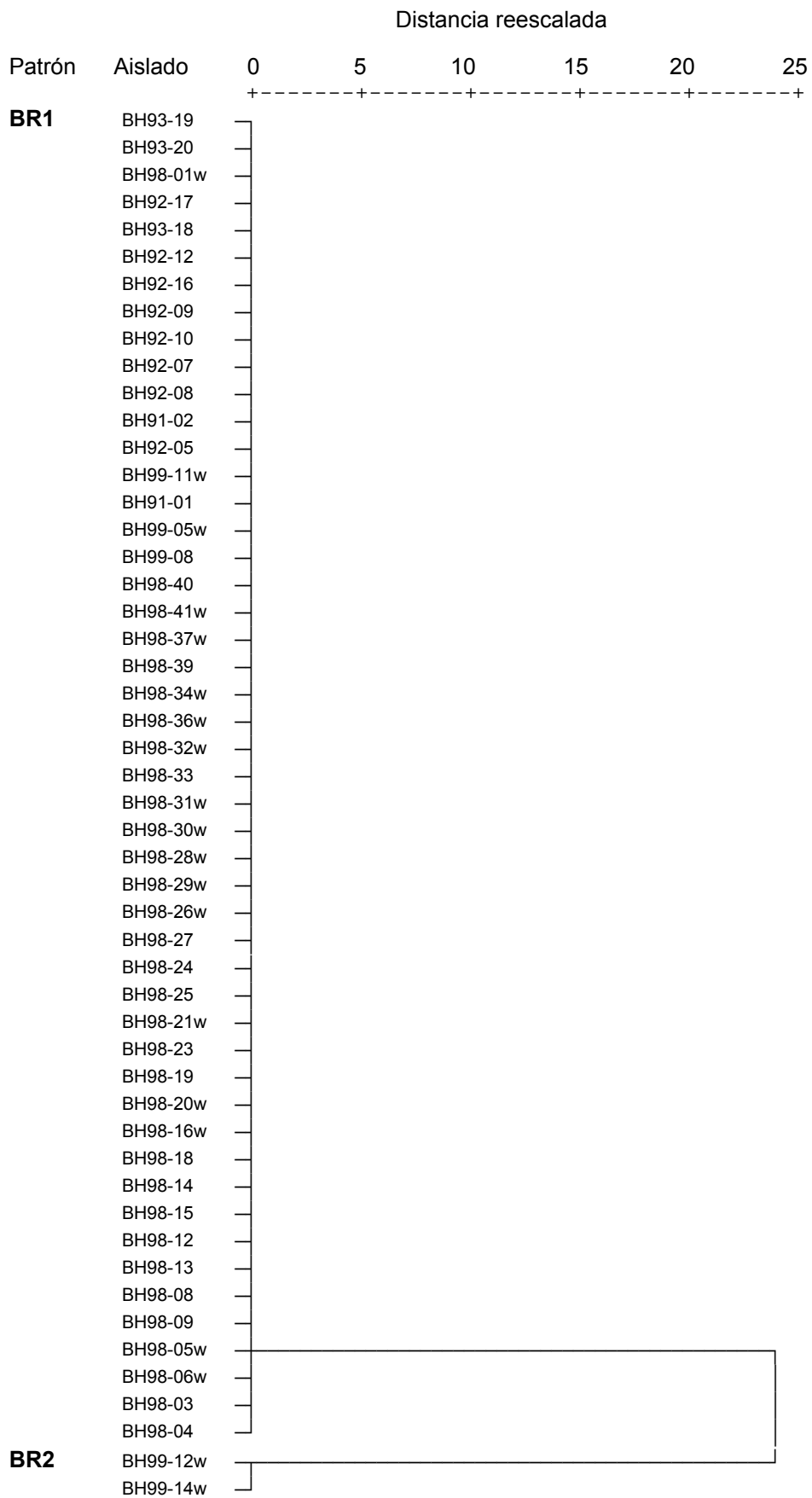


Figura 22. Dendrograma de homología obtenido con la restrictasa RsaI

4.3.4. Ribodemas obtenidos siguiendo el protocolo de Böhm

El análisis conjunto de los resultados obtenidos con los tres enzimas de restricción estudiados, permitió la identificación de siete ribodemas (B1 a B7), con homologías intra e inter-poblacionales que fluctuaban entre el 75% y el 100% (vgr. B5) y entre el 21,7% (vgr. B1 frente a B7) y el 68,3% (vgr. B1 frente a B2), respectivamente (tabla 25).

Tabla 25. Grado de similitud entre los ribodemas según el protocolo de Böhm

B1	0.76-1						
B2	0.683	0.88-1					
B3	0.662	0.646	1.000				
B4	0.555	0.603	0.458	0.70-1			
B5	0.430	0.381	0.625	0.404	0.75-1		
B6	0.511	0.435	0.667	0.246	0.400	1.000	
B7	0.217	0.446	0.588	0.289	0.470	0.625	1.000
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7

El índice de homología entre las cepas que constituyeron cada uno de los ribodemas, fue siempre igual o superior al 70%, tal y como puede observarse en los intervalos intra-poblacionales de la tabla 25. Dentro de cada ribodema definimos subgrupos que reflejaban si existía identidad entre las cepas (coeficiente de similitud del 100%) compartiendo en ese caso el mismo subgrupo; o si se trataba de cepas estrechamente relacionadas (índice de homología entre el 70 y el 99%) incluyéndose en el mismo ribodema pero en diferente subgrupo. Entre los ribodemas descritos, el estudio del grado de similitud entre cepas, permitió distinguir entre los “posiblemente relacionados” (vgr. B1 respecto de B2, B3, B4 y B6) con porcentajes de homología mayores o iguales al 50%, y los “no relacionados” (vgr. B1 respecto de B5 y B7) cuyo índice de homología era inferior al 50%.

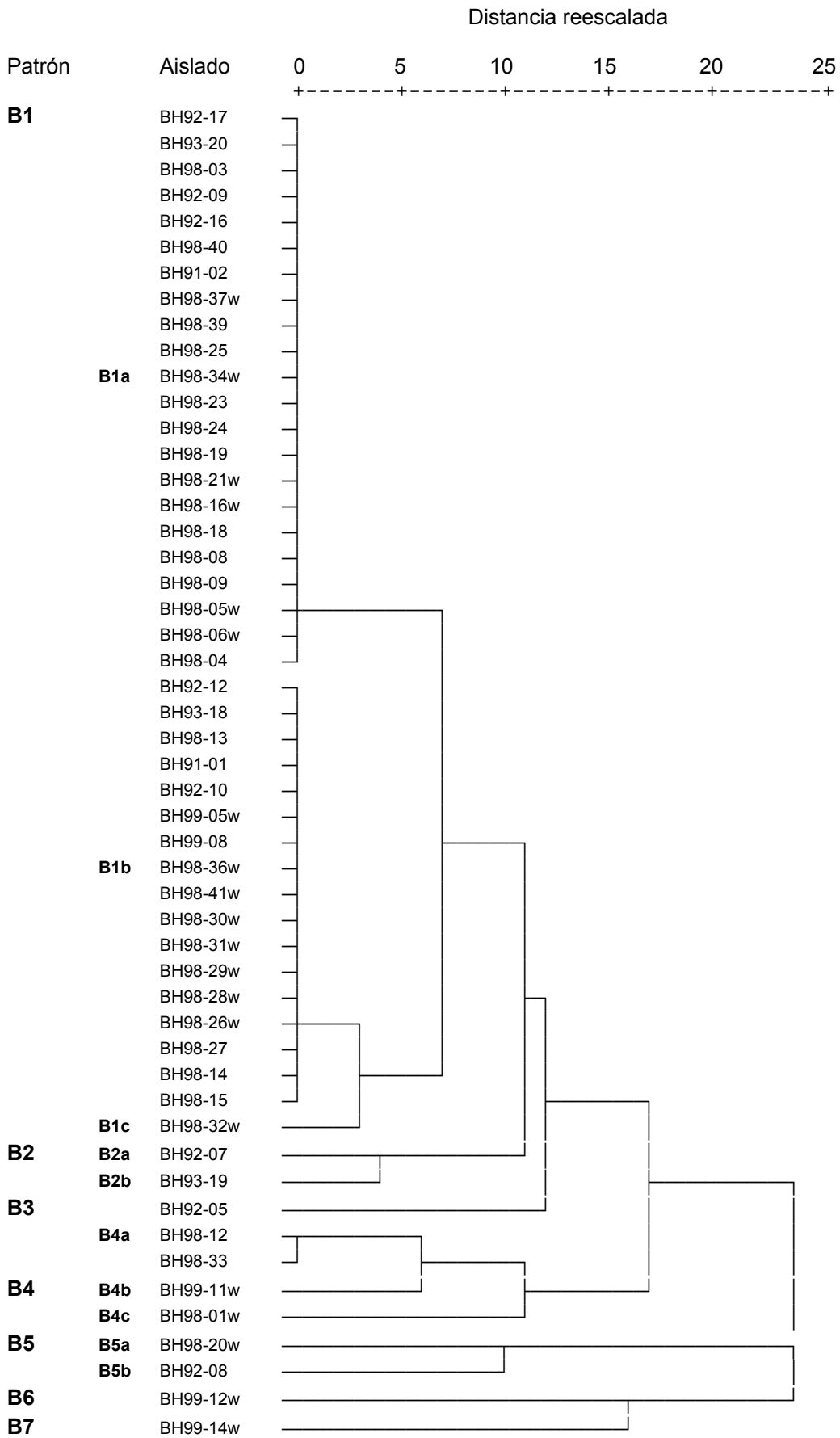


Figura 23. Dendrograma de los ribodemas obtenidos con el protocolo de Böhm

En el ribodema B1 se agrupan 40 cepas, que representan el 78,8% del total. Dichos aislados se encuentran distribuidos en tres subgrupos entre los que el índice de similitud promedio fue del 83,7%. Los subgrupos B1a y B1b, incorporan la mayor parte de los aislados del ribodema B1, casi todos procedentes de pacientes sintomáticos, a excepción del aislado BH98-16w de origen asintomático. Comparten dos de los tres patrones de RFLP (BR1 y BHi6). El subgrupo B1c, se caracteriza por la presencia de una única cepa, BH98-32w, originaria de un cuadro de diarrea aguda. La relación de este ribodema con el resto es de “posiblemente relacionado” respecto de B2, B3, B4 y B6; y de “no relacionado” con B5 y B7 (tabla 26).

Tabla 26. Ribodema B1 y sus correspondientes subgrupos

Ribodema	Subgrupos			Aislados	Patrones RFLP
		B1a	B1b		
B1	B1a	1		BH91-02 BH92-09, 16, 17 BH93-20 BH98-03, 04, 05w, 06w, 08, 09, 16w, 18, 19, 21w, 23, 24, 25, 34w, 37w, 39, 40	BA4 + BHi6 + BR1
	B1b	0.833	1	BH91-01 BH92-12 BH93-18, 20 BH98-13, 14, 15, 26w, 27, 28w, 29w, 30w, 31w, 36w, 41w BH99-05w, 08	BA1 + BHi6 + BR1
	B1c	0.769	0.909	1	BH98-32w

En el ribodema B2 diferenciamos dos subgrupos con un coeficiente de similitud del 88,9%, al compartir dos perfiles de RFLP, el BA4 y el BR1. Estas dos cepas constituyen el 3,92% del total a estudio, y se diferencian en los subgrupos B2a (BH92-07) relacionado con síndrome de diarrea crónica y B2b (BH93-19) correspondiente con diarrea aguda. De acuerdo con los datos de homología, el ribodema B2 está posiblemente relacionado con los ribodemas B1, B3 y B4, y no guarda relación con los aislados de los ribodemas B5, B6 y B7 (tabla 27).

Tabla 27. Características del ribodema B2 y subgrupos de homología

Ribodema	Subgrupos			Aislado	Patrones RFLP
		B2a	B2b		
B2	B2a	1		BH92-07	BA4 + BHi1 + BR1
	B2b	0.889	1	BH93-19	BA4 + BHi5 + BR1

El ribodema B3 incluye un único aislado (1,96%), la cepa BH92-05. Se caracteriza por estar relacionado con todos los demás, a excepción de B4 con el que su índice de homología es inferior al 50% y por presentar los patrones BHi6, BR1 y BA2; este último característico de los aislados procedentes de síndromes diarreicos crónicos.

El ribodema B4 lo conforman cuatro aislados (7,84%), distribuidos en tres subgrupos con una similitud promedio del 78,8%. Los subgrupo B4a y B4c incluyen aislados relacionados con diarrea aguda; mientras que el subgrupo B4b se asocia con diarrea crónica. Este ribodema se caracteriza también por la presencia de un perfil único el BHi4, que aparece en los aislados de los subgrupos B4b y B4c, y por estar “posiblemente relacionado” con los ribodemas B1 y B2 (tabla 28).

Tabla 28. Características del ribodema B4 y subgrupos de homología

Ribodema	Subgrupos				Aislados	Patrones RFLP
		B4a	B4b	B4c		
B4	B4a	1			BH98-12, 33	BA4 + BHi2 + BR1
	B4b	0.857	1		BH99-11w	BA4 + BHi4 + BR1
	B4c	0.700	0.833	1	BH98-01w	BA1 + BHi4 + BR1

En el ribodema B5 encontramos únicamente dos aislados (3,9%) localizados cada uno en un subgrupo, entre los que el coeficiente de similitud promedio fue del 75%. En B5a encontramos una cepa de un paciente aquejado de diarrea aguda, BH98-20w; mientras que el B5b, con el aislado

BH92-08, se presentaba en un paciente con síndrome diarreico crónico en el que se identificó además *Salmonella spp.* Estos aislados presentaban un patrón exclusivo, BA5, lo que los mantiene como “no relacionados” respecto de B1, B2, B4, B6 y B7, es decir, el resto de ribodemas con excepción de B3, con el que estaría posiblemente relacionado al presentar un grado de homología del 62,5% (tabla 29).

Tabla 29. Ribodema B5 y sus subgrupos correspondientes

Ribodema	Subgrupos		Aislados	Patrones RFLP
		B5a		
B5	B5a	1	BH98-20w	BA5 + BHi6 + BR1
	B5b	0.750	BH92-08	BA5 + BHi2 + BR1

Los ribodemas B6 y B7 engloban a sendos aislados, BH99-12w y BH99-14w, obtenidos de pacientes con diarrea crónica, y se caracterizan por presentar los patrones RFLP: BA3, BHi6 y BR2, y BA2, BHi2 y BR2, respectivamente. Ambos ribodemas están posiblemente relacionados entre sí y con B3, y B6 además se relaciona con B1.

Analizadas las correlaciones estadísticas entre la pertenencia a un ribodema determinado y los diagnósticos, diarrea aguda o crónica, únicamente se encontró relación estadísticamente significativa entre diarrea aguda y el ribodema B1; ya que tras la aplicación del test Chi-cuadrado, corregido por el factor de Yates, el valor de la p de Pearson fue de 0,05; con un riesgo relativo de 1,76.

Al comparar los patrones de RFLP que caracterizaron a cada grupo, hemos encontrado correspondencia entre nuestros ribodemas B5, B1, B6 y B7 con los descritos por Böhm como III, IV y V (en este último se agruparían B6 y B7) respectivamente.

4.4. Análisis conjunto de los ribodemas obtenidos según protocolos de Clark y Böhm

El análisis conjunto de los resultados obtenidos con los protocolos de Clark (ribodemas C1 a C6) y de Böhm (ribodemas B1 a B7), permitió la descripción de cinco ribodemas (R1 a R5) (tablas 30 y 31, figura 24), con homología intra e inter-poblacionales que oscilaban entre el 70 al 100% (vgr. R1), y entre el 25,5% (vgr. R2 frente a R5) y 65,7% (vgr. R4 frente a R5), respectivamente (tabla 30).

Tabla 30. Grado de similitud entre ribodemas totales

R1	0.70-1				
R2	0.674	0.70-1			
R3	0.453	0.574	1.000		
R4	0.347	0.395	0.553	0.718	
R5	0.331	0.255	0.457	0.657	1.000
	R1	R2	R3	R4	R5

Tras el análisis estadístico se comprobó que los ribodemas R1 y R2 fueron los más frecuentes, presentando aislados procedentes de diarrea aguda y también crónicos. Se encontró únicamente relación estadística significativa entre la pertenencia al patrón R2 y diarrea aguda, con valor de p de 0,005 y un riesgo relativo de 1,85.

Tabla 31. Correlación estadística entre ribodema y diagnóstico

Ribodema	Relación con otros ribodemas	Nº de aislados	Ratio DA:DC:ASINT	Correlación estadística	
				Riesgo relativo	p
R1	R2	15	10: 5: 0	< 1	> 0,05
R2	R1, R3	32	28: 3: 1	1,85	0,005
R3	R2, R4	1	0: 1: 0	< 1	> 0,05
R4	R3, R5	2	0 : 2: 0	< 1	> 0,05
R5	R4	1	0 : 1: 0	< 1	> 0,05

*DA: Diarrea aguda; DC: Diarrea crónica; ASINT: asintomático.

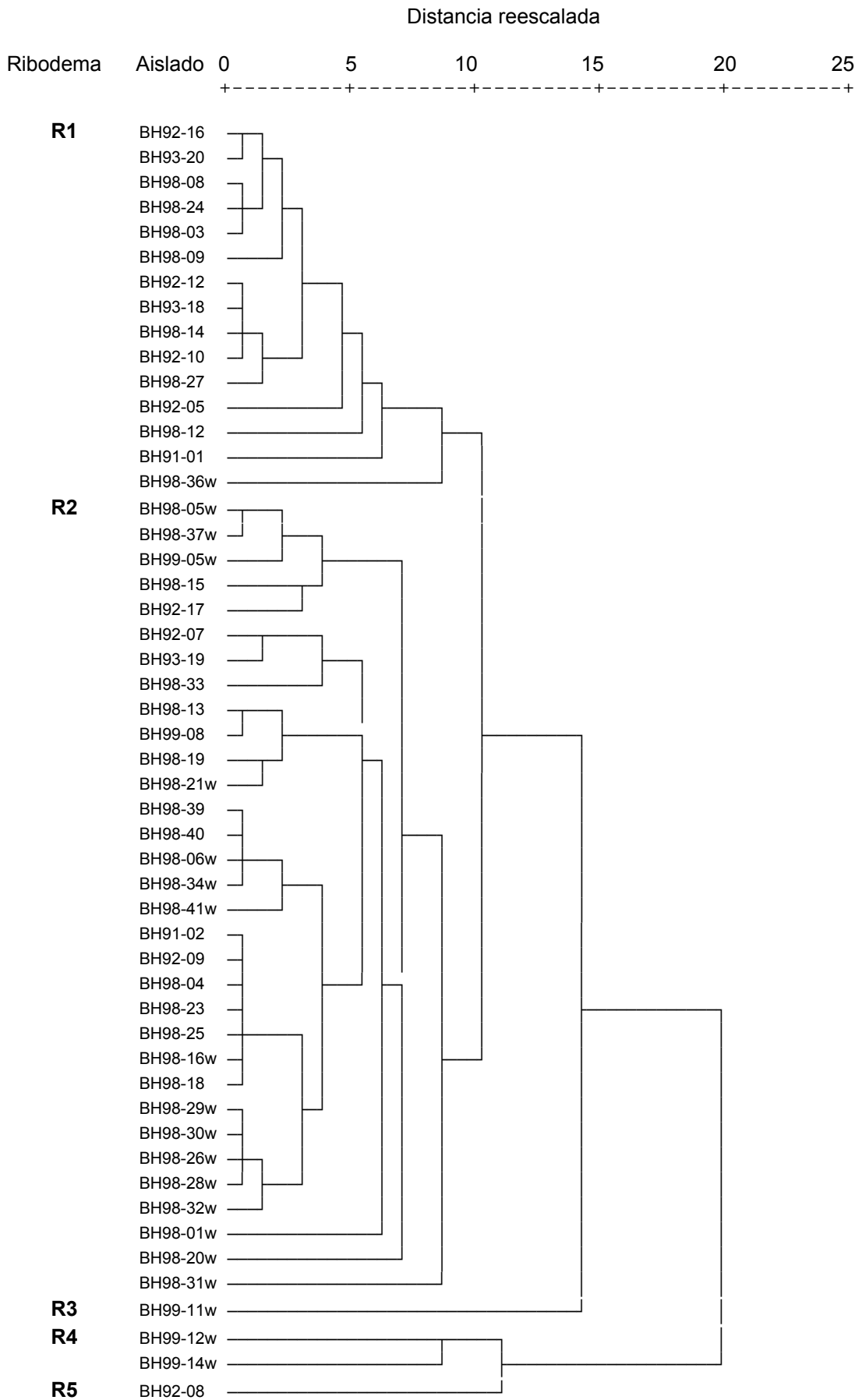


Figura 24. Dendrograma de homología obtenido tras análisis conjunto de los perfiles de RFLP

El análisis de las diferencias y semejanzas del agrupamiento obtenido en conjunto, respecto del análisis separado por amplicones; demostró que la distribución de los aislados se asemeja a la obtenida en el protocolo de Clark en un 94,1%; mientras que ese dato es del 39,2% al compararlo con la agrupación obtenida con el método de Böhm.

4.5. Análisis de la variación intraespecífica de *B. hominis* según el protocolo de Init

La separación electroforética de los amplicones obtenidos con los cebadores TR₇ y TR₈, permitió la detección de uno a ocho fragmentos con tamaños relativos comprendidos entre 300 y 1.500 pb (figura 25).

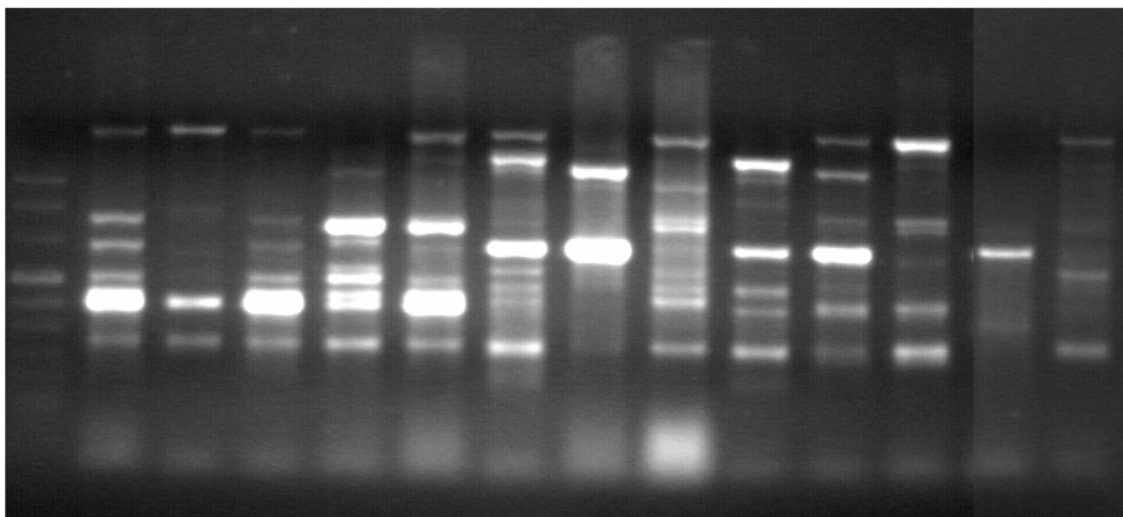


Figura 25. Ejemplo de los resultados de la amplificación con TR₇ y TR₈. Obsérvese la gran diversidad de perfiles obtenidos.

El análisis individualizado de los aislados objeto de estudio, demostró la existencia de 36 perfiles, lo que supone una divergencia entre los aislados próxima al 70%. Se obtuvieron diferencias importantes en el número y en el tamaño de los fragmentos relacionadas con el carácter xénico o no de los cultivos (figura 27), razón por la cual, optamos por analizar los resultados separadamente.

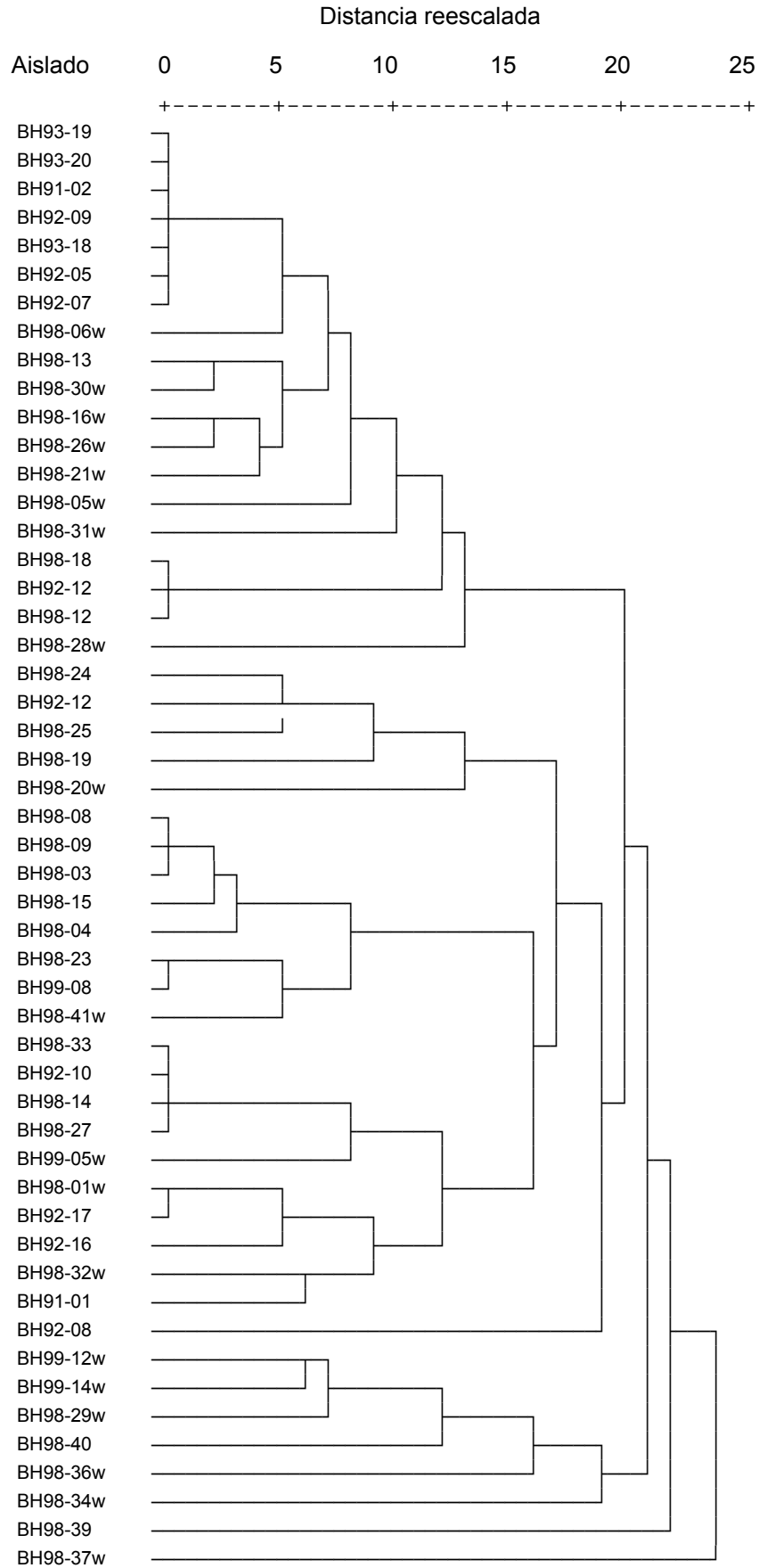


Figura 26. Dendrograma de homología con el total de aislados según protocolo de Init

4.5.1. Patrones obtenidos en los aislados axénicos

En este caso comprobamos la existencia de uno a cinco fragmentos, cuyos tamaños relativos oscilaban entre 450 y 900 pb, y tres patrones (P1 a P3), algunos de ellos con subgrupos de homología (figura 27).

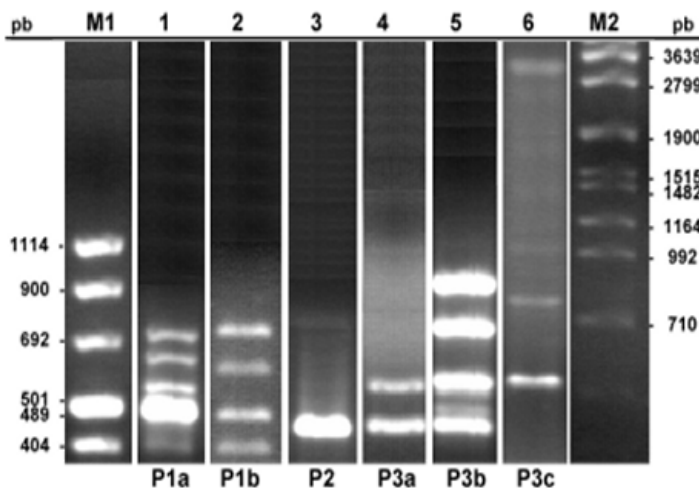


Figura 27. Resultados de la amplificación con TR7 y TR8. Carreras M1 y M2: marcadores VIII y VII, respectivamente. Carreras 1 a 6: ejemplo de los subgrupos obtenidos con los diferentes aislados; 1: P1a; 2: P1b; 3: P2; 4: P3a; 5: P3b; 6: P3c.

El grado de similitud entre aislados incluidos en el mismo, o en diferentes patrones, oscilaba entre el 67,5% y el 100% (vgr. P1) y entre el 0% (vgr. P1 frente a P2) y el 75% (vgr. P2 frente a P3a), respectivamente. De modo que los aislados incluidos en P3b, son los únicos que mantienen relaciones de homología con todos los demás patrones (tabla 32, figura 28).

Tabla 32. Grado de similitud entre los patrones obtenidos con TR₇ y TR₈

P1a	1.000					
P1b	0.675	1.000				
P2	0.000	0.000	1.000			
P3a	0.000	0.000	0.750	1.000		
P3b	0.400	0.450	0.500	0.800	1.000	
P3c	0.000	0.000	0.000	0.667	0.500	1.000
	P1a	P1b	P2	P3a	P3b	P3c

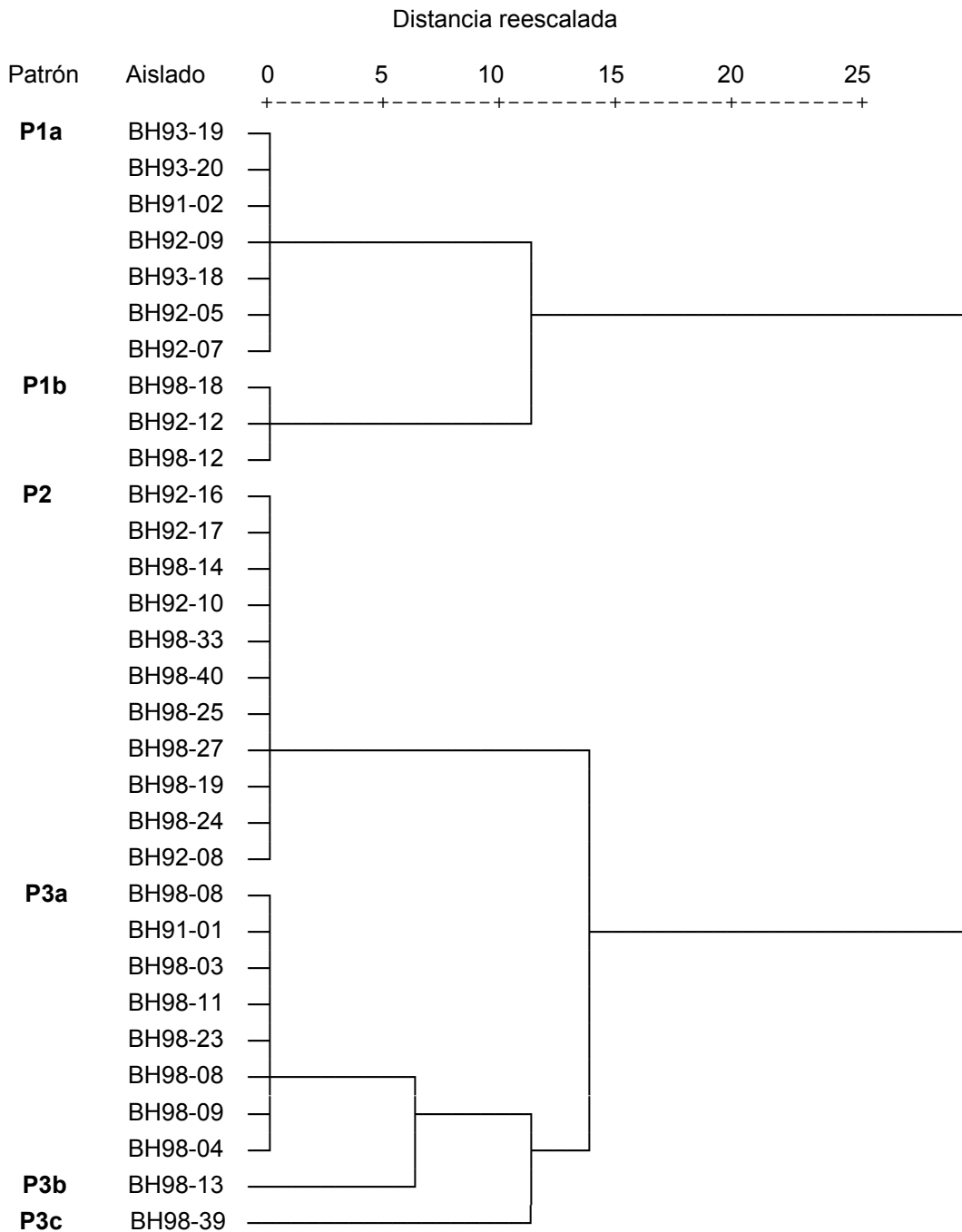


Figura 28. Dendrograma de homología de los aislados axénicos según protocolo de Init

Los aislados incluidos en el patrón P1, se distribuyeron en dos subgrupos P1a y P1b, entre los que el índice de homología fue del 67,5%. Se caracterizan por presentar un fragmento mayoritario de 500 pb, lo que relaciona P1 con los patrones 2 y 4 descritos por Init *et al.* (1999). Los pacientes eran todos sintomáticos, el 50% de los ellos con diagnóstico de diarrea aguda. (tabla 33).

Tabla 33. Características y aislados de los patrones y subgrupos obtenidos

Patrón	Subgrupo	Características de los fragmentos		Aislados
		Mayoritario	Otros	
P1	P1a	500	400, 525, 650, 700	BH91-02 BH92-05, 07, 09 BH93-18, 19, 20
	P1b	500	400, 600, 700	BH92-12 BH98-12, 18
P2		450		BH92-08, 10, 16,17 BH98-14, 19, 24,25,27, 33, 40
P3	P3a	450, 550		BH91-01 BH98-03, 04, 08, 09, 15, 23 BH99-08
	P3b	450, 500, 550	700, 900	BH98-13
	P3c	550	850	BH98-39

En P2 se incluyeron 11 aislados, nueve procedentes de pacientes con diarrea aguda (81,8%) y los restantes con diarrea crónica. Todos los aislados presentaron el mismo patrón, con un fragmento único de 450 pb (tabla 33). En el patrón P3 se definieron tres subgrupos que compartían un fragmento mayoritario de 550 pb. Cabe destacar que el patrón P3b tuvo como bandas más frecuentes las de 450, 500 y 550 pb, lo que lo convertiría, en cuanto a los fragmentos mayoritarios, en un patrón mixto de P3a + P3c. De los diez aislados incluidos en este patrón, siete estaban relacionados con procesos diarreicos agudos y los restantes con diarrea crónica (tabla 33).

El análisis estadístico demostró la ausencia de asociaciones significativas entre la pertenencia a un patrón y el tipo de proceso diarreico.

Tampoco encontramos equivalencias entre nuestros resultados y los patrones descritos por Init *et al.* (1999), excepto la coincidencia del fragmento mayoritario de 500 pb de nuestro P1 con los patrones 2 y 4, de estos autores.

4.5.2. Patrones obtenidos en los aislados no axénicos

La amplificación de los 20 aislados no axénicos permitió la obtención de dos a ocho fragmentos, con tamaños relativos comprendidos entre 300 y 1500 pb. El análisis de los resultados demostró la existencia de diferencias importantes en el tamaño y número de bandas, respecto de las obtenidas con los aislados axénicos (figura 29).

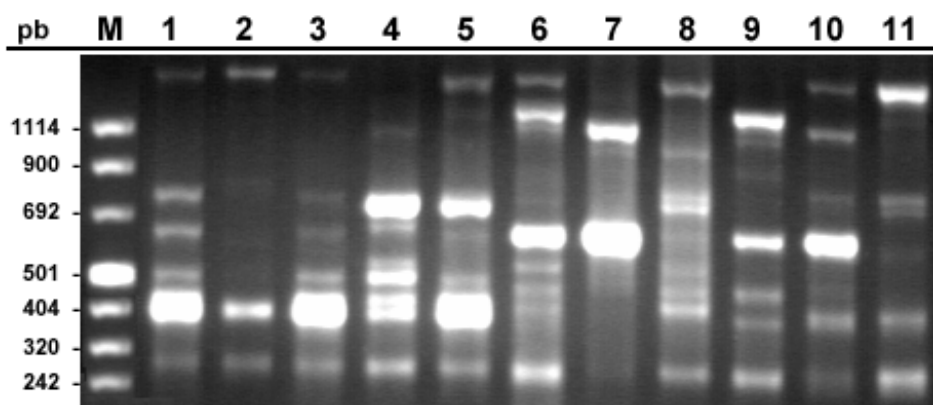


Figura 29. Resultados de la amplificación con TR₇ y TR₈. Carrera M1: marcador VIII, a su izquierda el tamaño de los fragmentos en pares de bases. Carreras 1 a 11: ejemplo de los patrones obtenidos con diferentes aislados monoxénicos con *Enterococcus faecalis*; 1: BH98-32w; 2: BH98-31w; 3: BH98-30w; 4: BH98-28w; 5: BH98-26w; 6: BH99-12w; 7: BH98-20w; 8: BH98-16w; 9: BH98-06w; 10: BH98-05w; 11: BH98-01w.

Tras analizar todas las bandas se obtuvo una matriz de distancias que permitió diferenciar 14 patrones, doce de los cuales eran exclusivos de un aislado. Los índices de homología entre los patrones eran tan bajos que no se pudieron establecer relaciones entre la mayoría de ellos. A partir de estos datos deducimos que el análisis realizado a partir de cepas xénicas, tal y como se muestra en el dendograma de homología (figura 30), no discrimina bien entre el ADN bacteriano y el de *B. hominis*.

Los aislados procedían de pacientes sintomáticos, con un mayor porcentaje de diarreas agudas (16/20), sin que se encontraran relaciones estadísticamente significativas, entre un patrón y diarrea aguda o crónica. Tampoco se encontraron correspondencias entre estos patrones y los publicados por Init *et al.* (1999).

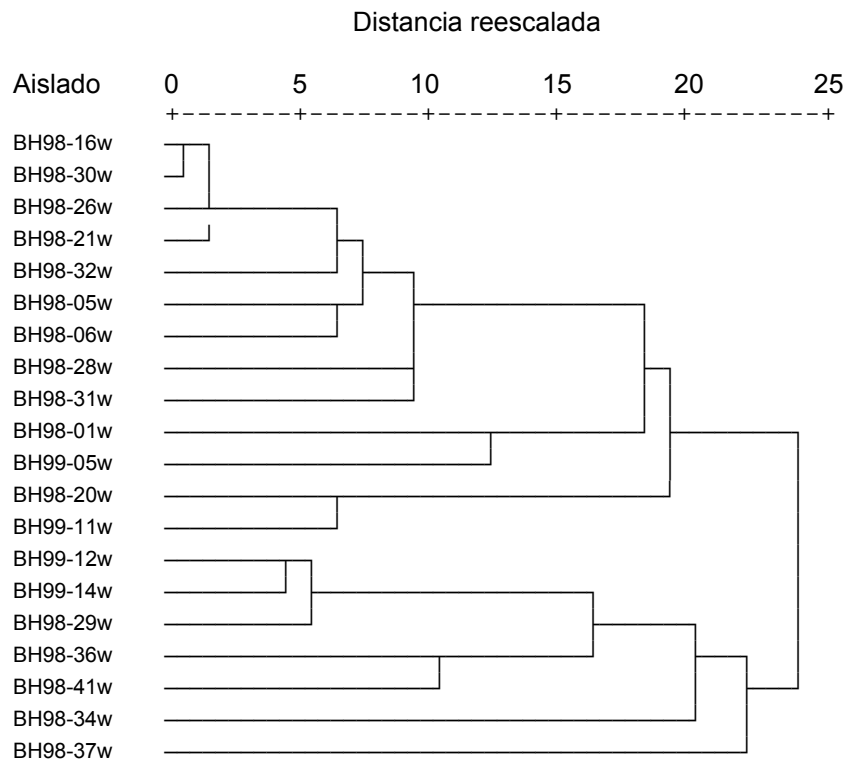


Figura 30. Dendrograma de homología obtenido con los aislados no axénicos

4. 6. Estudio de poblaciones isoenzimáticas en aislados de *B. hominis*

La totalidad de los aislados axénicos mostraron actividad frente a los ocho sistemas enzimáticos ensayados: enzima málico (EM), glutámico-oxalacetato transaminasa (GOT), glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), glucosa fosfato isomerasa (GPI), hexoquinasa (HK), malato deshidrogenasa (MDH), 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) y fosfoglucomutasa (PGM). En los enzimas EM, GOT, GPI, HK, 6PGDH y PGM todos los aislados mostraron una única banda con una movilidad relativa (MR) de 100; mientras que en el caso de G6PDH todos ellos presentaron dos bandas con MR de 70 y 100. Sin embargo, en la actividad MDH se observaron tres bandas, dos de

ellas comunes (MR: 70 y 100) y otras con MR 38, 55 o 60 que fueron detectadas en el 12,9%, 64,5% y 22,6% de los aislados, respectivamente (tabla 34, figura 31).

Tabla 34. Movilidad electroforética relativa de los diferentes enzimas obtenida para cada aislado de *B. hominis*.

Aislado	Actividad enzimática							
	EM	GOT	G6PDH	GPI	HK	MDH	6PGDH	PGM
BH98-03	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH98-04	100	100	70, 100	100	100	60, 70, 100	100	100
BH98-08	100	100	70, 100	100	100	60, 70, 100	100	100
BH98-09	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH98-12	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH98-13	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH98-14	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH98-15	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH98-18	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH98-19	100	100	70, 100	100	100	38, 70, 100	100	100
BH98-23	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH98-24	100	100	70, 100	100	100	38, 70, 100	100	100
BH98-25	100	100	70, 100	100	100	38, 70, 100	100	100
BH98-27	100	100	70, 100	100	100	38, 70, 100	100	100
BH98-33	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH98-39	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH98-40	100	100	70, 100	100	100	60, 70, 100	100	100
BH99-08	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH91-01	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH91-02	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH92-05	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH92-07	100	100	70, 100	100	100	60, 70, 100	100	100
BH92-08	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH92-09	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH92-10	100	100	70, 100	100	100	60, 70, 100	100	100
BH92-12	100	100	70, 100	100	100	60, 70, 100	100	100

BH92-16	100	100	70, 100	100	100	60, 70, 100	100	100
BH92-17	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH93-18	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH93-19	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100
BH93-20	100	100	70, 100	100	100	55, 70, 100	100	100

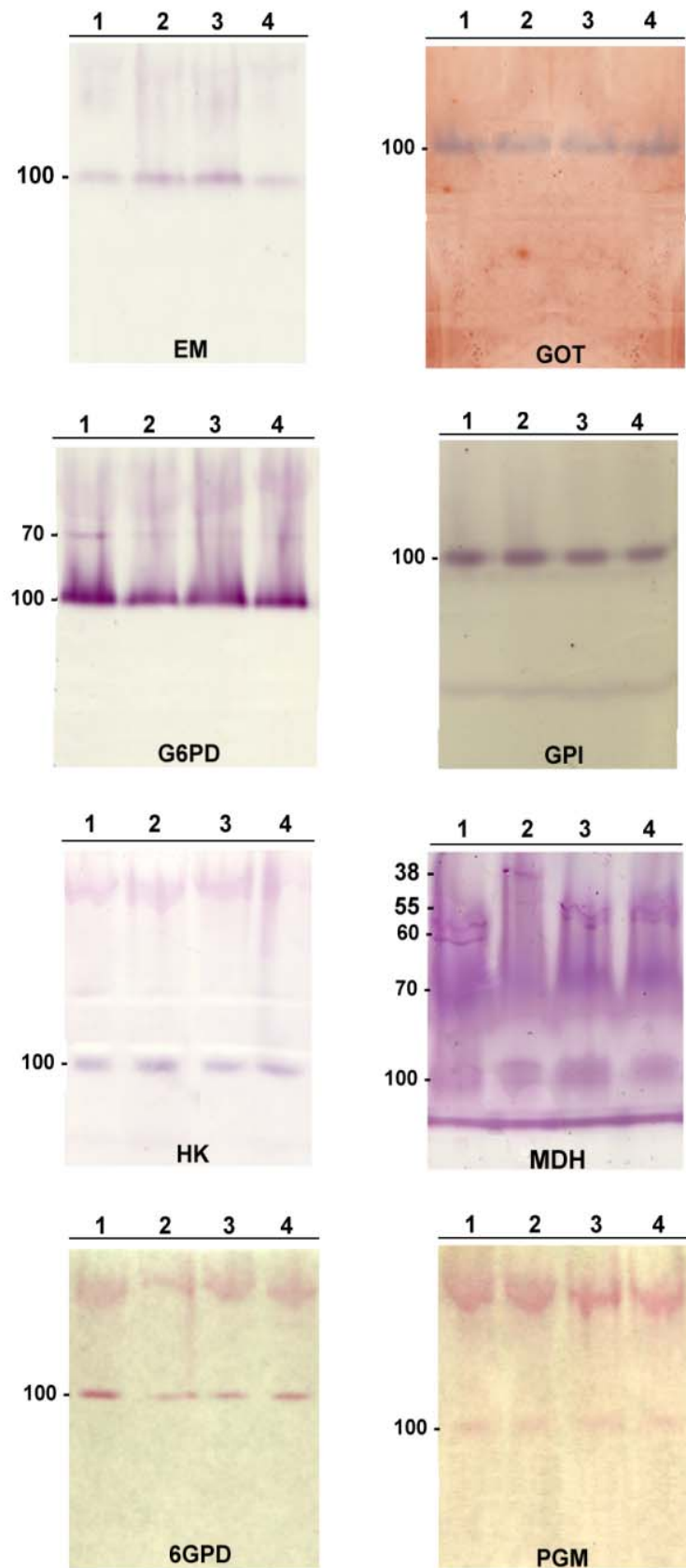


Figura 31. Bandas detectadas en cada una de las actividades enzimáticas en estudio.

La movilidad electroforética relativa de las bandas detectadas, permitió definir tres patrones distintos (A, B y C) para la actividad MDH y uno (A) para cada uno de los restantes enzimas (tabla 35).

Tabla 35. Patrones enzimáticos

Actividad	Movilidad relativa (MR)	Patrón
EM	100	A
GOT	100	A
G6PDH	70, 100	A
GPI	100	A
HK	100	A
MDH	38, 70, 100	A
	55, 70, 100	B
	60, 70, 100	C
6PGDH	100	A
PGM	100	A

La combinación de los perfiles demostró la existencia de tres poblaciones enzimáticas o zimodemas, denominados Z1, Z2 y Z3, con homologías intra e inter-poblacionales del 100% y del 87,5% (Z1 frente a Z2 y Z3, y viceversa), respectivamente (tabla 36, figura 32).

Tabla 36. Poblaciones isoenzimáticas

Zimodema	Patrones isoenzimáticos								Nº de aislados
	EM	GOT	G6PDH	GPI	HK	MDH	6PGDH	PGM	
Z1	A	A	A	A	A	B	A	A	20
Z2	A	A	A	A	A	A	A	A	4
Z3	A	A	A	A	A	C	A	A	7

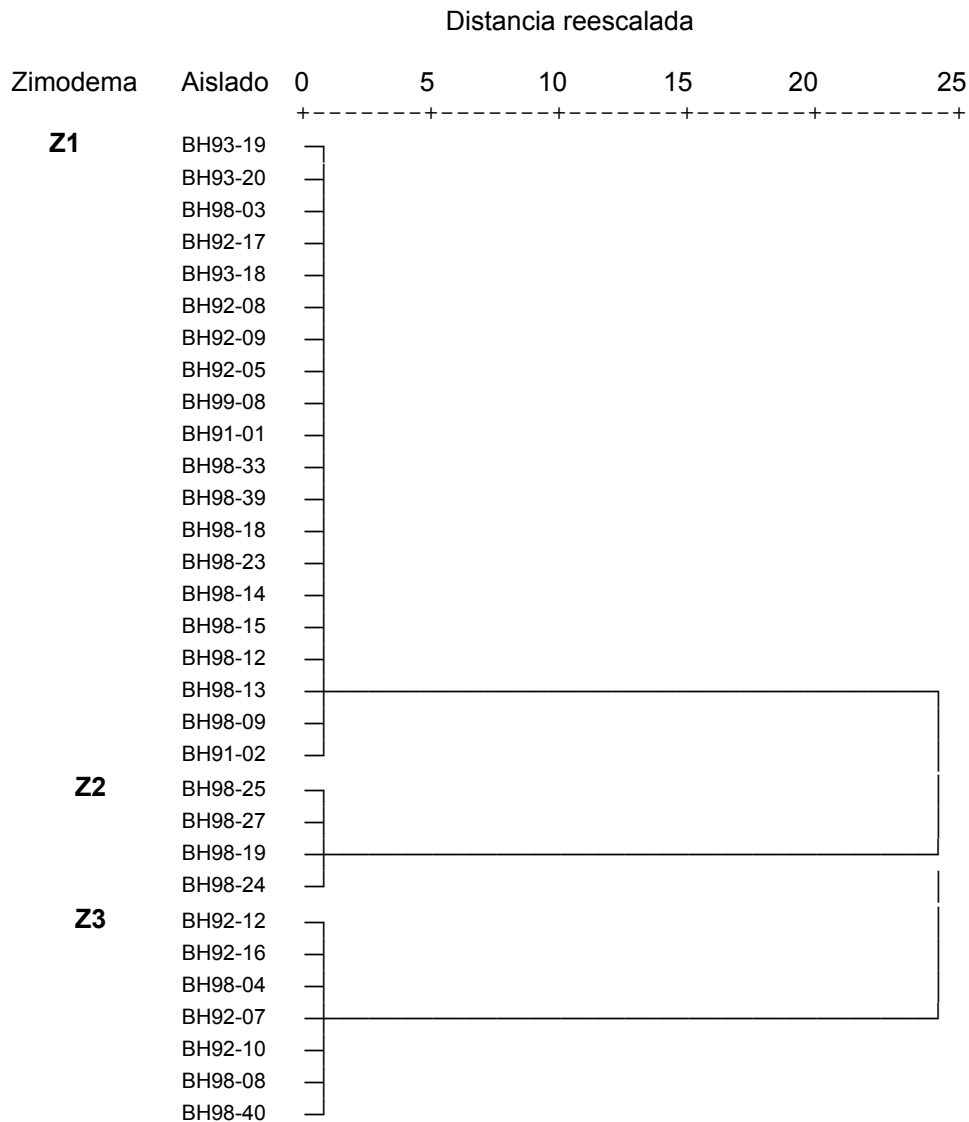


Figura 32. Dendrograma de homología obtenido del análisis de las actividades enzimáticas

Todos los aislados incluidos en esta fase procedían de pacientes sintomáticos. El zimodema Z1 fue el más frecuente al incluir el 64,5% de los aislados; 13 de los cuales estaban asociados a procesos diarreicos agudos y siete a crónicos. Todos los aislados del zimodema Z2 habían sido obtenidos de diarreas agudas; mientras que en el caso de Z3, el número de aislados relacionados con diarreas agudas o crónicas fue de tres y cuatro, respectivamente.

El análisis estadístico no mostró asociaciones significativas entre las poblaciones enzimáticas y el tipo de diarrea.

5. Discusión

5.1. Sobre la prevalencia y la obtención de muestras

El análisis microscópico reveló una prevalencia del 21,5%; superior a los datos reflejados en nuestro país por otros autores (Pena *et al.*, 1992; Tórtola *et al.*, 1994); y coincidentes con los publicados en el mismo área geográfica por Borrás *et al.* (1991b y 1991c) y Carbajal *et al.* (1997b). La parasitación era más común en los adultos que en los niños con una tasa ligeramente superior en los varones, aunque sin diferencias significativas. En estudios previos se había reseñado una incidencia levemente superior en el sexo femenino (García *et al.*, 1984; Sunn *et al.*, 1989; Senay y MacPherson, 1990; Nimri, 1993; Carbajal *et al.*, 1997b).

Para obtener suficiente biomasa y realizar los pertinentes estudios, se cultivaron las muestras en medio bifásico de Boeck-Drbohlav (Zierdt *et al.*, 1967) y se aplicó el procedimiento de axenización que combina la adición secuencial de antibióticos con la purificación en gradiente de ficoll-ácido metrizoico, descrito por Zierdt y Williams (1974), Zierdt (1991a) y Lanuza *et al.* (1997a). Se consiguió un éxito en la axenización del 47,4%. Conviene resaltar la difícil adaptación de *B. hominis* al cultivo *in vitro*, y lo costoso de su axenización.

El objetivo era cultivar y axenizar cepas de *Blastocystis hominis* de muestras fecales de pacientes con síndromes diarreicos, así como de portadores sanos; finalmente el 98,5% de los aislados estudiados fueron obtenidos de pacientes sintomáticos, preferentemente con recuentos superiores a 5 células por campo de 40x. Conseguir aislados procedentes de pacientes asintomáticos resultó complicado; en parte porque la población de portadores estudiada fue sensiblemente inferior a la de sintomáticos, y por otro lado porque no siempre se alcanzaba el inóculo mínimo necesario para el crecimiento en cultivo.

Las condiciones requeridas para la axenización son extremadamente estresantes para los parásitos, lo que explicaría el que algunas cepas no lleguen a axenizarse. En estudios realizados con *E.*

histolytica, se destaca la dificultad encontrada en la axenización de cepas no-invasivas (Mirelman *et al.*, 1986a). La capacidad de sobrevivir en ausencia de bacterias, según Mirelman *et al.* (1986b) y Andrews *et al.* (1990) puede venir acompañada de una mayor virulencia. Es posible que esto ocurra en *B. hominis*, y explicaría en parte las dificultades de axenización de los aislados procedentes de portadores.

5.2. A propósito de los análisis de RFLP del gen del ARN-16S

El ADN ribosomal es una familia multigénica con secuencias repetidas en tándem, cuya evolución se realiza mediante cambios mutacionales lo que la convierte en una secuencia altamente conservada (Gasser, 1999). El análisis del gen que codifica el ARN de la subunidad menor ribosomal (ssADNr) en *B. hominis*, ha sido utilizado de forma extensiva en estudios filogenéticos (Arisue *et al.*, 2002; Noël *et al.*, 2003) mediante diversas técnicas, una de ellas el estudio del polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP).

Clark (1997) examinó la secuencia de genes de la ssARNr de 30 aislados de *B. hominis* usando el análisis de RFLP con 11 restrictasas, previa amplificación por PCR. Con dos de las restrictasas se obtuvo el mismo patrón en todos los aislados, lo que demuestra la necesidad de buscar dianas y enzimas adecuados para que este método resulte útil (Gasser, 1999; Hoevers *et al.*, 2000). El análisis filogenético se resumió en un dendograma que mostró la existencia de siete ribodemas (I a VII) repartidos en dos líneas principales, entre las que la divergencia era del 7%.

Este trabajo de Clark (1997) es un referente y sugiere que la diversidad genética de *B. hominis*, ampliamente demostrada, puede ser la responsable de las discrepancias acerca de si produce enfermedad en humanos o no; pero de este estudio, además del número de variantes detectadas, cabe destacar el importante grado de divergencia existente entre algunos aislados.

Siguiendo el protocolo descrito por Clark, en nuestro estudio detectamos seis ribodemas diferentes (C1 a C6), tres de los cuales, C3, C5 y C6 coincidían con los ribodemas de Clark III, I y VI, respectivamente. Los ribodemas se encontraban distribuidos en dos ramas bien diferenciadas, con un grado de divergencia entre ellas del 34%, superior al descrito por Clark.

Coincidimos con otros autores en que no existen variaciones genéticas motivadas por la localización geográfica, ya que hemos encontrado que nuestro ribodema C5 (I de Clark) es homólogo al descrito en el estudio de Hoevers *et al.* (2000) como H1, donde se incluyen aislados procedentes de Papua Nueva Guinea y de Méjico. El grupo de Hoevers realizó este análisis de RFLP de la ssARNr, con aislados de *B. hominis* de hospedadores procedentes de zonas geográficas distintas, sin encontrar asociación entre un genotipo y una región determinada.

Destacamos la necesidad de describir nuevos ribodemas a los publicados por Clark, ya que de los seis genotipos que obtuvimos, tres son de nueva descripción. Datos similares son referidos por Yoshikawa *et al.* (2000), quienes utilizando la técnica de *riboprinting*, distinguen entre cuatro subtipos, de los cuales sólo dos habían sido previamente descritos.

Kaneda *et al.* (2001), refieren resultados similares cuando reproducen, con tres de las restrictasas, el protocolo de Clark en 64 aislados humanos de población sintomática y asintomática; estableciendo correlación estadística entre la pertenencia a los ribodemas I, III y VI y la aparición de síntomas. Este grupo mantiene la nomenclatura de Clark y a los siete ribodemas ya descritos añade el VIII y el IX. Sus ribodemas I, III y VI, se corresponden con los que hemos descrito como C5, C3 y C6, respectivamente. El genotipo más frecuente fue el II con 23 cepas, 21 de las cuales procedían de población asintomática. En nuestro estudio no se detectó este genotipo, probablemente porque analizamos un solo portador. Tampoco coincidimos en el manejo estadístico de los datos realizado por estos autores, ya que la correlación se obtiene al plantear como significativa

la pertenencia a cualquiera de los tres ribodemas en conjunto (I, III y VI), pero analizados separadamente no existe correlación entre un ribodema en concreto y la aparición de síntomas.

Ho *et al.* (2001) utilizan los mismos cebadores de Clark (1997) en 13 aislados, consiguiendo en todos ellos un amplicón de 1.800 pb, de inferior tamaño al obtenido en nuestro estudio con 2.540 pb. Los aislados eran de procedencia humana y animal, y se diferenciaron en siete ribodemas (R1 a R7). Coincidimos en dos de los genotipos descritos por el grupo de Ho, R2 que se corresponde con nuestro C5, asociado con diarrea crónica, y el R3 con el C3, relacionado con diarrea aguda. El genotipo R3 lo comparten cepas de origen humano pero también aislados de rata y de cobaya; lo que refuerza la hipótesis del posible origen zoonótico de la infección. El ensayo les permitió diferenciar entre especies de *Blastocystis* originarias de distintos hospedadores, pero sin detectar variación intraespecífica; es probable que por el escaso número de aislados estudiados procedentes de una misma especie animal.

Arisue *et al.* (2002) se basan en el *riboprinting* diseñado por Clark y construyen un árbol filogenético con siete genotipos, una vez examinadas las secuencias de 40 aislados de *B. hominis*. Buscan en estas secuencias las dianas de los enzimas de restricción utilizados por Clark y encuentran semejanzas en cuatro de los siete ribodemas, el I, II, III y VI; que se corresponden con algunos de los descritos en nuestro trabajo; en concreto con el C5 (I), C3 (III) y C6 (VI). De su estudio se concluye que con las mismas secuencias se obtienen los mismos ribodemas, pero que la pertenencia a un mismo ribodema, no implica que las secuencias sean iguales; confirmando la fiabilidad de la secuenciación, frente a otras técnicas, en el estudio de la diversidad genética.

Es evidente que la secuenciación aporta una información completa, pero presenta el inconveniente de que no permite extraer conclusiones de una forma rápida (Gasser, 1999). Las diferencias entre

patrones de RFLP, por el contrario, se pueden observar directamente en el gel.

El análisis estadístico individual de los diferentes perfiles, únicamente estableció asociación entre la asignación al perfil CH1 y la presentación de un cuadro de diarrea crónica; fue necesaria la combinación de los resultados de las tres actividades enzimáticas para encontrar significación estadística entre procesos de diarrea aguda y la inclusión en el ribodema C3, y la pertenencia al ribodema C5 con la presentación de cuadros de diarrea crónica. Nuestros datos refuerzan la hipótesis de Clark, afirmando que las diferencias genéticas se pueden correlacionar con diferencias en la patogenicidad; siendo el primer estudio que demuestra esta posibilidad con significación estadística.

Otra parte del estudio del gen de la ssARNr se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Böhm-Gloning *et al.* (1997). Este grupo amplifica sólo una parte del gen utilizando cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia de *B. hominis* publicada por Johnson *et al.* (1989). Obtienen dos amplicones diferentes, uno de 850 pb, otro de 1,1 Kpb y cinco cepas en las que se detectaron los dos amplicones simultáneamente. Una vez tratados los productos de amplificación con las restrictasas (Alu I, Hinf I y Rsa I), se analizaron los patrones de bandas y las cepas se distribuyeron en cinco subgrupos (I a V), ninguno de los cuales estaba asociado significativamente con enfermedad intestinal. En este estudio se detectaron patrones mixtos, cinco aislados coinfectados con los subgrupos II y III, y tres muestras que contenían el subgrupo I y el II.

Hoevers *et al.* (2000) sugieren que la presencia de patrones mixtos se debe a la coexistencia en el tracto intestinal de un mismo hospedador, de múltiples parásitos con genotipos diferentes; o bien, que los genes en tándem, responsables de codificar la ssARNr, posean diferente secuencia nucleotídica, dando lugar a diferencias en el tamaño de los amplicones y de los patrones de RFLP obtenidos.

Cuando aplicamos este protocolo a nuestros aislados, obtuvimos en todos los casos un amplicón de 1,1 Kpb, al que tratamos con los enzimas Alu I, Hinf I y Rsa I, diferenciando siete ribodemas (B1a B7) con relaciones de homología entre ellos, que oscilaron entre el 21,7 y el 88 %. A diferencia del grupo de Böhm, no detectamos ningún patrón mixto. Hemos encontrado concordancia entre los ribodemas B5, B1, B6 y B7, con los descritos previamente como III, IV y V (en este último se agruparían B6 y B7), respectivamente. Se aplicó el test Chi-cuadrado corregido por Yates, para valorar asociaciones significativas, y se encontró correlación entre la pertenencia al ribodema B1 y la presentación de un cuadro de diarrea aguda.

Cuando analizamos de forma conjunta los ribodemas obtenidos a partir de los 51 aislados estudiados, una vez aplicados ambos protocolos (Clark, 1997; Böhm-Gloning *et al.*, 1997), obtuvimos 5 ribodemas (R1a R5).

La distribución del análisis conjunto se asemeja en un 94,1 % a la que describimos como (C1 a C6) protocolo de Clark; y tan sólo en un 39,2 % a la de Böhm-Gloning *et al.* (B1a B7). El protocolo de Clark discrimina mejor ya que analiza la secuencia completa del gen y no sólo una parte, como ocurre en el estudio de Böhm. El coeficiente de homología encontrado entre genotipos distintos osciló entre el 22,6 y el 67,7 %. Se encontró correlación estadística entre la pertenencia a R2, y la presentación de un cuadro de diarrea aguda.

Coincidimos en lo manifestado por Clark (2000), según el cual las variaciones genéticas crípticas explicadas fuera de un contexto clínico, no aportan información suficientemente relevante.

5.3. Acerca de la variabilidad obtenida según protocolo de Init

El análisis utiliza una técnica que recuerda a los RAPD (*Random Amplification of Polimorphic DNA*) para obtener patrones que detecten

diferencias entre cepas. Yoshikawa *et al.* (1996c), utilizan la técnica del RAPD para diferenciar aislados de *B. hominis* de origen humano, de cepas procedentes de otros hospedadores. A partir de estos resultados (Yoshikawa *et al.*, 1998), desarrollaron cebadores específicos de subtipo que sí sirvieron para diferenciar entre especies y cepas.

Init *et al.* (1999) son los primeros en estudiar en *B. hominis* secuencias repetitivas de ADN para diferenciar directamente entre cepas, describiendo cinco patrones en los 20 aislados estudiados. La interpretación de los perfiles resulta incompleta ya que se abstienen de valorar algunas de las bandas detectadas en las muestras xénicas, argumentando que puedan ser de origen bacteriano. En este análisis utilizan los cebadores diseñados por Riley *et al.* (1991) a partir del ADN genómico de *T. vaginalis*, los cuales reconocen secuencias de ADN cortas, repetitivas y ubicuas; dando lugar a perfiles que recuerdan a los minisatélites. La especificidad de los cebadores, determinada por los nucleótidos localizados en el extremo 3' de los cebadores, permite amplificar el genoma de un gran número de eucariotas inferiores.

De los cinco patrones descritos por este grupo, únicamente encontramos cepas axénicas en el patrón 1, todas ellas procedentes de individuos sanos y con el mismo origen geográfico. Los patrones 2 y 4, obtenidos tanto en pacientes sintomáticos como en asintomáticos, comparten un producto de 500 pb y dos fragmentos de 750 y 1.500 pb, que estos autores relacionan con patogenicidad; al igual que el fragmento de 280 pb localizado también en los patrones 3 y 5, asociado con la presentación de un cuadro de diarrea crónica.

Nuestros datos no coinciden con los de Init, ya que una vez amplificadas la totalidad de las cepas, se obtuvo un complejo número de patrones con diferencias importantes entre aislados xénicos y axénicos. Se entendió que las diferencias eran debidas a la amplificación de secuencias

de la microflora bacteriana acompañante, y que los cebadores no discriminaban suficientemente entre el ADN bacteriano y el de *B. hominis*.

Es por ello que decidimos únicamente valorar los datos obtenidos con las 31 cepas axénicas en los que distinguimos 3 patrones (P1 a P3), en uno de ellos (P1) encontramos una banda en común con las de Init, la de 500 pb.

El grupo de Init incluyó en el patrón 1 las cuatro cepas axénicas analizadas, y aunque en el trabajo se afirma que la afinidad viene dada por proceder de la misma localización geográfica, consideramos que es la ausencia de bacterias la responsable de su similitud. El análisis de RFLP ya demostró que no existía relación entre diferencias genéticas y origen geográfico. No se encontró significación estadística entre la pertenencia a un patrón y un cuadro clínico determinado.

El protocolo diseñado por Riley *et al.* (1991), ha demostrado la existencia de variabilidad genética en *B. hominis* a condición de que las cepas se encuentren en cultivo puro, lo cual limita su utilización.

5.4. A propósito del estudio isoenzimático

El análisis isoenzimático es una herramienta comúnmente utilizada en parasitología para la diferenciación de especies o de cepas (Sargeant y Williams, 1979; Selander *et al.*, 1986; Mirelman *et al.*, 1986a), y su aplicación en *B. hominis* ha revelado la existencia de polimorfismo enzimático en este organismo (Mansour *et al.*, 1995; Carbajal, 1996; Gericke *et al.*, 1997).

En el presente estudio se analizaron ocho actividades enzimáticas en 31 aislados de *B. hominis*, todas ellas descritas en otras células eucariotas como enzimas citosólicos (GPI, G6PDH, 6PGDH, PGM, HK) o mitocondriales (MDH, GOT, EM), según Harris y Hopkinson (1976).

Se obtuvo una única banda en todas las actividades ensayadas a excepción de la G6PDH y la MDH, en las que se detectaron dos y tres bandas, respectivamente. La presencia de dos o más bandas se interpreta como codificación poligénica (Harris y Hopkinson, 1976; Andrews *et al.*, 1999).

Los enzimas estaban presentes en todas las cepas, las cuales compartieron idénticos patrones electroforéticos en siete de los ocho enzimas ensayados, y únicamente se detectó la presencia de variantes isoenzimáticas en la MDH. La diversidad quedó demostrada tras repetir todas las detecciones, y de esa forma tratar de evitar posibles variaciones inter-ensayo. No hay que olvidar que en poblaciones enzimáticas débilmente polimórficas, como las presentadas en este estudio, se pueden dar problemas de interpretación debidos a diferencias en la intensidad de la tinción histoquímica, resolución imperfecta, etc.

La MDH presenta una estructura cuaternaria dimérica, codificada por dos loci (Andrews *et al.*, 1999), por lo que en organismos heterocigotos diploides, es relativamente frecuente la aparición de triple bandeo. La aparición de diferencias en la migración de la banda de menor movilidad electroforética relativa, permitió diferenciar isoenzimas entre los aislados y asignarlos en tres zimodemas diferentes (Z1, Z2, Z3). No se encontró asociación significativa, entre la adscripción a un zimodema determinado y la presentación de un cuadro de diarrea aguda o crónica.

Coincidimos en la escasa heterogeneidad demostrada por *B. hominis* en los ensayos enzimáticos, ya descrita por Mansour *et al.* (1995) y Carbajal (1996); quienes describen dos y tres zimodemas respectivamente. Es importante destacar que estos ensayos infravaloran la diversidad, ya que no todas las sustituciones aminoacídicas que se producen en las proteínas tienen efecto en la carga, y por lo tanto en la migración. Gericke *et al.* (1996), por el contrario, describen 98 variantes en 119 aislados xénicos; según Monis (2002) no se pueden realizar estas técnicas con muestras que mezclen organismos genéticamente distintos. Nuestro estudio también incide en la necesidad de

axenizar los cultivos para realizar estos ensayos, y así evitar interferencias con los enzimas de la flora bacteriana acompañante.

Durante el análisis de los resultados, se detectó que una de las cepas procedentes de colección, la BH92-05 incluida en el zimodema Z1 y relacionada con un cuadro de diarrea crónica, había sufrido un cambio de patrón en el enzima GPI. Carbajal (1996) detecta en esta cepa, una movilidad electroforética relativa de 88 (MR), y en nuestro estudio presentaba MR 100, similar al resto de aislados. Fenómenos similares ya han sido descritos por Mirelman *et al.* (1986a y 1986b) en una cepa de *E. histolytica*, perteneciente a un zimodema no patógeno, en la que detectaron su conversión a zimodema patógeno durante el proceso de axenización. Andrews *et al.* (1990) consiguen la reversión al zimodema original, cuando reintroducen la flora bacteriana en el medio de cultivo. Andrews *et al.* (1992) cultivan *G. intestinalis in vitro* e *in vivo*, demostrando que los isoenzimas son caracteres cuyo comportamiento puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo; sugiriendo que se podría producir una alternancia en la expresión de los genes que codifican isoenzimas distintos, o bien la selección de un genotipo específico de una mezcla presente en el original, por las condiciones de crecimiento.

La descripción de tres zimodemas confirma de nuevo la existencia de diversidad intraespecífica en *B. hominis* ya descrita por otros autores (Upcroft *et al.*, 1989; Müller, 1994; Ho *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 1995; Gericke *et al.*, 1997; Carbajal *et al.*, 1997b; Böhm-Gloning *et al.*, 1997; Clark, 1997; Init *et al.*, 1999; Hoevers *et al.*, 2000; Yoshikawa *et al.*, 2000; Kaneda *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2001), y la hipotética existencia de aislados con diferente potencial patogénico (Kukoschke y Müller, 1991; Mansour *et al.*, 1995; Carbajal *et al.*, 1997b; Init *et al.*, 1999; Kaneda *et al.*, 2001); todo ello confirmado en los distintos apartados de este trabajo.

La ventaja que nos ha ofrecido la técnica de electroforesis enzimática multilocus, es la posibilidad de estudiar características fenotípicas de ocho genes simultáneamente; los ensayos que utilizan el ADN generalmente comparan solo un gen completo, o una región determinada de

ese gen. Aunque hay autores que afirman que mientras no se pueda demostrar la independencia de los caracteres estudiados (Monis *et al.*, 2002), el análisis isoenzimático no permitirá una interpretación genética de las bandas que se detecten.

6. Conclusiones

Los resultados anteriormente descritos han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1^a.- Todos los métodos moleculares empleados han demostrado, aunque con desigual capacidad de discriminación, que *B. hominis* es un organismo con marcada heterogeneidad genética.

2^a.- El análisis de la secuencia del ARN ribosomal 16S, mediante técnicas de RFLP, ha detectado variantes asociadas a determinados estados mórbidos. El protocolo que utiliza los cebadores RD₃ y RD₅ es el que ha mostrado un mayor poder de resolución.

3^a.- Consideramos que para poder comparar datos de RFLP de forma efectiva es necesaria la utilización de protocolos normalizados, con cepas de referencia, un panel común de enzimas de restricción y una nomenclatura consensuada.

4^a.- El estudio de secuencias repetitivas utilizando TR₇ y TR₈ resulta eficaz en la detección de variación intraespecífica únicamente en aislados axénicos, lo cual limita su utilización como marcador de diversidad.

5^a.- Las diferencias encontradas en la movilidad del enzima malato deshidrogenasa demostraron la existencia de tres poblaciones isoenzimáticas, sin que ninguna de ellas se asociara con un proceso determinado.

6^a.- La homología encontrada entre nuestros aislados y los genotipos de origen humano y animal descritos en otras áreas geográficas, sustentan la idea del origen zoonótico de la infección y demuestran la ausencia de variaciones genéticas regionales.

Todo lo cual nos demuestra que *B. hominis* es una especie genéticamente heterogénea, y la asociación estadística observada, confirma la existencia de poblaciones con diferente patogenicidad.

7. Bibliografía

- Abe N, Wu Z, Yoshikawa H.** 2003a. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from primates. *Veterinary Parasitology* (113): 321-325.
- Abe N, Wu Z, Yoshikawa H.** 2003b. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from bird by PCR with diagnostic primers and restriction fragment length polymorphism analysis of small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitology Research* (89): 393-396.
- Abd-Alla MD, Wahib AA, Ravdin JI.** 2000. Comparison of antigen-capture ELISA to stool-culture methods for the detection of asymptomatic *Entamoeba* species infection in Kafer Daoud, Egypt. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* (62): 579-582.
- Al-tawil YS, Gilger MA, Gopalakrishna GS, Langston C, Bommer KE.** 1994. Invasive *Blastocystis hominis* infection in a child. *Archives of Pediatrics and Adolescents Medicales* (148): 882-885.
- Amenta M, Dalle ER, Colomba C, Prestileo TS, Di Lorenzo F, Fundaro S, Colomba A, Ferrieri A.** 1999. Intestinal protozoa in HIV-infected patients: effect of rifaximin in *Cryptosporidium parvum* and *Blastocystis hominis* infections. *Journal of Chemotherapy* (11): 391-395.
- Anderson TJC, Su XZ, Bockarie M, Lagog M, Day KP.** 1998. Twelve microsatellite markers for characterization of *Plasmodium falciparum* from finger-prick blood samples. *Parasitology* (119): 113-125.
- Andrews BJ, Mentzoni L, Bjorvatn B.** 1990. Zymodeme conversion of isolates of *Entamoeba histolytica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (84): 63-65.
- Andrews RH, Mayrhofer G, Chilton NB, Boreham PFL, Grimmond TR.** 1992. Changes in allozyme pattern of the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *International Journal for Parasitology* (22): 403-406.
- Andrews RH, Chilton NB.** 1999. Multilocus enzyme electrophoresis: a valuable technique for providing answers to problems in parasite systematics. *International Journal for Parasitology* (29): 213-253.
- Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, Yano TA, Hasegawa M.** 2002. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of Stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *Journal of Eukaryotic Microbiology* (49): 42-53.
- Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H.** 2003. Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitology* (126): 1-9.
- Ayadi A, Dutoit E, Camus D.** 1992. *Blastocystis hominis*: à la recherche d' une maladie, un organisme incompris. *La Presse Médicale* (21): 1677-1679.
- Babb RR, Wagener S.** 1989. *Blastocystis hominis* a potential intestinal pathogen. *Western Journal of Medicine* (151): 518-519.
- Babcock D, Houston R, Kumaki D, Shlim D.** 1985. *Blastocystis hominis* in Kathmandu, Nepal. *The New England Journal of Medicine* (313): 1419.

- Bartolomé R, Tórtola MT, Blanch E, Server T, Nogueiras C.** 1993. *Blastocystis hominis* en pacientes alérgicos. XIV Congreso Nacional de Microbiología. Zaragoza. pp: 165.
- Bird RG, Ellis DS.** 1971. A comparison of the outer layers of *Blastocystis hominis* with the cyst walls of certain common intestinal protozoa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (65): 429.
- Biteau N, Bringaud F, Gibson W, Truc P, Baltz T.** 2000. Characterization of *Trypanozoon* isolates using a repeated coding sequence and microsatellite markers. *Molecular and Biochemical Parasitology* (105): 185-201.
- Boccardo G, De Prisco O, Ettari G, Donato G, Maurino D, Savoia D.** 1996. Infezione protozoaria (*Blastocystis hominis*) concomitante a peritonite da *Pseudomonas sp.* in corso di dialisi peritoneale ambulatoriale continua (CAPD). *Minerva Urologica e Nefrologica* (48): 55-58.
- Böhm-Gloning B, Knobloch J, Walderich B.** 1997. Five subgroups of *Blastocystis hominis* isolates from symptomatic and asymptomatic patients revealed by restriction site analysis of PCR-amplified 16S-like rDNA. *Tropical Medicine and International Health* (2): 771-778.
- Boreham PFL, Upcroft JA, Dunn LA.** 1992. Protein and DNA evidence for two demes of *Blastocystis hominis* from humans. *International Journal for Parasitology* (22): 49-53.
- Boreham PFL, Stenzel DJ.** 1993a. The current status of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Today*. (9): 251.
- Boreham PFL, Stenzel DJ.** 1993b. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology and epizootiology. *Advances in Parasitology* (32): 1-70.
- Boreham RE, Benson S, Stenzel DJ, Boreham PFL.** 1996. *Blastocystis hominis* infection. *The Lancet* (348): 272-273.
- Borrás R, Esteban JG, Carbajal JA, Lanuza A.** 1991a. Identificación de los carbohidratos de superficie de membrana de *Blastocystis hominis*, mediante lectinas marcadas. En: Parasitología en el Sur-Oeste de Europa (*I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidental-Europeas de Parasitología-ICASEP I*) Mas Coma S, Esteban JG, Bargues MA, Valero MV, Galán-Puchades MT (eds) Valencia pp: 137.
- Borrás R, Esteban JG, Carbajal JA, Lanuza A, Alsadi SH.** 1991b. Estudio comparativo de las parasitosis intestinales en dos grupos poblacionales humanos: VIH (+) y VIH(-). En: Parasitología en el Sur-Oeste de Europa (*I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidentales-Europeas de Parasitología-ICASEP I*) Mas Coma S, Esteban JG, Bargues MA, Valero MV, Galán-Puchades MT(eds). Valencia pp: 446.
- Borrás R, Esteban JG, Carbajal JA, Lanuza A, Alsadi SH.** 1991c. Datos preliminares sobre la prevalencia de la blastocystosis humana en el área metropolitana de Valencia (España). En: Parasitología en el Sur-Oeste de Europa (*I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidental-Europeas de Parasitología- ICASEP I*) Mas Coma S, Esteban JG, Bargues MA, Valero MV, Galán-Puchades MT (eds). Valencia pp: 276.

- Borrás R, Esteban JG, Carbajal JA, Lanuza A, Bosch MA, Navarro M. 1994.** Identificación de los carbohidratos de superficie de membrana de *Blastocystis hominis* de origen humano. *VI Congreso Nacional de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Valencia pp: 505.
- Botet JP, Auguet T, Rubiés- Prat J. 1992.** *Blastocystis hominis*: A controversial enteric protozoon. *Clinical Gastroenterology* 14(1): 88.
- Cacciò S, Homan W, Camilli R, Traldi G, Kortbeek T, Pozio E. 2000.** A microsatellite marker reveals population heterogeneity within human and animal genotypes of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology* (120): 237-244.
- Carbajal JA. 1996.** Estudio morfofuncional de *Blastocystis hominis* Brumpt, 1912: evidencias cromosómicas y enzimáticas de la existencia de diferentes poblaciones. Tesis doctoral. Universidad de Valencia pp119.
- Carbajal JA, Villar J, Lanuza MD, Esteban JG, Muñoz C, Borrás R. 1997a.** Significación clínica de la infección por *Blastocystis hominis*: estudio epidemiológico. *Medicina Clínica* (108): 608-612.
- Carbajal JA, Del Castillo L, Lanuza MD, Villar J, Borrás R. 1997b.** Karyotypic diversity among *Blastocystis hominis* isolates. *International Journal for Parasitology* (27): 941-945.
- Carrascosa M, Martínez J, Pérez-Castrillón JL. 1996.** Hemorrhagic Proctosigmoiditis and *Blastocystis hominis* Infection. *Annals of Internal Medicine* (124): 278-279.
- Casemore DP, Armstrong M, Jackson FB. 1984.** Clinical relevance of *Blastocystis hominis*. *The Lancet* (1): 1234.
- Cassidy MF, Stenzel DJ, Boreham PFL. 1994.** Electron microscopy of surface structures of *Blastocystis sp.* from different hosts. *Parasitology Research* (80): 505-511.
- Chen J, Vaudry WL, Kowalewska K, Wenman WM. 1987.** Lack of serum immune response to *Blastocystis hominis*. *The Lancet*: 1021.
- Chen XQ, Singh M, Ho LC, Tan SW, Yap EH. 1999a.** Characterization of protein profiles and cross-reactivity of *Blastocystis* antigens by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis and immunoblot analysis. *Parasitology Research* (85): 343-346.
- Chen XQ, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Yap EH. 1999b.** *In vitro* encystation and excystation of *Blastocystis ratti*. *Parasitology* (118): 151-160.
- Cirioni O, Giacometti A, Drenaggi D, Ancarani F, Scalise G. 1999.** Prevalence and clinical relevance of *Blastocystis hominis* in diverse patient cohorts. *European Journal of Epidemiology* (15): 389-393.
- Clark CG. 1997.** Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* (87): 79-83.
- Clark CG. 2000.** Cryptic genetic variation in parasitic protozoa. *Journal Medical Microbiology* (49): 489-491.

- Clark CG, Diamond LS.** 2002. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clinical Microbiology Reviews* (15): 329-341.
- Clavel Parrilla A, Castillo García FJ, Hernández Ercilla MI, Quílez Cinca J.** 1991. Investigación prospectiva de *Blastocystis hominis* en niños de edad escolar hospitalizados por patología digestiva. En: Parasitología en el Sur-Oeste de Europa (*I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidental-Europeas de Parasitología-ICASEP I*) Mas Coma S, Esteban JG, Bargués MA, Valero MV, Galán-Puchades MT (eds). Valencia pp:401.
- Cohen AN.** 1985. Ketoconazol and Resistant *Blastocystis hominis* Infection. *Annals of Internal Medicine* (103): 480-481.
- Conen D, Gerber A, Dubach UC.** 1987. Prävalenz von *Blastocystis hominis* bei Asylbewerbern. *Deutsche medizinische Wochenschrift* (112): 1477.
- Connolly GMM, Ellis DS, Williams JE, Tovey G, Gazzard BG.** 1991. Use of electron microscopy in examination of faeces and rectal and jejunal biopsy specimens. *Journal Clinical Pathology* (44): 313-316.
- Cook GC.** 1987. Opportunistic Parasitic Infections Associated with the Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS): Parasitology, Clinical Presentation, Diagnosis and Management. *Quarterly Journal of Medicine* (65): 967-983.
- Dagci H, Ustun S, Taner MS, Ersoz G, Karacasu F, Budak S.** 2002. Protozoon infections and intestinal permeability. *Acta tropical* (81): 1-5.
- Dellers EA, Dunn JC, DeSantis P, Aronchick CA.** 1992. Identification of *Blastocystis hominis* by colonic brush cytology. A case-report. *Acta Cytologica* (36): 757-758.
- Deloul AM.** 1993. *Blastocystis hominis*: nouveau parasite pathogène?. *Feuillets de Biologie* (34): 37-40.
- Devera R, Azacon B, Jiménez M.** 1998. *Blastocystis hominis* en pacientes del Hospital Universitario "Ruíz y Páez" de Ciudad Bolívar, Venezuela. *Boletín Chileno de Parasitología* (53): 65-70.
- Devera R, Requena I, Velásquez V, Castillo H, González R.** 1999. Cerdos como reservorios de *Blastocystis* spp. en una comunidad rural del Estado Bolívar, Venezuela. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (17): 422.
- Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM.** 1990. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* (28): 116-121.
- Duda A, Stenzel DJ, Boreham PFL.** 1998. Detection of *Blastocystis* sp. in domestic dog and cats. *Veterinary Parasitology* (76): 9-17.
- Dunn LA, Boreham PFL, Stenzel DJ.** 1989. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *International Journal for Parasitology* (19): 43-56.
- Dunn LA, Boreham PFL.** 1991. The in-vitro activity of drugs against *Blastocystis hominis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (27): 507-516.

- Editorial.** 1991. *Blastocystis hominis*: comensal or pathogen?. *The Lancet* (337): 521-522.
- El Masry NA, Bassily S, Farid Z.** 1988. *Blastocystis hominis*: clinical and therapeutic aspects. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (82): 173.
- Epelde Gonzalo F.** 1996. Síndrome diarreico crónico por *Blastocystis hominis*. *Anales de Medicina Interna* (8): 65-66.
- Fedorko DP, Williams EC, Nelson NA, Mazyck TD, Hanson KL, Cartwright CP.** 2000. Performance of Para-Pak™ ultra ECOFIX™ compared with Para-Pak™ ultra formalin/mercuric chloride-based polyvinyl alcohol for concentration and permanent stained smears of stool parasites. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (37): 37-39.
- Fitch WM, Margoliash E.** 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science* (155): 279-284.
- Fleta Zaragoza J, Clavel Parrilla A, Castillo García FJ, Bueno Lozano M, Sarriá Chueca A.** 1993. *Blastocystis hominis* y dolor abdominal en la infancia. *Anales Españoles de Pediatría* (38): 13-16.
- Fleta Zaragoza J, Bueno Lozano M.** 1996. La infección por *Blastocystis hominis* en el niño. *Pediatría Rural* (16): 259-264.
- Gabriel O.** 1971. Locating enzymes on gels. *Methods in Enzymology* (22): 578-604.
- Galantowicz BB, Illueca MD, Levy J, Rayburn JL, Weinstock DJ.** 1993. Neonatal *Blastocystis hominis* diarrhea. *The Pediatric Infectious Disease Journal* (12): 345-347.
- Gallagher PG, Venglarcik JS.** 1985. *Blastocystis hominis* enteritis. *Pediatric Infectious Disease* (4): 556-557.
- Garavelli PL, Scaglione L.** 1988. *Blastocystis hominis*. *Rivista di Parassitologia* (5): 2-11.
- Garavelli PL, Scaglione L.** 1989a. Blastocystosis. An epidemiological study. *Microbiologica* (12): 349-350.
- Garavelli PL, Libanore M, Scaglione L.** 1989b. La Blastocistosi (Prospezioni tassonomiche e patologiche). *Giornale di Malattie Infettive e Parassitarie* (41): 467-468.
- Garavelli PL, Scaglione L, Rossi MR, Bicocchi R, Libanore M.** 1989c. Blastocystosis in Italy. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* (64): 391-395.
- Garavelli PL, Orsi P, Scaglione L.** 1990a. *Blastocystis hominis* infection during AIDS. *The Lancet* (2): 1364.
- Garavelli PL, Scaglione L, Bicocchi R, Libanore M.** 1990b. Blastocystosis: a new disease in the Acquired Immunodeficiency Syndrome?. *International Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS* (1): 134-135.

- Garavelli PL, Scaglione L, Bicocchi R, Libanore M.** 1991. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *Infection* (19): 185.
- Garavelli PL, Scaglione L, Merighi A, Libanore M.** 1992. Endoscopy of blastocystosis (Zierdt-Garavelli Disease). *Italian Journal of Gastroenterology* (24): 206.
- Garavelli PL, Libanore M.** 1993. *Blastocystis hominis* and blastocystosis (Zierdt-Garavelli disease). *Italian Journal of Gastroenterology* (25): 33-36.
- Garavelli PL, Zierdt CH, Fleisher TA, Liss H, Nagy B.** 1995. Serum antibody detected by fluorescent antibody test in patients with symptomatic *Blastocystis hominis* infection. *Recenti Progressi in Medicina* (86): 398-400.
- Garavelli PL.** 1996. Blastocystosis or Zierdt-Garavelli disease. *La Presse Médicale* (16): 777.
- García LS, Bruckner DA, Clancy MN.** 1984. Clinical relevance of *Blastocystis hominis*. *Lancet* (2): 1233-1234.
- García-Martos P, Benjumeda M.** 1992. *Blastocystis hominis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (10): 421-424.
- García Pascual L, Bartolomé Comas R, Cuenca Luque R, San José Laporte A.** 1988. Enteritis por *Blastocystis hominis*. *Medicina Clínica (Barcelona)* (91): 797.
- Gasser RB.** 1999. PCR-based technology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology* (84): 229-258.
- Gericke AS, Burchard GD, Knoblock J, Walderich B.** 1997. Isoenzyme patterns of *Blastocystis hominis* patient isolates derived from symptomatic and healthy carriers. *Tropical Medicine and International Health* (2): 245-253.
- Ghosh K, Ayyaril M, Nirmala V.** 1998. Acute GVHD involving the gastrointestinal tract and infestation with *Blastocystis hominis* in a patient with chronic myeloid leukaemia following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* (22): 1115-1117.
- Giacometti A, Cirioni O, Fiorentini A, Fortuna M, Scalise G.** 1999. Irritable bowel syndrome in patients with *Blastocystis hominis* infection. *European Journal Clinical of Microbiology and Infectious Diseases* (18): 436-439.
- Grimont PAD.** 1996. "Taxotron package: user's manual" (2nd ed.). *Institut Pasteur, Paris*: 1-48.
- Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ.** 1999. Mini-exon sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology* (118): 375-382.
- Grossman I, Weiss LM, Simon D, Tanowitz HB, Wittner M.** 1992. *Blastocystis hominis* in hospital employees. *The American Journal of Gastroenterology* (87): 729-732.
- Guglielmetti P, Cellesi C, Figura N, Rossolini A.** 1989. Family outbreak of *Blastocystis hominis* associated gastroenteritis. *The Lancet* (2): 1394.

- Guignard S, Arienti H, Freyre L, Lujan H, Rubinstein H.** 2000. Prevalence of enteroparasites in a residence for children in the Córdoba province, Argentina. *European Journal of Epidemiology* (16): 287-293.
- Haldane DJM.** 1988. The role of *Blastocystis hominis* in enteric disease. *The Nova Scotia Medical Journal* (67): 33-34.
- Haresh K, Suresh K, Khairul Anuar A, Saminathan S.** 1999. Isolate resistance of *Blastocystis hominis* to metronidazole. *Tropical Medicine and International Health* (4): 274-277.
- Harms G, Dörner F, Bienzle U, Stark K.** 2002. Infections and diseases after travelling to tropical and subtropical areas. *Deutsche medizinische Wochenschrift* (127): 1748-1753.
- Harris H, Hopkinson DA.** 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. *North Holland Publishing Co. Amsterdam.*
- Herwaldt BL, De Arroyave KR, Wahlquist SP, De Mérida AM, Lopez AS, Juranek DD.** 2001. Multiyear prospective study of intestinal parasitism in a cohort of peace corps volunteers in Guatemala. *Journal of Clinical Microbiology* (39): 34-42.
- Ho LC, Singh M, Suresh G, Ng GC, Yap EH.** 1993. Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitology Research* (79): 614-616.
- Ho LC, Singh M, Suresh K, Ng GC, Yap EH.** 1994. A study of the karyotypic patterns of *Blastocystis hominis* by pulsed-field gradient electrophoresis. *Parasitology Research* (80): 620-622.
- Ho LC, Armugam A, Jeyaseelan K, Yap EH, Singh M.** 2000. *Blastocystis* elongation factor-1 α : genomic organization, taxonomy and phylogenetic relationships. *Parasitology* (121): 135-144.
- Ho LC, Jeyaseelan K, Singh M.** 2001. Use of the elongation factor-1 α gene in a polymerase chain reaction-based restriction-fragment-length polymorphism analysis of genetic heterogeneity among *Blastocystis* species. *Molecular and Biochemical Parasitology* (112): 287-291.
- Hoevers J, Holman P, Logan K, Hommel M, Ashford R, Snowden K.** 2000. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis hominis* isolates from geographically diverse human hosts. *Parasitology Research* (86): 57-61.
- Hollebeke NL, Mayberry LF.** 1994. Taxonomic uncertainty and *Blastocystis* (Protista: Sarcodina). *Parasitology Today* (10): 64.
- Horiki N, Maruyama M, Fujita Y, Yonekura T, Minato S, Kaneda Y.** 1997. Epidemiologic survey of *Blastocystis hominis* infection in Japan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (56): 370-374.
- Horiki N, Kaneda Y, Maruyama M, Fujita Y, Tachibana H.** 1999. Intestinal blockage by carcinoma and *Blastocystis hominis* infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (60): 400-402.

- Hussain R, Jaferi W, Zuberi S, Baqai R, Abrar N, Ahmed A, Zaman V.** 1997. Significantly increased IgG₂ subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patients with irritable bowel syndrome. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (56): 301-306.
- Init I, Mak JW, Lokman Hakim S, Yong HS.** 1999. Strain differences in *Blastocystis* isolates as detected by a single set of polymerase chain reaction primers. *Parasitology Research* (85): 131-134.
- Jacobson RL, Doyle RJ.** 1996. Lectin-parasite interactions. *Parasitology Today* (12): 55-60.
- Jeddy TA, Farrington GH.** 1991. *Blastocystis hominis* complicating ulcerative colitis. *Journal of the Royal Society of Medicine* (84): 623.
- Jensen B, Kepley W, Guarner J, Anderson K, Anderson D, Clairmont J, De L'Aune W, Austin EH, Austin GE.** 2000. Comparison of polyvinyl alcohol fixative with three less hazardous fixatives for detection and identification of intestinal parasites. *Journal of Clinical Microbiology* (38): 1592-1598.
- Jiang JB, He JG.** 1993. Taxonomic status of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Today* (9): 2-3.
- Johnson AM, Thanou A, Boreham PFL, Baverstock PR.** 1989. *Blastocystis hominis*: phylogenetic affinities determined by rRNA sequence comparison. *Experimental Parasitology* (68): 283-288.
- Kain KC, Noble MA, Freeman HJ, Barteluk RL.** 1987. Epidemiology and clinical features associated with *Blastocystis hominis* infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* (8): 235-244.
- Kain K, Noble M.** 1989. *Blastocystis hominis* infection in humans. *Reviews of Infectious Diseases* (11): 508-509.
- Kaneda Y, Horiki N, Cheng XJ, Tachibana H, Tsutsumi Y.** 2000. Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals. *Tokai Journal Experimental Clinical Medicine* (25): 51-56.
- Kaneda Y, Horiki N, Cheng XJ, Fujita Y, Maruyama M, Tachibana H.** 2001. Ribodemes of *Blastocystis hominis* isolated in Japan. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (65): 393-396.
- Keenan TW, Huang CM, Zierdt CH.** 1992. Comparative analysis of lipid composition in axenic strains of *Blastocystis hominis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* (102B): 611-615.
- Keenan TW, Zierdt CH.** 1994. Lipid biosynthesis by axenic strains of *Blastocystis hominis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* (107B): 525-531.
- Keystone JS.** 1995. Editorial: *Blastocystis hominis* and Traveler's Diarrhea. *Clinical Infectious Diseases* (21): 102-103.
- Krech T, Mai Nguyen X, Spicher H.** 1990. *Blastocystis hominis* im stuhl. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* (120): 742-744.

- Kukoschke KG, Necker A, Müller HE.** 1990. Detection of *Blastocystis hominis* by direct microscopy and culture. *European Journal of Clinical Microbiology and Infections Diseases* (9): 305-307.
- Kukoschke KG, Müller HE.** 1991. SDS-PAGE and immunological analysis of different axenic *Blastocystis hominis* strains. *Journal of Medical Microbiology* (35): 35-39.
- Lakhanpal S, Cohen SB, Fleischmann RM.** 1991. Reactive arthritis from *Blastocystis hominis*. *Arthritis and Rheumatism* (34): 251-253.
- Lanuza M^aD.** 1994. Estudio de la estructura antigénica de *Blastocystis hominis*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. 123 pp.
- Lanuza M^aD, Carbajal JA, Borrás R.** 1996. Identification of surface coat carbohydrates in *Blastocystis hominis* by lectin probes. *International Journal for Parasitology* (26): 527-532.
- Lanuza M^a D, Carbajal JA, Villar J, Borrás R.** 1997a. Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. *Parasitology Research* (83): 60-63.
- Lanuza M^aD, Carbajal JA, Villar J, Borrás R.** 1997b. *Blastocystis hominis*, patógeno intestinal. *Anales de Medicina Interna (Madrid)* (14): 490.
- Lanuza M^aD, Carbajal JA, Villar J, Mir A, Borrás R.** 1999. Soluble-protein and antigenic heterogeneity in axenic *Blastocystis hominis* isolates: pathogenic implications. *Parasitology Research* (85): 93-97.
- LeBar WD, Larsen EC, Patel K.** 1985. Afebrile diarrhea and *Blastocystis hominis*. *Annals of Internal Medicine* (103): 306.
- Lee MG, Rawlins SC, Didier M, DeCeulaer K.** 1990. Infective arthritis due to *Blastocystis hominis*. *Annals of the Rheumatic Diseases* (49): 192-193.
- Lee MJ.** 1991. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* (29): 2089.
- Lee MG, Stenzel DJ.** 1999. A survey of *Blastocystis* in domestic chickens. *Parasitology Research* (85): 109-117.
- Levy Y, George J, Shoenfeld Y.** 1996. Severe *Blastocystis hominis* in an elderly man. *Journal of Infection* (33): 57-59.
- Liu C, Vigdorovich V, Kapur V, Abrahamsen MS.** 1999. A random survey of the *Cryptosporidium parvum* genome. *Infection and Immunity* (67): 3960-3969.
- Llibre JM, Tor J, Manterola JM, Carbonell C, Foz M.** 1989. *Blastocystis hominis* chronic diarrhoea in AIDS patients. *The Lancet* (1): 221.
- Lloyd D.** 1996. Obligate anaerobe or not?. *Nature* (381): 121.
- Logar J, Andlovic, Poljsak-Prijatelj M.** 1994. Incidence of *Blastocystis hominis* in patients with diarrhoea. *Journal of Infection* (28): 151-154.

- Long HY, Handschack A, König W, Ambrosch A.** 2001. *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitology Research* (87): 1029-1030.
- Machado Motta MC, Soares MJ, de Souza W.** 1993. Intracellular lectin-binding sites in symbiont-bearing *Crithidia* species. *Parasitology Research* (79): 551-558.
- MacPherson DW, MacQueen WM.** 1994. Morphological diversity of *Blastocystis hominis* in sodium acetate-acetic acid-formalin-preserved stool samples stained with iron hematoxylin. *Journal of Clinical Microbiology* (32): 267-268.
- Mai Nguyen X, Krech T.** 1989. *Blastocystis hominis*, ein parasitärer Durchfallerreger. *Schweizerisch Medizinische Wochenschrift* (119): 457-460.
- Mansour NS, Mikhail EM, El Masry NA, Sabry AG, Mohareb EW.** 1995. Biochemical characterisation of human isolates of *Blastocystis hominis*. *Journal of Medical Microbiology* (42): 304-307.
- Markell EK, Udkow MP.** 1986. *Blastocystis hominis* pathogen or fellow traveler? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (35): 1023-1026.
- Markell EK, Udkow MP.** 1988. Association of *Blastocystis hominis* with human disease. *Journal of Clinical Microbiology* (26): 609-610.
- Markell EK.** 1995. Editorial: Is there any reason to continue treating *Blastocystis* infections?. *Clinical Infectious Diseases* (21): 104-105.
- Martín AM, Canut A, Rodríguez J, Montes I, García JA.** 1992. Epidemiology and clinical significance of *Blastocystis hominis* in different population groups in Salamanca (Spain). *European Journal of Epidemiology* (8): 553-559.
- Matsumoto Y, Yamada M, Yoshida Y.** 1987. Light-microscopical appearance and ultrastructure of *Blastocystis hominis*, an intestinal parasite of man. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene (A-264)*: 379-385.
- Mehlhorn H.** 1988. *Blastocystis hominis*, Brumpt 1912: are there different stages or species?. *Parasitology Research* (74): 393-395.
- Merino JM, Hermida G, Iglesias G, Elvira AI, Álvarez T, González JB.** 2001. Linfocitosis aguda infecciosa asociada a coinfección por *Giardia lamblia* y *Blastocystis hominis*. *Anales Españoles de Pediatría* (54): 518-520.
- Miles MA, Lanham SM, De Souza AA, Póvoa M.** 1980. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (74): 221-237.
- Miller RA, Minshew BH.** 1988. *Blastocystis hominis*: An organism in search of a disease. *Reviews of Infectious Diseases* (10): 930-938.
- Mirelman D, Bracha R, Chayen A.** 1986a. *Entamoeba histolytica*: effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence. *Experimental Parasitology* (62): 142-148.

- Mirelman D, Bracha R, Wexler A, Chayen A.** 1986b. Changes in isoenzyme patterns of a cloned culture of nonpathogenic *Entamoeba histolytica* during axenization. *Infection and Immunity* (54): 827-832.
- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Ng GC, Chen XQ, Yap EH.** 1996. Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitology Research* (82): 439-444.
- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, Ng GC, Yap EH.** 1997. Experimental *Blastocystis hominis* infection in laboratory mice. *Parasitology Research* (83): 319-325.
- Moe KT, Singh M, Gopalakrishnakone P, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, Yap EH.** 1998. Cytopathic effect of *Blastocystis hominis* after intramuscular inoculation into laboratory mice. *Parasitology Research* (84): 450-454.
- Moe KT, Singh M, Howe J, Ho LC, Tan SW, Chen XQ, Yap EH.** 1999. Development of *Blastocystis hominis* cysts into vacuolar forms in vitro. *Parasitology Research* (85): 103-108.
- Mohandas K, Sehgal R, Sud A, Malla N.** 2002. Prevalence of intestinal parasitic pathogens in HIV-seropositive individuals in northern India. *Japanese Journal Infectious Disease* (55): 83-84.
- Molet B, Werler C, Kremer M.** 1981. *Blastocystis hominis*: improved axenic cultivation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (75): 752-753.
- Monis PT, Andrews RH, Saint CP.** 2002. Molecular biology techniques in parasite ecology. *International Journal for Parasitology* (32): 551-562.
- Müller HE.** 1994. Four serologically different groups within the species *Blastocystis hominis* (en rumano). *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene* (280): 403-408.
- Muntean E, Boceat T.** 1989. Observations on four atypical cases of blastocystosis. *Revista de Igiena, Bacteriologia, Virusologia, Parazitologia, Epidemiologia, Pneumoftiziologia* (34): 285-288.
- Murray PR.** 1996. *Clinical Microbiology*. ASM Press.
- Nakamura Y, Hashimoto T, Yoshikawa H, Kamaishi T, Nakamura F, Okamoto K, Hasegawa M.** 1996. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* that contains cytochrome free mitochondria, inferred from the protein phylogeny of elongation factor 1 α . *Molecular and Biochemical Parasitology* (77): 241-245.
- Narkewicz MR, Janoff EN, Sokol RJ, Levin MJ.** 1989. *Blastocystis hominis* gastroenteritis in a hemophiliac with acquired immune deficiency syndrome. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (8): 125-128.
- Nasirudeen AMA, Tan KS, Singh M, Yap EH.** 2001a. Programmed cell death in human intestinal parasite, *Blastocystis hominis*. *Parasitology* (123): 235-246.

- Nasirudeen AMA, Singh M, Yap EH, Tan KS.** 2001b. *Blastocystis hominis*: evidence for caspasa-3-like activity in cells undergoing programmed cell death. *Parasitology Research* (87): 559-565.
- Ng GC, Tan SW.** 1999. Colony growth as a step towards axenization of *Blastocystis* isolates. *Parasitology Research* (85): 678-679.
- Nimri LF.** 1993. Evidence of an epidemic of *Blastocystis hominis* infections in preschool children in Northern Jordan. *Journal of Clinical Microbiology* (31): 2706-2708.
- Nimri LF, Batchoun R.** 1994. Intestinal colonization of symptomatic and asymptomatic schoolchildren with *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* (32): 2865-2866.
- Noël C, Peyronnet C, Gerbod D, Edgcomb VP, Delgado-Viscogliosi P, Sogin ML, Capron M, Viscogliosi E, Zenner L.** 2003. Phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from different hosts based on the comparison of small-subunit rRNA gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* (126): 119-123.
- O'Gorman MA, Orenstein SR, Proujansky R, Wadowsky RM, Putnam PE, Kocoshis SA.** 1993. Prevalence and characteristics of *Blastocystis hominis* infection in children. *Clinical Pediatrics* (February): 91-96.
- Ok UZ, Girginkardesler N, Balcioglu C, Ertan P, Pirildar T, Kilimcioglu A.** 1999. Effect of trimethoprim- sulfamethaxazole in *Blastocystis hominis* infection. *The American Journal of Gastroenterology* (94): 3245-3247.
- Pakandl M.** 1991. Occurrence of *Blastocystis* sp. in pigs. *Folia Parasitologica* (38): 297-301.
- Pakandl M.** 1999. *Blastocystis* sp. from pigs: ultrastructural changes occurring during polyxenic cultivation in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitology Research* (85): 743-748.
- Pena MJ, Elcuaz R, Cañas A, Bordes A, Lafarga B.** 1992. Características clínico-epidemiológicas de la infección por *Blastocystis hominis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (10): 16.
- Pérez de Suarez E, Guzman de Rondon C.** 1994. La morfología del *Blastocystis hominis* en las heces y evaluación de métodos parasitológicos. *Gen (Revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología)* (48): 226-231.
- Phillips BP, Zierdt CH.** 1976. *Blastocystis hominis*: Pathogenic potential in human patients and in gnotobiotics. *Experimental Parasitology* (39): 358-364.
- Pikula ZP.** 1987. *Blastocystis hominis* and human disease. *Journal of Clinical Microbiology* (25): 1581.
- Pinel C, Réjasse C, Picot S, Brenier-Pinchart MP, Grillot R, Ambroise-Thomas P.** 1999. *Blastocystis hominis*: réflexions épidémiologiques et cliniques à propos de plus de 3500 examens coprologiques. *Annales de Biologie Clinique* (57): 601-604.
- Qadri SM, Al-Okaili GA, Al-Dayel F.** 1989. Clinical significance of *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* (27): 2407-2409.

Quílez J, Clavel A, Sánchez-Acedo C, Causapé AC, Albalá F. 1993. Detection of *Blastocystis* sp. in pigs in Aragón (Spain). *Veterinary Parasitology* (56): 345-348.

Rajah Salim H, Suresh Kumar G, Vellayan S, Mak JW, Khairul Anuar A, Init I, Vennila GD, Saminathan R, Ramakrishnan K. 1999. *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitology Research* (85): 1032-1033.

Reinthal FF, Hermentin K, Mascher F, Klem G, Sixl W. 1987. Criptosporidiosis in Ogun State, south-west Nigeria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* (38): 51-52.

Reinthal FF, Mascher F, Klem G, Sixl W. 1988a. A survey of gastrointestinal parasites in Ogun State, southwest Nigeria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* (82): 181-184.

Reinthal FF, Linck G, Klem G, Mascher F, Sixl W. 1988b. Intestinal parasites in children with diarrhea in El Salvador. *Georgia Medical* (18): 175-180.

Reinthal FF, Mascher F, Marth E. 1988c. *Blastocystis hominis*: intestinal parasite or nonpathogen?. *WMW* (21): 545-547.

Reischl Udo. 1998. Molecular Diagnosis of Infectious Diseases. *Humana Press*.

Ricci N, Toma P, Furlani M, Caselli M, Gullini S. 1984. *Blastocystis hominis*: a neglected cause of diarrhoea?. *The Lancet* (1): 966.

Riley DE, Samadpour M, Krieger J. 1991. Detection of variable DNA repeats in diverse eukaryotic microorganisms by a single set of polymerase chain reaction primers. *Journal of Clinical Microbiology* (29): 2746-2751.

Rogan MT. 1997. Analytical Parasitology. *Ed Springer Lab Manual*.

Rosenblatt JE. 1990. *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* (28): 2379-2380.

Russo AR, Stone SL, Taplin ME, Snapper HJ, Doern GV. 1988. Presumptive evidence for *Blastocystis hominis* as a cause of colitis. *Archives of Internal Medicine* (148): 1064.

Salavert M, Roig P, Nieto A, Navarro V, Borrás R. 1989. Enterocolitis por *Blastocystis hominis* e infección por VIH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (8): 63-64.

Sargeant PG, Willians JE. 1979. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (73): 225-227.

Schwartz E, Houston R. 1992. Effect of co-trimoxazole on stool recovery of *Blastocystis hominis*. *The Lancet* (339): 428-429.

Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittman TS. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology* (51): 873-884.

- Senay H, MacPherson D.** 1990. *Blastocystis hominis*: Epidemiology and natural history. *The Journal of Infectious Diseases* (162): 987-990.
- Sheenan DJ, Raucher BG, McKittrick JC.** 1986. Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of human disease. *Journal of Clinical Microbiology* (24): 548-550.
- Silard R, Petrovici M, Panaitescu D, Stoicescu V.** 1977. *Blastocystis hominis* in the liver of *Cricetus auratus*. *Archives Roumaines de Pathologie Experimentale et de Microbiologie* (36): 55-60.
- Silard R.** 1979. Contributions to *Blastocystis hominis* studies. Aspects of degenerescence. *Archives Roumaines de Pathologie Experimentale et de Microbiologie* (38): 105-114.
- Silard R, Panaitescu D, Burghilea B.** 1983. Ultrastructural aspects of *Blastocystis hominis*. *Archives Roumaines de Pathologie Experimentale et de Microbiologie* (42): 233-242.
- Silard R, Burghilea B.** 1985. Ultrastructural aspects of *Blastocystis hominis* strain resistant to antiprotozoal drugs. *Archives Roumaines de Pathologie Experimentale et de Microbiologie* (44): 73-85.
- Silberman JD, Sogin ML, Leipe DD, Clark CG.** 1996. Human parasite finds taxonomic home. *Nature* (380): 398.
- Singh M, Suresh K, Ho LC, Ng GC, Yap EH.** 1995. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* (81): 446-450.
- Singh M, Ho LC, Yap ALL, Ng GC, Tan SW, Moe KT, Yap EH.** 1996. Axenic culture of reptilian *Blastocystis* isolates in monophasic medium and speciation by karyotypic typing. *Parasitology Research* (82): 165-169.
- Snowden K, Logan K, Blozinski C, Hoevers J, Holman P.** 2000. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of *Blastocystis* isolates from animal hosts. *Parasitology Research* (86): 62-66.
- Steinmann E, di Gallo A, Rüttimann S, Loosli J, Dubach UC.** 1990. Ätiologie von Durchfallserkrankungen bei immunkompetenten und HIV-positiven patienten. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* (120): 1253-1256.
- Stenzel DJ, Dunn LA, Boreham PFL.** 1989. Endocytosis in cultures of *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitology* (19): 787-791.
- Stenzel DJ, Boreham PFL.** 1991a. A cyst-like stage of *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitology* (21): 613-615.
- Stenzel DJ, Boreham PFL, McDougall RM.** 1991b. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. *International Journal for Parasitology* (21): 807-812.
- Stenzel DJ, Cassidy MF, Boreham PFL.** 1993. Morphology of *Blastocystis* sp. isolated from circus animals. *International Journal for Parasitology* (23): 685-687.

- Stenzel DJ, Cassidy MF, Boreham PFL.** 1994a. Morphology of *Blastocystis* sp. from domestic birds. *Parasitology Research* (80): 131-137.
- Stenzel DJ, Boreham PFL.** 1994b. Bacteria-like endosymbionts in *Blastocystis* sp. *International Journal for Parasitology* (24): 147-149.
- Stenzel DJ, Boreham PFL.** 1996. *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Reviews* (9): 563-584.
- Struelens MJ, and the Members of the European Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM), of the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID).** 1999. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiology typing systems. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (2): 2-11.
- Su XZ, Ferdig MT, Huang Y, Huynh CQ, Liu A, You J, Wootton JC, Wellems TE.** 1999. A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* (12): 1351-1353.
- Sun T, Katz S, Tanenbaum B, Schenone C.** 1989. Questionable clinical significance of *Blastocystis hominis* infection. *American Journal of Gastroenterology* (84): 1543-1547.
- Suresh K, Ng GC, Ramachandran NP, Ho LC, Yap EH, Singh M.** 1993. In vitro encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* (79): 456-460.
- Suresh K, Howe J, Ng GC, Ho LC, Ramachandran NP, Loh AK, Yap EH, Singh M.** 1994a. A multiple fission-like mode of asexual reproduction in *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* (80): 523-527.
- Suresh K, Ng GC, Ho LC, Yap EH, Singh M.** 1994b. Differentiation of the various stages of *Blastocystis hominis* by acridine orange staining. *International Journal for Parasitology* (24): 605-606.
- Suresh K, Howe J, Chong SY, Ng GC, Ho LC, Log AK, Ramachandran NP, Yap EH, Singh M.** 1994c. Ultrastructural changes during in vitro encystment of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* (80): 327-335.
- Suresh K, Chong SY, Howe J, Ho LC, Ng Gc, Yap EH, Singh M.** 1995. Tubulovesicular elements in *Blastocystis hominis* from the caecum of experimentally-infected rats. *International Journal for Parasitology* (25): 123-126.
- Suresh K, Init I, Reuel PA, Rajah S, Lokman H, Anuar AK.** 1998. Glycerol with fetal calf serum a better cryoprotectant for *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* (84): 321-322.
- Suresh K, Anuar AK.** 2002. Multiple reproductive processes in *Blastocystis*. *Trends in Parasitology* (18): 528.
- Svenungsson B, Lagergren A, Ekwall E, Evengard B, Hedlund KO, Kärnell A, Löfdahl S, Svensson L, Weintraub A.** 2000. Enteropathogens in adult patients with diarrhea and healthy control subjects: a 1-year prospective study in a Swedish clinic for infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases* (30): 770-778.

- Taamasri P, Mungthin M, Rangsin R, Tongupprakarn B, Areekul W, Leelayoova S.** 2000. Transmission of intestinal blastocystosis related to the quality of drinking water. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health* (31): 112-117.
- Tan HK, Zierdt CH.** 1973. Ultrastructure of *Blastocystis hominis*. *Zeitschrift für parasitenkunde* (42): 315-324.
- Tan HK, Harrison M, Zierdt CH.** 1974. Freeze-etch studies of the granular and vacuolated forms of *Blastocystis hominis*. *Zeitschrift für parasitenkunde* (44): 267-278.
- Tan SW, Ho LC, Moe KT, Chen XQ, Ng GC, Yap EH, Singh M.** 1996a. Production and characterization of murine monoclonal antibodies to *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitology* (26): 375-381.
- Tan SW, Singh M, Yap EH, Ho LC, Moe KT, Howe J, Ng GC.** 1996b. Colony formation of *Blastocystis hominis* in soft agar. *Parasitology Research* (82): 375-377.
- Tan SW, Singh M, Ho LC, Howe J, Moe KT, Chen XQ, Ng GC, Yap EH.** 1997. Survival of *Blastocystis hominis* clones after exposure to a cytotoxic monoclonal antibody. *International Journal for Parasitology* (27): 947-954.
- Tan KS, Ng GC, Queck E, Howe J, Ramachandran NP, Yap EH, Singh M.** 2000. *Blastocystis hominis*: a simplified, high-efficiency method for clonal growth on solid agar. *Experimental Parasitology* (96): 9-15.
- Tan KS, Howe J, Yap EH, Singh M.** 2001a. Do *Blastocystis hominis* colony forms undergo programmed cell death?. *Parasitology Research* (87): 362-367.
- Tan KS, Ibrahim M, Ng GC, Nasirudeen AMA, Ho LC, Yap EH, Singh M.** 2001b. Exposure of *Blastocystis* species to a cytotoxic monoclonal antibody. *Parasitology Research* (87): 534-538.
- Tan KS, Singh M, Yap EH.** 2002. Recent advances in *Blastocystis hominis* research: hot spots in terra incognita. *International Journal for Parasitology* (32): 789-804.
- Telalbasic S, Pikula ZP, Kapidzic M.** 1991. *Blastocystis hominis* may be a potential cause of intestinal disease. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* (23): 389-390.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* (33): 2223-2239.
- Teow WL, Zaman V, Ng GC, Chan YC, Yap EH, Howe J, Gopalakrishnakone P, Singh M.** 1991. A *Blastocystis* species from the sea-snake, *Lapemis hardwickii* (Serpentes: *Hydophiidae*). *International Journal for Parasitology* (21): 723-726.
- Teow WL, Ng GC, Chan PP, Chan YC, Yap EH, Zaman V, Singh M.** 1992. A survey of *Blastocystis* in reptiles. *Parasitology Research* (78): 453-455.

- Thathaisong U, Worapong J, Mungthin M, Tan-Ariya P, Viputtigul Sudatis A, Noonai A, Leelayoova S.** *Blastocystis* isolates from a pig and a horse are closely relate to *Blastocystis hominis*. *Journal for Clinical Microbiology* (41): 967-975.
- Tórtola MT, Martínez E, Bellver P, Bartolomé RM, Fernández F.** 1994. ¿Patogenicidad de *Blastocystis hominis*? VI Congreso Nacional de Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Valencia pp: 505.
- Tsang TK, Levin BS, Morse SR.** 1989. Terminal ileitis associated with *Blastocystis hominis* infection. *The American Journal of Gastroenterology* (84): 798-799.
- Udkow MP, Markell EK.** 1993. *Blastocystis hominis*: Prevalence in asymptomatic versus symptomatic hosts. *The Journal of Infections Diseases* (168): 242-244.
- Upcroft JA, Dunn LA, Dommett LS, Healey A, Upcroft P, Boreham PFL.** 1989. Chromosomes of *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitology* (19): 879-883.
- Vannatta JB, Adamson D, Mullican K.** 1985. *Blastocystis hominis* infection presenting as recurrent diarrhea. *Annals of Internal Medicine* (102): 495-496.
- Van Saanen-Ciurea M, El Achachi H.** 1983. *Blastocystis hominis*: étude morphologique par microscopie optique et electronique. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* (76): 766-776.
- Vennila GD, Suresh KG, Khairul AA, Rajah S, Saminathan R, Sivanandan S, Ramakrishnan K.** 1999. Irregular shedding of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* (85): 162-164.
- Villar J, Carbajal JA, Borrás R.** 1996. Identificación de *Blastocystis hominis* en muestras fecales concentradas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (14): 273-274.
- Villar J.** 1997. *Blastocystis hominis* Brumpt, 1912: evidencias sobre la existencia de diferentes estadios quísticos y de diversidad proteica entre las formas tróficas y quísticas. Tesis doctoral. Universidad de Valencia pp 153.
- Villar J, Carbajal JA, Lanuza MD, Muñoz C, Borrás R.** 1998. In vitro encystation of *Blastocystis hominis*: a kinetics and cytochemistry study. *Parasitology Research* (60): 54-58.
- Vdovenko AA.** 2000a. *Blastocystis hominis*: origin and significance of vacuolar and granular forms. *Parasitology Research* (86): 8-10.
- Vdovenko AA, Williams JE.** 2000b. *Blastocystis hominis*: neutral red supravital staining and its application to in vitro drug sensitivity testing. *Parasitology Research* (86): 573-581.
- Waghorn DJ, Hancock P.** 1991. Clinical significance of *Blastocystis hominis*. *The Lancet* (337): 609.
- Wang KX, Li CP, Wang J, Cui YB.** 2002. Epidemiological survey of *Blastocystis hominis* in Huainan city, Anhui province, China. *World Journal of Gastroenterology* (8): 928-932.

- Waring L, Reed C.** 2001. *Blastocystis hominis*: Causative organism or harmless commensal?. *Australian Family Physician* (30): 374-378
- Weg AL, Soave R, Jacobson IM.** 1987. The significance of intestinal *Blastocystis hominis* infection. *Gastroenterology* (92): 1688.
- Windsor JJ, Macfarlane L, Whiteside TM, Chalmers RM, Thomas AL, Joynson DHM.** 2001. *Blastocystis hominis*: a common yet neglected human parasite. *British Journal of Biomedical Science* (58): 129-130.
- Windsor JJ, Macfarlane L, Hughes-Thapa G, Jones SK, Whiteside TM.** 2002. Incidence of *Blastocystis hominis* in a faecal samples submitte for routine microbiological analysis. *British Journal of Biomedical Science* (59): 154-157.
- Yamada M, Matsumoto Y, Tegoshi T, Yoshida Y.** 1987a. The prevalence of *Blastocystis hominis* infection in humans in Kyoto city. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (15): 158-159.
- Yamada M, Yoshikawa H, Tegoshi T, Matsumoto Y, Yoshikawa T, Shiota T, Yoshida Y.** 1987b. Light microscopical study of *Blastocystis* spp. in monkeys and fowls. *Parasitology Research* (73): 527-531.
- Yang LQ, Singh M, Yap EH, Ng GC, Xu HX, Sim KY.** 1996. In vitro response of *Blastocystis hominis* against traditional Chinese medicine. *Journal of Ethnopharmacology* (55): 35-42.
- Yoshikawa H, Yamada M, Yoshida Y.** 1988. Freeze-fracture study of *Blastocystis hominis*. *Journal of Protozoology* (35): 522-528.
- Yoshikawa H, Katagiri I, Li XH, Becker-Hapak M, Graves DC.** 1995a. Antigenic differences between *Blastocystis hominis* and *Blastocystis* sp revealed by polyclonal and monoclonal antibodies. *Journal of Protozoology Research* (5): 118-128.
- Yoshikawa H, Kuwayama N, Enose Y.** 1995b. Histochemical detection of carbohydrates of *Blastocystis hominis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* (42): 70-74.
- Yoshikawa H, Hayakawa A.** 1996a. Morphological changes in the central vacuole of *Blastocystis hominis* during in vitro culture. *Protoplasma* (194): 63-68.
- Yoshikawa H, Hayakawa A.** 1996b. Freeze-fracture cytochemistry of membrane cholesterol in *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitology* (26): 1111-1114.
- Yoshikawa H, Nagono I, Yap EH, Singh M, Takahashi Y.** 1996c. DNA polymorphism revealed by arbitrary primers polymerase chain reaction among *Blastocystis* strains isolated from humans, a chicken and a reptile. *Journal of Eukaryotic Microbiology* (43): 127-130.
- Yoshikawa H, Oishi K.** 1997. Ultrastructural localization of basic proteins of *Blastocystis hominis*. *Protoplasma* (200): 31-34.
- Yoshikawa H, Nagano I, Wu Z, Yap EH, Singh M, Takahashi Y.** 1998. Genomic polymorphism among *Blastocystis hominis* strains and development of subtype-specific diagnostic primers. *Molecular and Cellular Probes* (12): 153-159.

- Yoshikawa H, Abe N, Iwasawa M, Kitano S, Nagano I, Wu Z, Takahashi Y.** 2000. Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *Journal of Clinical Microbiology* (38): 1324-1330.
- Zaki M, Daoud AS, Pugh RNH, Al-Ali F, Al-Mutairi G, Al-Saleh Q.** 1991. Clinical report of *Blastocystis hominis* infection in children. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (94): 118-122.
- Zaki M, Zaman V, Sheikh NA.** 1996. Resistance of *Blastocystis hominis* cysts to chlorine. *Journal of the Pakistan Medical Association* (46): 178-179.
- Zaman V, Ng GC, Suresh K, Yap EH, Singh M.** 1993. Isolation of *Blastocystis* from the cockroach (Dictyoptera: Blattidae). *Parasitology Research* (79): 73-74.
- Zaman V, Khan KZ.** 1994a. A concentration technique for obtaining viable cysts of *Blastocystis hominis* from faeces. *Journal of the Pakistan Medical Association* (44): 220-221.
- Zaman V, Khan KZ, Khan MA.** 1994b. Isolation of *Blastocystis hominis* from sewage. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* (25): 211-212.
- Zaman V, Howe J, Ng M.** 1995a. A comparative morphology of *Blastocystis hominis* cysts with and without the "fibrillar layer". *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* (26): 801-802.
- Zaman V, Howe J, Ng M.** 1995b. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cyst. *Parasitology Research* (81): 465-469.
- Zaman V.** 1996a. The diagnosis of *Blastocystis hominis* cysts in human faeces. *Journal of Infection* (33): 15-16.
- Zaman V, Zaki M.** 1996b. Resistance of *Blastocystis hominis* cysts to metronidazole. *Tropical Medicine and International Health* (1): 677-678.
- Zaman V, Howe J, Ng M.** 1997a. Observations on the surface coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* (83): 731-733.
- Zaman V.** 1997b. Phase-contrast microscopy of cell division in *Blastocystis hominis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* (91): 223-224.
- Zaman V, Howe J, Ng M.** 1998a. Scanning electron microscopy of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitology Research* (84): 476-477.
- Zaman V.** 1998b. The differential identification of *Blastocystis hominis* cysts. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* (92): 233-235.
- Zaman V, Zaki M, Manzoor M, Howe J, Ng M.** 1999a. Postcystic development of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* (85): 437-440.
- Zaman V, Howe J, Ng M, Goh TK.** 1999b. Scanning electron microscopy of the surface coat of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* (85): 974-976.
- Zierdt CH, Rude WS, Bull BS.** 1967. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *The American Journal of Clinical Pathology* (48): 495-501.

- Zierdt CH.** 1973. Studies of *Blastocystis hominis*. *The Journal of Protozoology* (20): 114-121.
- Zierdt CH, Williams RL.** 1974. *Blastocystis hominis*: axenic cultivation. *Experimental Parasitology* (36): 233-243.
- Zierdt CH, Tan HK.** 1976a. Ultrastructure and light microscope appearance of *Blastocystis hominis* in a patient with enteric disease. *Zeitschrift für Parasitenkunde* (50): 277-283.
- Zierdt CH, Tan HK.** 1976b. Endosymbiosis in *Blastocystis hominis*. *Experimental Parasitology* (39): 422-430.
- Zierdt CH.** 1978. *Blastocystis hominis*, an intestinal protozoan parasite of man. *The Public Health Laboratory* (36): 147-161.
- Zierdt CH.** 1986. Cytochrome-free mitochondria of an anaerobic protozoan *Blastocystis hominis*. *Journal of Protozoology* (33): 67-69.
- Zierdt CH.** 1988a. *Blastocystis hominis*, a long-misunderstood intestinal parasite. *Parasitology Today* (4): 15-17.
- Zierdt CH, Donnelly CT, Muller J, Constantopoulos G.** 1988b. Biochemical and ultrastructural study of *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* (26): 965-970.
- Zierdt CH.** 1991a. *Blastocystis hominis*- Past and Future. *Clinical Microbiology Reviews* (4): 61-79.
- Zierdt CH.** 1991b. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *Journal of Clinical Microbiology* (29): 662-663.
- Zierdt CH, Nagy B.** 1993a. Antibody response to *Blastocystis hominis* infections. *Annals of Internal Medicine* (118): 985-986.
- Zierdt CH.** 1993b. Taxonomic status of *Blastocystis hominis*: reply. *Parasitology Today* (9): 18.
- Zierdt CH, Zierdt WS, Nagy B.** 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. *Journal of Parasitology* (81): 127-129.
- Zucherman MJ, Ho H, Hooper L, Anderson B, Polly SM.** 1990. Frequency of recovery of *Blastocystis hominis* in clinical practice. *Journal of Clinical Gastroenterology* (12): 525-532.
- Zucherman MJ, Watts MT, Ho H, Meriano FV.** 1994. *Blastocystis hominis* infection and intestinal injury. *The American Journal of the Medical Sciences* (308): 96-101.

