



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Evaluación del efecto de 1,3-Bis-(4-fenil-[1,2,3] triazol-1-il)-2 propanol en comparación con metronidazol en cultivo *in vitro* de *Blastocystis* en muestras de pacientes con Síndrome de Intestino Irritable**

# TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIA QUÍMICAS**

**PRESENTA**

LIC. BIOL. GARCIA FLORES LIZBETH

**DIRIGIDA POR:**

DRA. MARÍA DOLORES HERNÁNDEZ NAVARRO  
DR. JONNATHAN GUADALUPE SANTILLÁN BENÍTEZ  
DR. ERICK CUEVAS YÁÑEZ



TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, ENERO 2018

## **AGRADECIMIENTOS**

- Este proyecto se realizo con apoyo de: DSA/103.5/16/10569 PRODEP
- Se le agradece al Centro Médico ISSEMyM en la contribución de pacientes con SII y al Hospital Gómez Farías por su apoyo en la donación de material para la realización de esta investigación.
- A la Q.F.B. Salud Zamudio Chávez por su apoyo en la donación de material y espacio de su laboratorio clinico de análisis Zamsen, para realizar parte de esta investigación.
- Esp. Gastrol. Hinojosa González Ruíz del Centro Médico ISSEMyM por su participación y apoyo brindado en la contribución de pacientes con SII en esta investigación.
- Mc. Esp. Gastrol. Priscila Caballero del Centro Médico ISSEMyM por su apoyo y participación en la contriución y seguimiento de pacientes con SII, para el desarrollo de esta investigación.
- A los pacientes que participaron en la donación de muestras para la realización de este estudio.

## INDICE

INDICE .....	3
RESUMEN .....	6
INTRODUCCIÓN .....	8
CAPITULO I. MARCO CONCEPTUAL .....	9
1.1 <i>Blastocystis</i> spp. ....	9
1.1.1. Taxonomía.....	9
1.1.2 Morfología de <i>Blastocystis</i> spp.....	9
1.1.2.2. Forma granular .....	10
1.1.2.3. Forma ameboide .....	10
1.1.2.4. Forma avacuolar .....	10
1.1.2.5. Forma multivacuolar .....	10
1.1.2.6. Quiste. ....	10
1.1.3. Ciclo biológico. ....	11
1.1.4. Sintomatología .....	12
1.1.5. Patogenia. ....	12
1.1.5.1. Mecanismo de acción de Proteasas en <i>Blastocystis</i> spp.....	12
1.1.6. Subtipos de <i>Blastocystis</i> spp. más comunes en humano. ....	13
1.1.7. Epidemiología. ....	13
1.1.8 Cultivo <i>in vitro</i> . ....	14
1.1.9. Síndrome de Intestino irritable (SII).....	14
1.1.9.1. Epidemiología de SII.....	15
1.1.10. Tratamiento contra la infección por <i>Blastocystis</i> spp.....	15
1.1.11 Fármacos .....	16
1.1.11.1. Metronidazol .....	16
1.1.11.1.2 Efecto de Metronidazol en <i>Blastocystis</i> spp. ....	16
1.1.11.2. Triazoles. ....	17
1.1.11.2.1. 3-Bis-(4-fenil-[1, 2, 3] triazol-1-il)-2- propanol.....	17

1.1.12. Evaluación <i>in vitro</i> .....	18
CAPITULO II. ANTECEDENTES.....	18
2.1. Susceptibilidad en <i>Blastocystis</i> spp. ....	18
III. JUSTIFICACIÓN.....	21
IV. HIPÓTESIS .....	22
CAPITULO III. OBJETIVOS .....	22
OBJETIVO GENERAL: .....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	22
CAPITULO IV. METODOLOGÍA.....	22
4.1 Tamaño de muestra .....	23
4.2. Tiempo de muestreo .....	23
4.3. Variables .....	23
4.4. Criterios.....	23
4.4.1 Criterios de inclusión.....	23
4.4.2. Criterios de exclusión. ....	23
4.4.3. Criterios de eliminación. ....	23
4.5. Ética del estudio .....	24
4.6. Selección de pacientes.....	24
4.6.1. Diagnóstico de Síndrome de intestino irritable. ....	24
4.6.1.1. Criterios de Roma IV para el diagnóstico de Síndrome del Intestino Irritable con predominio de estreñimiento. ....	24
4.6.1.2. Criterios de Roma IV para el diagnóstico de Síndrome del Intestino Irritable con predominio diarrea. ....	25
4.7. Toma de muestra .....	25
4.8 Análisis de la muestra.....	25
4.8.1. Método de concentración por sedimentación de Ritchie modificado. ....	25
4.8.1.2. Método de diagnóstico por observación directa en fresco. ....	25
4.9. Identificación de <i>Blastocystis</i> spp.....	26
Presente .....	26
4.10. Extracción de <i>Blastocystis</i> spp.....	26
4.11. Reproducción de <i>Blastocystis</i> spp.....	26
4.11.1. Recuento de morfotipos.....	26

4.12. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del compuesto triazólico y metronidazol.....	27
4.13. Inóculo del parásito .....	27
4.14. Viabilidad del parásito.....	27
4.15. Obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria.....	28
4.16. Diagrama de flujo de la metodología.....	28
<b>CAPITULO V. RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
5.1 Artículo .....	29
5.2. REFERENCIAS .....	43
Balkrishnan, D., Suresh, K., Y Chye, T. (2016). Granular Formation during Apoptosis in Blastocystis sp. Exposed to Metronidazole (MTZ). <i>PloS One</i> , 11(7), e0155390.....	43
Tan, K., Singh, M., Y Yap, H. (2002). Recent advances in Blastocystis hominis research: hot spots in terra incognita. <i>International Journal for Parasitology</i> , 32, 789-804.....	50
<b>CAPITULO VI. ANEXOS.....</b>	<b>52</b>
6.1. Productividad .....	52
6.1.2 Artículo de revisión: García L., Santillán JG. Hernandez MD. (2016). Blastocystis: Biología, Subtipos Genéticos, Patología y Tratamiento, <i>Parasitología Latinoamericana</i> .65(2):0719-6326.....	52
6.1.3. Constancia de participación como ponente en cartel, en el segundo congreso de enfermedades crónico de degenerativas y de rezago. ....	54
6.1.4. Reporte de resultados de pacientes con SII del Centro Médico ISSEMyM. ....	55
6.1.5. Transporte, envase y embalaje de material biológico. ....	56
6.1.5.1. Sistema básico de embalaje/embasado. ....	56
6.1.5.2. Marcas y etiquetas. ....	57
6.1.5.6. Diagrama de flujo para la recolección y transporte de muestras. ....	59
6.1.6. Carta de consentimiento informado .....	60

## RESUMEN

*Blastocystis* spp. es un chromista prevalente que infecta a una gran variedad de vertebrados. Durante los últimos años, estudios realizados han descrito la asociación de este parásito con el padecimiento de Síndrome de intestino irritable (SII), (Ibarra, 2015, Rostami, *et al.*, 2017, Jadalah, *et al.*, 2017), el cual se define, como un grupo funcional de los desórdenes del colon con dolor abdominal, con periodos de estreñimiento con diarrea, presencia de moco y defecación irregular (Sinagra, *et al.* 2016, Occhipinti & Smith, 2012). El SII es una enfermedad frecuente en la práctica clínica, representa el 12% de todos los diagnósticos obtenidos en las consultas médicas generales y un 25%-50% de todas las consultas de gastroenterología (Zeber *et al.*, 2016). La incidencia en países en desarrollo es de 35%-43%. Así mismo se ha reportado casos clínicos donde el tratamiento con metronidazol ha sido ineficaz para la eliminación de este parásito. Por tal motivo, algunos reportes de sensibilidad *in vitro* realizados en *Blastocystis* spp., mencionan que, metronidazol no es la mejor opción para tratar la infección contra *Blastocystis* spp. y se debe buscar otras opciones (Roberts, 2014, Moghaddam *et al.*, 20015). Por tal motivo el propósito del presente trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* del compuesto 1,3-Bis-(4-fenil-[1, 2, 3] triazol-1-il)-2 propanol en comparación con metronidazol en cultivo *in vitro* de *Blastocystis* spp. en muestras de pacientes con Síndrome de intestino irritable. Para ello, se realizó un estudio prospectivo de pacientes con SII provenientes del Centro Médico ISSEMyM, durante los meses de Abril 2016-Abril 2017. Los pacientes fueron seleccionados bajo los criterios de inclusión: pacientes con SII y que aceptaron participar en el estudio; exclusión: pacientes que estuvieran con algún tratamiento antiparasitario; eliminación: pacientes que no quisieran participar en el estudio o que no presentaran SII. Los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, se recibieron muestras fecales seriadas de tres, a las que, se les realizó un análisis coproparasitológico por observación directa y método de concentración de Ritchie. Las muestras que presentaron *Blastocystis*, se colocaron a una temperatura de 36°C y posteriormente se extrajo a este parásito por el método de concentración, posteriormente, se colocó al concentrado de *Blastocystis* en sol. de Locke a 36°C. Para la prueba de susceptibilidad, se realizó una solución Stock de metronidazol adquirido de Sigma-Aldrich y del compuesto 1,3-Bis-(4-fenil-[1,2,3] triazol-1-il)-2 propanol sintetizado por (David *et al.*,

2011). las concentraciones realizadas fueron: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 250, 500 y 1000 $\mu$ g/mL obtenidas por dilución doble para cada compuesto. Se realizó un microcultivo en placas de 96 pozos, cada pozo se inóculo con 100 $\mu$ L de medio liquido de Boeck-Drbohlab con un promedio de 325 parásitos/10 $\mu$ L (muestra1), 312.5 parásitos/10 $\mu$ L (muestra 2), 150 parásitos/10 $\mu$ L (muestra 3), 300 parásitos/10 $\mu$ L (muestra 4), 212.5 parásitos/10 $\mu$ L (muestra 5) y 100 $\mu$ L de medio liquido de Boeck-Drbohlab con la concentración de cada compuesto, el análisis se realizó por triplicado y se llenó una cuarta columna con medio y misma concentración de parásitos, pero sin ningún fármaco para cada muestra, la cual fue utilizada como control, posteriormente se realizó un conteo de parásitos muertos y vivos con cámara de Neubauer en intervalos de tiempo de cada 12 horas durante 48 horas, debido a, que se observó que a intervalos de tiempo de 6hrs no había diferencias significativas en esta prueba. La viabilidad del parásito fue realizada por el método de azul tripan (Strober, 2001) vistas a microscopio electrónico a objetivo de 40X. Finalmente, se obtuvo la concentración mínima inhibitoria para ambos fármacos, obteniendo como resultado que metronidazol y el bis-triazol tienen efecto en *Blastocystis* spp. únicamente a concentraciones altas, sin embargo, en la muestra 1, el parásito no mostro sensibilidad ante el compuesto bis-triazol. Se concluye que, para este estudio, metronidazol es más eficaz que el compuesto con una concentración minima de 32 $\mu$ g/mL.

## INTRODUCCIÓN

*Blastocystis* spp. es un parásito intestinal, miembro del reino chromista, con una gran variedad genética, presenta 17 subtipos (ST) basados en la pequeña subunidad del gen rRNA (SSUrDNA) (Madi *et al.*, 2015), anteriormente considerado como organismo no patógeno y perteneciente a la microbiota humana, sin embargo, durante los últimos años ha sido catalogado dentro de los parásitos patógenos, debido a que se ha determinado que ocasiona dolor abdominal, cuyo síntoma es el más prevalente (76.9%), diarrea (50%) y distensión abdominal (32.6%) (Kaya *et al.*, 2007, Ertug *et al.*, 2009) y ha sido asociado a diferentes enfermedades como Síndrome de Intestino Irritable (Ramírez *et al.*, 2014, Khadem *et al.*, 2017), urticaria (Casero *et al.*, 2015) Sin embargo, los tratamientos dirigidos contra *Blastocystis* spp. han sido de eficacia variable, se ha determinado que, depende de la sensibilidad del subtipo (ST) del parásito, con el fármaco con el que sea sometido (Roberts, 2014).

Se ha observado que el metronidazol, que es el fármaco más usado para tratar la infección por *Blastomcystis* spp. (Stensvold *et al.*, 2010), no es eficaz en todos los tratamientos realizados en pacientes (Roberts, 2013). Por tal motivo, el propósito de la investigación fue evaluar el efecto de 1,3-Bis-(4-fenil-[1,2,3] triazol-1-il)-2 propanol en comparación con metronidazol, en cultivo *in vitro* de *Blastocystis* spp. en muestras de pacientes con Síndrome de intestino irritable.



## CAPITULO I. MARCO CONCEPTUAL

### 1.1 *Blastocystis* spp.

*Blastocystis* spp. es un parásito cosmopolita, habita en el tracto intestinal del humano y de diversos hospederos, la prevalencia de infección por este parásito se da en países desarrollados en un 10% y en países en desarrollo 30%-50%. Se estima que *Blastocystis* spp. afecta a más de 1000 millones de personas en la población (Del coco *et al.*, 2017). Así mismo es el parásito gastrointestinal más predominante (Duda *et al.*, 2015).

#### 1.1.1. Taxonomía

Anteriormente *Blastocystis* spp. era considerado como un protozooario, sin embargo, actualmente esta clasificado dentro del Reino: Chromista, Subreino: Chromobiota, Infrareino: Heterokonta, Subfilum: Opalinata, Clase: Blastocystea (Tan *et al.*, 2010). Se han descrito 17 subtipos (ST) hasta el momento, de los cuales el más común es el ST3 seguido de ST1 (Bart *et al.*, 2013, Safadi *et al.*, 2014)

#### 1.1.2 Morfología de *Blastocystis* spp.

*Blastocystis* spp. es un parásito polimórfico, se le reconocen seis morfotipos o formas: vacuolar, granular, ameboide, quística, multivacuolar y avacuolar.

##### 1.1.2.1. Forma vacuolar.

Es el morfotipo más predominante en heces frescas, mide de 15µm -25µm, presenta una vacuola central que ocupa el 90% del volumen de la célula, alrededor de esta se encuentra el resto del citoplasma que contiene el núcleo del parásito con sus organelos [fig1]. (Poirier *et al.*, 2006).



Fig. 1 Formas vacuolares de *Blastocystis* spp., observadas en pacientes con SII (obtenida de García 2016).

### **1.1.2.2. Forma granular**

Esta formotipo, contiene una gran cantidad de gránulos lipídicos dentro de la vacuola central, se describen a estos gránulos como estructuras reproductivas, que posiblemente son producto de reproducción por esquizogonia, mide 10µm y esta fase es mayoritariamente observada cuando *Blastocystis* spp. es tratado bajo algún fármaco [fig.2] (Tan, 2002).

### **1.1.2.3. Forma ameboide**

La forma de este morfotipo es tipo ameba, se caracteriza por tener pseudópodos para su locomoción mide 10-22 µm, su forma es ovalada y sin membrana celular, vista en muestras de arceas, considerada como la causante del desarrollo del cuadro clínico del hospedero [fig.2] (Tan, 2008, Rajamanikam y Suresh 2013).

### **1.1.2.4. Forma avacuolar**

Esta fase carece de vacuola central, mide 5 µm, propia de cultivo *in vitro* [fig.2] (Boreham, 1993).

### **1.1.2.5. Forma multivacuolar**

Este morfotipo, es de tamaño variable, su diámetro oscila entre 5-8 µm, contiene múltiples vacuolas pequeñas, poseen púleos gruesos en su superficie. Estas formas han sido sugeridas que representan el estado *in vivo* del parásito, mientras que la forma vacuolar y granular son formas predominantes en cultivo *in vitro*. (Romero, 2010).

### **1.1.2.6. Quiste.**

El quiste de *Blastocystis* spp. posee forma redondeada, luminosa, mide 5-40 µm de diámetro, posee una gran vacuola central llena de líquido. La membrana externa es lisa rodeada de una capa de material capsular, visto después de la formación de la fase granular [fig.2] (Suresh *et al.*, 2009).

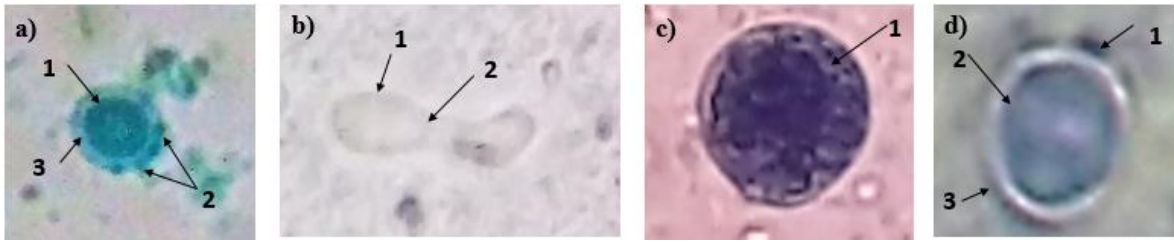


Fig. 2 Morfotipos de *Blastocystis* spp. observados en pacientes con SII, donde se observa en la imagen a) fase vacuolar de *Blastocystis* [1] vacuola central, [2] vacuolas, [3] citoplasma, b) fase ameboide [1] membrana celular, [2] citoplasma, c) fase granular (tomadas por García, 2016).

### 1.1.3. Ciclo biológico.

La persona parasitada por *Blastocystis* spp., excreta en sus heces quistes (forma infectante) al medio, que a su vez contamina agua y alimentos. Esto posibilita que lleguen por vía oral a otras personas de manera directa o indirectamente (Stesvold *et al.*, 2008). Al ser ingerido el quiste, este desciende al intestino

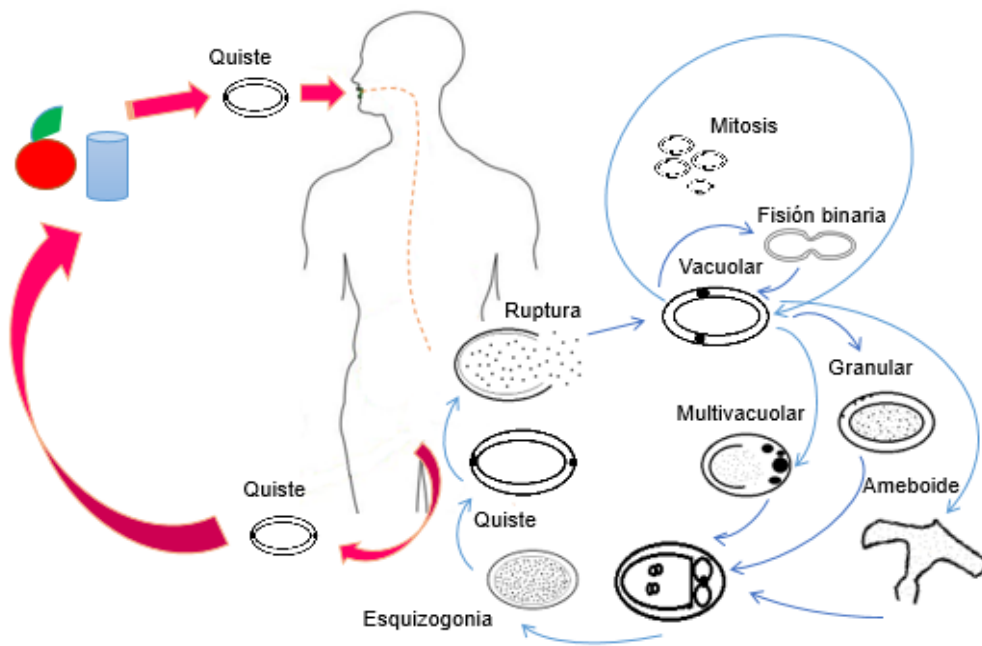


Fig. 3 Ciclo de vida de *Blastocystis* spp. (tomado de García *et al.*, 2016).

delgado de su hospedero y llega al intestino grueso donde se divide por fisión binaria, al penetrar dentro de las células del epitelio intestinal, este se desarrolla a forma vacuolar. Posteriormente, algunas de estas estructuras se pueden transformar a la fase granular o ameboide, esta última juega un papel muy importante en el desarrollo de las manifestaciones

clínicas. Su reproducción es asexual por fisión binaria y por esquizogonia. Posteriormente pasa nuevamente a la fase quística, que es arrojada al medio en las heces. Por tanto, se transmite por vía fecal-oral [Fig.2] (Hotez, 2000).

#### **1.1.4. Sintomatología**

*Blastocystis* spp. ha sido asociado a una serie de padecimientos gastrointestinales como: dolor abdominal, diarrea, fiebre, estreñimiento, diarrea con sangre, urticaria, vomito, inflamación, flatulencias, mareo, salivación, asociado a SII y enfermedad inflamatoria (Hilmi *et al.*, 2012, Ramírez *et al.*, 2010, Shawky *et al.*, 2011, Stark *et al.*, 2007). Así mismo, la infección por *Blastocystis* spp. puede presentarse asintómicamente, sin embargo, se ha reportado que el síntoma más frecuente por *Blastocystis* spp. es diarrea (63.3%) y dolor abdominal (37%) (Salvador *et al.*, 2016). Durante los últimos años *Blastocystis* spp. se ha asociado a Síndrome de intestino irritable (SII) debido a que se ha demostrado que, la presencia de este parásito es más frecuente en muestras fecales de pacientes con SII (46%) comparado con un grupo control (7%) (Das *et al.*, 2016, Krogsgaard *et al.*, 2015). Así mismo, la infección por *Blastocystis* puede presentarse de manera asintomática (Lepzynska *et al.*, 2015).

#### **1.1.5. Patogenia.**

*Blastocystis* spp. produce invasión de las células del epitelio intestinal, desarrollando un proceso inflamatorio en la mucosa intestinal en íleon y colon, con el desarrollo de pequeñas ulceraciones que se acompañan de focos hemorrágicos (Andiran *et al.*, 2006). Se ha reportado que la colonización de *Blastocystis* spp. es asociada con un incremento de la microbiota bacteriana del intestino (Audebert *et al.*, 2016).

##### **1.1.5.1. Mecanismo de acción de Proteasas en *Blastocystis* spp.**

Su patogénesis se debe a, la habilidad de producir proteasas de cisteína y otras enzimas proteolíticas dentro de sus vacuolas (Wawrzyniak, 2012), estas enzimas y proteasas degradan las glucoproteínas IgA de los enterocitos y las usan como carbohidratos y proteínas, que les sirven como recurso para sobrevivir y reproducirse en el intestino (Foad, 2011). Así mismo, las proteasas inducen cambios en la permeabilidad de las células epiteliales por inducción de apoptosis en las células del hospedero, así como, disrupción de la función de la barrera epitelial, la modulación de la respuesta inmune y la liberación de citocina de las células

epiteliales. Por tal motivo, *Blastocystis* spp. juega un papel importante en SII (Stark *et al.*, 2007).

#### **1.1.6. Subtipos de *Blastocystis* spp. más comunes en humano.**

*Blastocystis* spp. presenta 17 subtipos (ST) que se han encontrado en diversos vertebrados, de los cuales, los más comunes en el humano son: ST1, ST2, ST3 y ST4, de quienes el subtipo ST4 y ST3 son más asociados a SII. El ST1 se ha encontrado presente en individuos asintomáticos, mientras que ST2 únicamente se ha visto en pacientes con diarrea que presentan SII (Ramírez *et al.*, 2014), mientras que el ST2 está relacionado con pacientes asintomáticos y ST3 es el más prevalente (Broom *et al.*, 2008).

#### **1.1.7. Epidemiología.**

*Blastocystis* spp. es un parásito cosmopolita, predomina en climas fríos y húmedos, infecta a animales de vida silvestre, domésticos y al humano. Es más frecuente en niños que en adultos, pero se ha descrito con manifestaciones clínicas más frecuente en adultos que en niños. En la población la prevalencia de infección se efectúa entre el 1.5%-10% en países desarrollados y del 30%-60% en países en desarrollo (Shiang *et al.*, 2006). La alta prevalencia de infección en países en desarrollo se vincula a la falta de higiene, al contacto con animales y el consumo de comida y agua contaminada. Los individuos más parasitados, se encuentran en la edad promedio de 30-50 años y en niños de 4-5 años, en hombres se presenta en un 59.8% y en mujeres en 44.9%. *Blastocystis* spp. es más prevalente en verano (85.1%). Actualmente, se sabe que es un parásito importante en individuos inmunodeficientes e inmunosuprimidos incluyendo VIH y pacientes con cáncer, cuya prevalencia es de 30%-40% (Meloni *et al.*, 2012). La incidencia de este parásito, puede deberse a que, este microorganismo ha desarrollado resistencia a tratamientos antiparasitarios para protozoarios (Tan, 2004). Por otro lado, la prevalencia de protozoarios intestinales en México en pacientes con SII es de 23%, del cual *Blastocystis* spp. (16%), *E. nana* en (9%) y *E. histolytica/dispar* (3%) estos hallazgos sugieren una relación entre SII y *Blastocystis* spp. (Yakoob *et al.*, 2004). En países como Libia la prevalencia es de 26.58%, con más prevalencia durante verano que en invierno (Al-Fellani *et al.*, 2007).

### **1.1.8 Cultivo *in vitro*.**

*Blastocystis* spp. es un parásito anaerobio estricto, difícil de aislar, debido a que, el aislamiento requiere de mucho tiempo y personal especializado. Dado a ello, se han utilizado diferentes cultivos para su aislamiento; cultivo de Pavlova, medio de Boeck- Drbohlav, medio de Jones, medio de Barret (Zerpa *et al.*, 2012).

Medio Pavlova, es un medio monofásico, que consta de fosfato ácido de sodio 8.95g, fosfato de potasio 1.15g, cloruro de sodio 20.00g, extracto de levadura 4.00g, agua destilada 2750ml, se adicionan suero de caballo 37.5mL, almidón de arroz 2.75g, penicilina G sódica 1000 UI/mL, 50-100 ug/mL de estreptomicina, (Beltran *et al.*, 2003).

Medio de Boeck-Drbohlav (MBDM), es un medio bifásico que consta de una fase líquida que es una solución tamponada y suero inactivado (bovino, caballo, conejo o humano) y una fase sólida coagulada de huevo embrionado (Ortigoza *et al.*, 2005).

Medio de Jones es un medio monofásico ampliamente utilizado por su relativa simplicidad en la preparación y exigencias mínimas para la realización de este, (Gallegos *et al.*, 2012, Suresh y Smith, 2004)

Medio de Barret, es un medio monofásico que consta de suero de caballo y solución salina (Barret, 1990).

### **1.1.9. Síndrome de Intestino irritable (SII).**

Es un trastorno funcional que se caracteriza por la presencia de dolor abdominal recurrente asociado a alteraciones del ritmo deposicional, en forma de estreñimiento, diarrea o mixto. La inflamación y la distensión abdominal son muy frecuentes en el SII. El Síndrome de intestino irritable, se clasifica según el tipo de alteración del hábito deposicional predominante, en SII con estreñimiento (SII-E) se presenta, cuando más de un 25% de las heces son del tipo 1 y 2 en la escala Bristol y menos del 25% del tipo 6 y 7 [fig.4]. El SII con predominio diarrea (SII-D) se diagnostica, cuando más del 25% de las heces son del tipo 6 y 7 Bristol y menos del 25% son del tipo 1 y 2. Cuando se combinan ambos trastornos, estreñimiento y diarrea, se habla de SII de tipo mixto (SII-M) donde, más del 25% de las heces son del tipo 1 y 2 Bristol y más del 25% son de tipo 6 y 7 Bristol (Schmulson y Drossman, 2017). Cuando los pacientes cumplen con los criterios de diagnóstico para el SII,

pero sus hábitos intestinales no se pueden clasificar con precisión en ninguno de los subtipos anteriores, entonces, se determina como Síndrome de intestino irritable de tipo Indeterminado (SII-I), esto sucede, cuando el patrón de las deposiciones es intermedio y no puede clasificarse como diarrea ni estreñimiento (Mearin *et al.*, 2016).

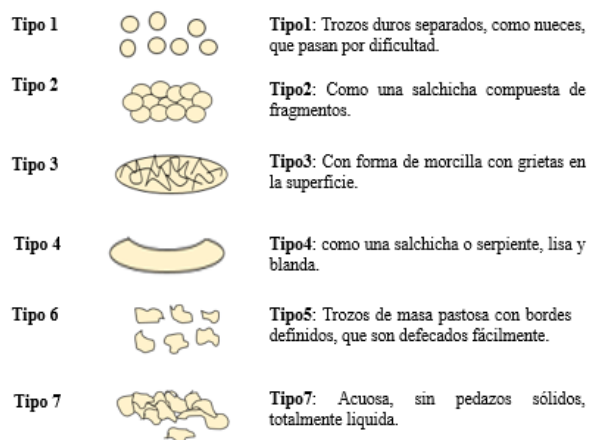


Fig. 4 Escala Bristol (tomada de Mearin *et al.* 2016).

#### 1.1.9.1. Epidemiología de SII.

El SII es una enfermedad frecuente en la práctica clínica, representa el 12% de todos los diagnósticos obtenidos en las consultas médicas generales y un 25%-50% de todas las consultas de gastroenterología. La incidencia de este padecimiento en países en desarrollo es de 35%-43%. (Ramírez *et al.*, 2010). Se presenta mayoritariamente en mujeres que en hombres y más comunmente diagnosticado en pacientes de 50 años (El-Salhy, 2012). Se ha reportado que alrededor del 10-20% de los adultos y adolescentes presentan síntomas consistentes de SII. (Longstreth, 2006).

En México el SII-C es más predominante en la población (64%) en comparación con SII-M (12%), así como *Blastocystis* spp. es el parásito encontrado con mayor presencia en este padecimiento (31%), por tal motivo, se observa una asociación entre *Blastocystis* spp. con el Síndrome de intestino irritable (Jimenez *et al.*, 2012).

#### 1.1.10. Tratamiento contra la infección por *Blastocystis* spp.

En casos donde *Blastocystis* spp. es implicado en una enfermedad gastrointestinal, el tratamiento es usualmente con metronidazol, seguido de, paramomicina, iodoquinol, trimetoprim, sulfametoxazol, cotrimoxazol, nitazoxanida y rifaximina. Pocos estudios han examinado los efectos de los fármacos en *Blastocystis* spp. *in vitro*. El fármaco de elección

para la quimioterapia de *Blastocystis* spp. ha sido metronidazol u otros nitroimidazoles. Sin embargo, este fármaco ha sido ineficaz en la erradicación del parásito en los individuos infectados. Se ha reportado resistencia frecuente en *Blastocystis* spp. ante metronidazol desde 1991, por lo que este fármaco ya no puede ser una opción como primera línea de tratamiento. La resistencia a los efectos citotóxicos de metronidazol de la forma quística de *Blastocystis* spp. ha sido de 5 mg/mL, eso explica, el porque de la poca eficacia de metronidazol en algunos individuos (Durgha *et al.*, 2015).

### 1.1.11 Fármacos

#### 1.1.11.1. Metronidazol

Metronidazol cuyo nombre sistémico es 1-(2-hydroxyethyl)-2-metyl-5-nitro-1H-imidazol y 2-(2-methyl-5-nitro-1H-imidazol-1-yl) etanol, es un medicamento que es usado para tratar infecciones de una variedad de organismos anaeróbicos, como infecciones parasíticas y bacterianas. Posee una variedad de grupos funcionales y dos átomos de hidrógeno coordinados al anillo de imidazol (Dvenko *et al.*, 2000).

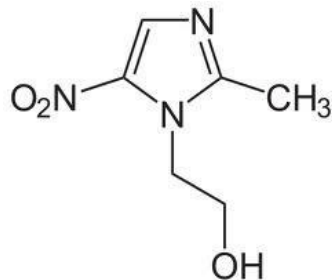


Fig. 5 Molécula de metronidazol

#### 1.1.11.1.2 Efecto de Metronidazol en *Blastocystis* spp.

Se ha visto que, metronidazol induce en *Blastocystis* spp. apoptosis, condensación nuclear, encogimiento celular, deposición a los cuerpos apoptóticos ligados a la membrana y fragmentación de DNA. Este proceso es desarrollado, debido a que, metronidazol entra a la célula y a la mitocondria por difusión simple. En la mitocondria, metronidazol compete eficientemente por los electrones con el aceptor de electrones de la cadena respiratoria. Los organismos susceptibles a 5-nitroimidazoles transfieren electrones generados por su sistema de transporte de electrones al grupo nitro del fármaco y no a su aceptor de electrones natural. La reducción del grupo nitro de metronidazol resulta de la síntesis de radicales citotóxicos



(R-NO<sub>2</sub>). Por tanto, el efecto antimicrobiológico de metronidazol depende de su reducción metabólica (Nasirudden *et al.*, 2004).

### 1.1.11.2. Triazoles.

Los triazoles son moléculas con un núcleo de triazol y los componen un par de compuestos químicos isoméricos con la fórmula molecular C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N<sub>3</sub> con cinco miembros de anillo de dos átomos de carbono y tres de nitrógeno. La importancia de los compuestos triazólicos está dada por sus propiedades terapéuticas como, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antitumoral, anticonvulsionante, antidepresivo, antitubercular, antihipertensivo, analgésico, hipoglicémico, antiparasitario, inhibidor enzimático, herbicida, insecticida, antibacteriana, siendo esta última la más fuerte de sus propiedades. Debido a estas propiedades son bien conocidos como fármacos (Naseer, 2010, Aggawal, *et al.*, 2011).

#### 1.1.11.2.1. 3-Bis-(4-fenil-[1, 2, 3] triazol-1-il)-2- propanol.

Es un compuesto cuyas características fisicoquímicas son: Fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>, p.f.: 196-197°C, peso molecular: 346.38g/mol, espectroscopia de infrarrojo (IR) (KBr): 1600, 2103, 3080, 3220 cm<sup>-1</sup>, pH:7.6, resonancia magnética Nuclear de hidrogeno (H NMR): (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz), 8.49 (s, 2H, H-4), 7.84 (m, 4H, H-3), 7.43 (m, 4H, H-2), 7.30 (s, 2H, H1), 5.79 (m, 1H, H-7), 4.61 (m, 2H, H-5), 4.42 (m, 2H, H-6), resonancia magnética de carbono (C NMR) (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) δ 146.1, 130.7, 128.7, 127.6, 125.0, 122.3, 68.2, 53.1. (Jimenez *et al.* 2011).

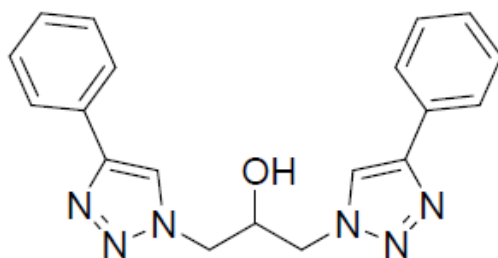


Fig. Estructura del compuesto 1,3-Bis-(4-fenil-[1, 2, 3] triazol-1-il)-2- propanol. (tomada de Jimenez *et al.*, 2011).

### 1.1.12. Evaluación *in vitro*.

La evaluación *in vitro* de la actividad antiparasitaria de los compuestos puede ser determinada por la concentración mínima inhibitoria (CIM) que consiste en la determinación de la concentración del agente químico en un medio adecuado en el que no ocurre desarrollo del microorganismo en particular, mediante un método de dilución sucesiva (Quinlivan *et al.*, 2015).

## CAPITULO II. ANTECEDENTES

### 2.1. Susceptibilidad en *Blastocystis* spp.

Las pruebas de susceptibilidad en *Blastocystis* spp. han sido escasas, en la siguiente tabla<sup>1</sup> se muestran algunos estudios realizados en este parásito.

Autor	Estudio
Balkrishnan <i>et al.</i> , (2016).	En este estudio, se sometieron a análisis el ST1, ST2, ST3 y ST5 de <i>Blastocystis</i> spp., a concentraciones de 0.1mg/mL y 0.0001mg/mL de metronidazol. El estudio demostró que metronidazol en ST3 tiene mayor población de células viables apoptóticas (70%) a las 72 horas, seguido de células de VINA (8%), no viables apoptóticas (12%) y células necroticas (10%). Así mismo, obtuvieron que la fase granular se formó en el 88% de la población en 0.0001mg/mL y el 66% en 0.01mg/mL.
Zerpa <i>et al.</i> , (2012)	Se realizó un análisis de susceptibilidad en <i>Blastocystis</i> spp. con metronidazol, en el que se obtuvo una CIM 90%: 64µg/ml y CIM 50%: 2µg/mL, furazolidona CIM 90%: 8 µg/mL y 50%: 1 µg/mL, Trimetroprim/ Sulfametoxazol CIM 90%:128 µg/mL y 50%:64 µg/mL, Ciprofloxacino CIM 90%:128 µg/mL y 50%: 16 µg/mL. Para <i>E. histolytica-dispar</i> (n=16) obtuvieron con metronidazol una CIM de 90%: 1 µg/mL y 50%: 0.5 µg/mL, furazolidona CIM 90%: 32 µg/mL y 50%: 8 µg/mL, trimetroprim/sulfametoaxol CIM 90%: 128 µg/mL y 50%: 64 µg/mL, ciprofloxacino CIM 90%: 64 µg/mL y 50%: 8 µg/ml y tetraciclina CIM 90%: 64 µg/mL y 50%:

	<p>8 µg/mL, y <i>Balantidium coli</i> una CIM 90% y 50%: 1 µg/mL, furazolidona CIM 90%: 8 µg/mL y 1 µg/mL, trimetoprim/sulfametozaxol CIM: 8 µg/mL y 50%: 0.25 µg/mL, ciprofloxacino CIM 90% :32 µg/mL y 2 µg/mL y tetraciclina CIM 90% y 50%: 0.25 µg/mL. Dado lo anterior, se concluye que metronidazol sigue siendo una buena opción terapéutica,</p>
<p>Roberts <i>et al.</i> (2016)</p>	<p>Se realizó un estudio de susceptibilidad en <i>Blastocystis</i> spp. con los fármacos: metronidazol, paromomicina, ornidazol, albendazol, ivermectin, trimetoprim-sulfametoxazol, furazolidona, nitazoxanida, secnidazol, fluconazol, nistatina, e itraconazol. Se utilizaron las concentraciones de 1µg/mL a 10001µg/mL. En el análisis se obtuvo en metronidazol una CIM desde 250 µg/mL a 64 µg/mL, 125 µg/mL a 32 µg/mL (ornidazol), 64 µg/mL a 16 µg/mL (secnidazol), 1 µg/mL(paramomicina), 64 µg/mL a 16 µg/mL (albendazol), 250 µg/mL a 125 µg/mL) (furazolidona), 500 µg/mL a 250 µg/mL(nitazoxanida), 500 µg/mL a 250 µg/mL(fluconazol), 500 µg/mL a 250 µg/mL(itraconazol) y 250 µg/mL (nistatina). Así como efectos apoptóticos en las células fueron observados a partir de estas concentraciones.</p>
<p>Silva <i>et al.</i> (2016)</p>	<p>Se evaluó la susceptibilidad antiparasitaria <i>in vitro</i> de <i>Blastocystis</i> frente a metronidazol, donde obtuvieron una CIM-90 y CIM-50 de 3.19 y 1.60 µg/ml respectivamente, mientras que la CIM-90 y CIM-50 de nitazoxanida fue de 11.19 y 6.03 µg/ml, para trimetoprim-sulfametozaxol CIM-90 y CIM50 fueron de 256 µg/ml y 128 µg/ml. Estos valores muestran que <i>Blastocystis</i> es susceptible a bajas concentraciones de metronidazol y nitazoxanida; sin embargo, fue resistente a altas concentraciones de trimetoprim-sulfametoxazol y eritromicina.</p>

Nasser (2010)	Evaluaron el efecto antimicrobiológico de 1,2,4- triazoles en <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium italicum</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . En el estudio obtuvieron una CMI = 250 µg/mL, siendo más del 90% en las bacterias en comparación con los cultivos sin estos compuestos.
Vdovenko Y Williams (2000)	Realizaron una prueba de susceptibilidad antiparasitaria en <i>Blastocystis</i> spp. con nueve fármacos: trimetoprim, desacetil-nitazoxanida, nitazoxanida, metronidazol, quinacrina, paramomicina y tetraciclina, demostrando un efecto supresivo en todas las muestras, a excepción de sulfametoxazol y cloroquina quienes no mostraron efecto supresivo en <i>Blastocystis</i> spp.
Roberts et al., (2015)	En el estudio, se obtuvo la CIM para los fármacos: Metronidazol= 64µg/mL-250µg/mL, ornidazol=125µg/mL-32µg/mL, segnidazol= 64µg/mL-16, paramomicina= 1µg/mL, albendazol 64µg/mL-16µg/mL, furazolidona 250µg/mL-125µg/mL, nitazoxanida 500 µg/mL-250 µg/mL y nistatin= 250µg/mL.
Aguilar Y Lucia (2009)	Estudios de caso han mostrado que Nitazoxanida y paramomicina han logrado eliminar la infección contra <i>Blastocystis</i> spp., esta última en pacientes con urticaria. Sin embargo, en Metronidazol se ha observado que la eliminación del parásito ha sido de 88% y al cabo de seis meses después al primer tratamiento 75%.
Francois et al., (2005)	En este estudio, se reportó que Nitazoxanida es una buena opción para tratar la infección contra <i>Blastocystis</i> spp., debido a que, 35 de 36 pacientes tratados con este fármaco, ya no presentaron <i>Blastocystis</i> spp. en sus muestras fecales.

Roberts <i>et al.</i> (2014)	Pacientes tratados con metronidazol de 400mg tres veces al día durante diez días, no eliminaron el parásito. Sin embargo, los pacientes tratados con Nitazoxanida si se erradicó el parásito.
------------------------------	---

Tabla1. Estudios de susceptibilidad en *Blastocystis* spp. ante diferentes fármacos.

Por otro lado, se ha reportado que, *Blastocystis* spp. incrementa el número de células viables para reducir la apoptosis ante metronidazol a bajas concentraciones 64µg/mL-1µg/MI (Durgaha *et al.*, 2012, Roberts *et al.*, 2015).

Así mismo, cuando *Blastocystis* spp. está expuesto a metronidazol se ha observado que se transforma a fase granular, la cual se sugiere que los gránulos lipídicos contenidos en esta fase, tienen un rol en la reproducción de este parásito, debido a que se incrementa el número de *Blastocystis* en un corto periodo de tiempo en cultivo *in vitro* (Dhurga *et al.* 2016).

Sin embargo, la resistencia observada en *Blastocystis* spp. se sugiere que es dependiente del subtipo (ST) del parásito. El ST7 y ST8 se ha reportado que es resistente a metronidazol (Mirza *et al.*, 2011, Mirza *et al.*, 2011).

### III. JUSTIFICACIÓN

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son de importancia médica, en muchos casos vitales para la salud del paciente. Conociendo el agente causal y su comportamiento frente a los antimicrobianos, permite un tratamiento dirigido contra los organismos con fármacos a los cuales el microorganismo ha demostrado ser sensible (Baird & Cann, 2008). Actualmente, el Síndrome de intestino irritable es un padecimiento muy frecuente en la población, estudios realizados mencionan que la prevalencia de infección se efectúa entre el 1.5%-10% en países desarrollados y del 30%-50% en países en desarrollo (Mostafa *et al.*, 2015). Así mismo también, se ha demostrado la presencia frecuente de *Blastocystis* spp. en materia fecal de pacientes con Síndrome de intestino irritable en comparación con un grupo control (Nagel *et al.*, 2015). En México existen pocos estudios enfocados a esta enfermedad y su relación con *Blastocystis* spp., reportes clínicos mencionan que, el fármaco de elección para la quimioterapia de *Blastocystis* spp. es metronidazol u otros nitroimidazoles, sin embargo, este fármaco fue inefectivo en la erradicación de este parásito en los individuos infectados (Zekar *et al.*, 2004). Es por esta razón que se evaluarán los efectos del compuesto triazólico en

comparación con metronidazol en cultivo *in vitro* de *Blastocystis* spp. en muestras de pacientes con Síndrome de intestino irritable.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Los compuestos triazólicos tienen propiedad antiparasitaria, debido a esto, 1,3-Bis-(4-fenil-[1, 2, 3] triazol-1-il)-2- propanol tendrá un efecto en *Blastocystis* spp. probablemente más efectivo que metronidazol.

### **CAPITULO III. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar el efecto de 1,3-Bis-(4-fenil-[1, 2, 3] triazol-1-il)-2- propanol y compararlo con el efecto de metronidazol en cultivo *in vitro* de *Blastocystis* spp. en muestras de pacientes con Síndrome de Intestino Irritable.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Seleccionar una muestra de pacientes con Síndrome de Intestino Irritable, atendidos en el Centro médico ISSEMyM de la ciudad de Toluca, en los que se encuentre *Blastocystis* spp.
- Estandarizar una técnica para el cultivo de *Blastocystis* spp.
- Obtener la concentración mínima inhibitoria para la evaluación de 1,3-Bis- (4-fenil-[1, 2, 3] triazol-1-il)-2- propanol y el metronidazol.
- Probar la efectividad *in vitro* del compuesto y compararlo con concentración mínima inhibitoria de metronidazol.
- Obtener la prevalencia de *Blastocystis* spp. en pacientes con síndrome de Intestino Irritable.
- Comparar la efectividad de los dos compuestos en *Blastocystis* spp.

### **CAPITULO IV. METODOLOGÍA**

Se realizó un estudio prospectivo en pacientes con Síndrome de intestino irritable, provenientes del servicio de gastroenterología del Centro Médico ISSEMyM, durante Abril 2016-Abril 2018.

#### 4.1 Tamaño de muestra

- El tamaño de la muestra fue a conveniencia de acuerdo al número de pacientes con Síndrome de intestino irritable que acudieron al servicio de gastroenterología atendidos por la Esp. Gastrol. Hinojosa González Ruíz y por la Mc. Esp. Gastrol. Priscila Caballero del Centro Médico ISSEMyM del Centro Médico ISEMyM de Toluca, Edo. México.

#### 4.2. Tiempo de muestreo

El estudio se realizó durante Abril 2016 a Abril 2017.

#### 4.3. Variables

Variable	Tipo de variable	Definición operativa	Escala de medición
<b>1,3-Bis-(4-fenil-[1,2,3] triazol-1-il)-2- propanol</b>	Independiente	µg	Cuantitativa de razón
<b>Metronidazol</b>	Independiente	µg	Cuantitativa de razón
<b><i>Blastocystis</i></b>	Dependiente	% de muerte de parásitos	Cuantitativa de razón

\* **Tabla 2.** Variables determinadas en el estudio

#### 4.4. Criterios

##### 4.4.1 Criterios de inclusión

Pacientes que quisieron participar en el estudio diagnosticados con síndrome de Intestino Irritable y que hayan firmado carta de consentimiento informado.

##### 4.4.2. Criterios de exclusión.

Pacientes en tratamiento con metronidazol u otro antiparasitario (automedicación).

##### 4.4.3. Criterios de eliminación.

- a) Pacientes que no tengan diagnóstico de Síndrome de Intestino Irritable.
- b) que tengan SII pero que no quieran participar en el estudio.

#### **4.5. Ética del estudio**

Todos los datos obtenidos en el estudio serán tratados respetando la integridad de los participantes, de acuerdo al código Helsinki (2013) y firmarán la carta de consentimiento informado.

#### **4.6. Selección de pacientes**

##### **4.6.1. Diagnóstico de Síndrome de intestino irritable.**

Para el diagnóstico de Síndrome de intestino irritable, se utilizaron los criterios descritos por Roma (2016) basados en los criterios de Roma IV de Mearin (2016). Donde el SII se diagnostica por la presencia de dolor abdominal recurrente que debe estar presente al menos un día a la semana, con dos o más de las siguientes características:

- a) se asocia a la defecación
- b) está relacionado con un cambio en la frecuencia de las deposiciones
- c) está relacionado con un cambio en la consistencia de las deposiciones.

##### **4.6.1.1. Criterios de Roma IV para el diagnóstico de Síndrome del Intestino Irritable con predominio de estreñimiento.**

Debe haber dolor abdominal recurrente, al menos un día a la semana en los últimos tres meses relacionado con dos o más de los siguientes criterios:

- a) Se relaciona con la defecación
- b) Se asocia a un cambio en la frecuencia de las deposiciones
- c) Se asocia a un cambio en la forma (apariencia) de las deposiciones

En el SII con predominio de estreñimiento más de un 25% de las deposiciones con heces tipo 1 o 2 de Bristol y menos del 25% con heces tipo 6 ó 7 de Bristol, ver fig.2 (el paciente refiere que sus deposiciones alteradas son habitualmente como estreñimiento). El hábito intestinal predominante se basa en la forma de las heces en los días con al menos una deposición alterada.

\*Los criterios deben cumplirse al menos durante los últimos tres meses y los síntomas deben haberse iniciado como mínimo seis meses antes del diagnóstico.



4.6.1.2. Criterios de Roma IV para el diagnóstico de Síndrome del Intestino Irritable con predominio diarrea.

Para este tipo de Síndrome más del 25% de las evacuaciones intestinales son tipo 6-7 Bristol y menos del 25% son tipo 1-2 Bristol

#### **4.7. Toma de muestra**

Se recibirán muestras de materia fecal en serie de tres con los datos personales del paciente:

- a) Nombre
- b) Edad
- c) Diagnostico
- d) proveniencia
- e) No. De registro de unidad Médica
- f) Número telefónico

#### **4.8 Análisis de la muestra**

Las muestras se analizaron en el laboratorio de análisis clínicos Zamser de Ixtlahuaca, Edo. México. El análisis de las muestras fue realizado por el método de diagnóstico de concentración por sedimentación de Ritchie modificado y observación directa.

##### **4.8.1. Método de concentración por sedimentación de Ritchie modificado.**

Se colocó por medio de un abatelenguas, aproximadamente 1g de materia fecal en el vaso para precipitados, se agregó 10mL de solución salina y se homogenizó. Se filtró la suspensión a través de la gasa y se centrifugo durante un minuto a 200 rpm, se decantó. Este procedimiento se repitió hasta que se obtuvo un sedimento más limpio. Posteriormente, se le agregó 10mL de formol al 10% y se dejó en reposo la suspensión a aproximadamente 10 minutos (Fijación). Se decantó el sobrenadante y se extrajo con cuidado el sedimento. Se colocó una gota del sedimento sobre un portaobjetos, agregar una gota de yodo lugol y cubrir con un cubreobjetos. Finalmente se observó en microscopio a objetivos de 40X y 100X.

##### **4.8.1.2. Método de diagnóstico por observación directa en fresco.**

Se colocó por separado en cada extremo de un portaobjeos una gota de solución salina isotónica y otra de lugol. Con el aplicador, se tomó una muestra representativa de heces. Se mezcló con la solución salina isotónica, procurando hacer una suspensión y no un frote. Se quitó de la suspensión fibras y otros fragmentos sólidos. Posteriormente, se colocó el

cubreobjetos y se observó con el objetivo 10x y 40X. Repetir esta operación en la preparación con lugol.

#### 4.9. Identificación de *Blastocystis* spp.

Para el diagnóstico de *Blastocystis* spp. se utilizaron los criterios descritos por Stensvold y colaboradores en el 2008, los cuales son:

Mofotipo	Vacuola central	Pared celular	Número de núcleos
Ameboide	Ausente/Presente	Ausente	1-2
Avacuolar	Ausente	Ausente	1-2
Vacuolar	Presente	Ausente	1-4 o más
Multivacuolar	Ausente	Ausente	1-2
Granular	Presente	Ausente	1-4
Quiste	Ausente	Presente	1-2

Tab. [3] Características de los morfotipos de *Blastocystis* spp.

#### 4.10. Extracción de *Blastocystis* spp.

Para la extracción de *Blastocystis* spp. se realizó una suspensión con 10mL de solución de Locke y 5g de heces, se centrifugo a 3500 rpm. Para extraerlo, se tomó la capa más clara que se formó en la superficie del sedimento en donde se concentró *Blastocystis* spp., posteriormente se colocó en sol. Locke en un tubo con tapa de rosca para conservar las condiciones de anaerobiosis. Todo el proceso anterior se repitió hasta que el sobrenadante quedara claro, posteriormente se incubó el tubo a 36°C en la incubadora Ríos Rotcha en condiciones de anaerobiosis hasta la inoculación.

#### 4.11. Reproducción de *Blastocystis* spp.

##### 4.11.1. Recuento de morfotipos.

Se evaluó la reproducción del parásito, por medio de un recuento de las formas de este organismo de manera manual, con una cámara de Neubauer cada 24hrs en donde se observe

un crecimiento favorable de las formas de *Blasatocystis* spp. para posteriormente someter un número determinado de este organismo a las diferentes concentraciones de metronidazol y el compuesto triazólico. La concentración se obtuvo con la siguiente fórmula:

Cálculo de parásitos/ $\mu$ L sin dilución

$$No. \frac{Parásitos}{\mu L} = \frac{No. Parásitos contados}{4} \times 10$$

#### **4.12. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del compuesto triazólico y metronidazol.**

Se determinó la concentración molar analíticamente del compuesto 1,3-Bis-(4-fenil-[1,2,3] triazol-1-il)-2- propanol y de metronidazol. Posteriormente, se realizó una solución stock de metronidazol (Sigma-Aldrich®) de 4mg/ml y se disolvió en sol. Locke, bajo las siguientes concentraciones: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 500, 1000 ( $\mu$ g /ml). El triazol se disolvió en DMSO al 1% y se diluyó con solución de Locke, obteniendo las concentraciones: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 125, 500, 1000 ( $\mu$ g /ml).

#### **4.13. Inóculo del parásito**

**4.13.1.** Se realizó un microcultivo en microplacas de 96 pozos, a las cuales en cada pozo se le añadieron 100 $\mu$ L de medio de cultivo con una concentración aproximada 325 parásitos/10 $\mu$ L m1, 312.5 parásitos/10 $\mu$ L m2, 150 parásitos/10 $\mu$ L m3, 300 parásitos/10 $\mu$ L m4, 212.5 parásitos/10 $\mu$ L m5 y 100 $\mu$ L de las concentraciones de los compuestos: triazólico y metronidazol, todo el análisis se realizó por triplicado. Como testigo se llenó una cuarta columna, en donde se colocó la misma cantidad de parásitos en cada una de las muestras, sin ninguno de los compuestos a probar. Los parásitos fueron incubados a 36°C y se determinó la concentración y viabilidad del parásito cada 12 horas durante 48 horas.

#### **4.14. Viabilidad del parásito**

La viabilidad y concentración fue determinada por el método de exclusión azul tripan para la viabilidad celular (Strober, 2001) \*

\* Las células teñidas con azul tripan son células no viables y las células que no se tiñan son células viables.

Durante el tiempo de incubación, se realizó un conteo de las formas vivas y muertas de *Blastocystis* spp. cada 12hrs de manera manual con una cámara de Neubauer a la que se le

añadieron 10µL de medio y azul tripan por capilaridad. Se observó a microscopio en objetivos de 10X y 40X. Se contaron las formas del parásito de los cuatro cuadrantes primarios de las esquinas de la cámara. Se Realizaron los cálculos necesarios:

- Fórmula 1. (Cuadros 4x4) morfotipos del parásito por mL.

$$\frac{\text{Morfotipos del parásito vivos}}{\text{Cuadros } 4 \times 4} \times \text{Factor de dilución} \times 10000$$

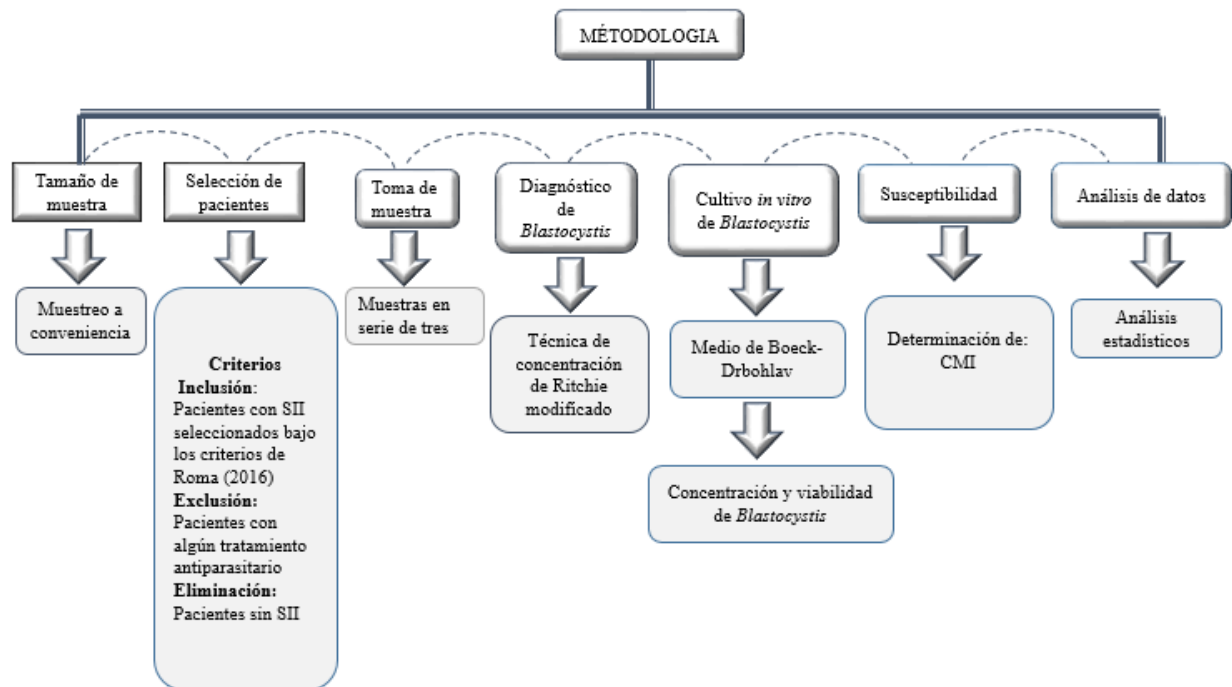
- Fórmula 2. Morfotipos del parásito totales.

$$\text{Morfotipos del parásito por mL} \times \text{Volumen mL}$$

#### 4.15. Obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria.

6.13.3 Se determinó el porcentaje de muerte de las formas del parásito. Se realizó la curva de concentración-respuesta.

#### 4.16. Diagrama de flujo de la metodología



## CAPITULO V. RESULTADOS

### 5.1 Artículo

#### **Evaluation of the effect of 1,3-Bis-(4-phenyl-[1,2,3] triazole-1-il)2-propanol in comparison with metronidazole in an *in vitro* culture of *Blastocystis* in samples of patients with Irritable Bowel Syndrome**

García-Flores L<sup>1</sup>, Santillán-Benítez JG<sup>2</sup>, Hernández-Navarro MD<sup>2</sup>, Cuevas-Yáñez E<sup>2</sup>, Caballero-Vásquez P<sup>3</sup>, Zamudio-Chávez S<sup>3</sup>, Morales-Ávila E<sup>3</sup>.

Faculty of Chemistry, Autonomous University of the State of Mexico (UAEMex)<sup>1</sup>, ISSEMyM Medical Center<sup>2</sup>. HGI Valentín Gómez Farías<sup>3</sup>

#### SUMMARY

Introduction. Metronidazole is the most-used pharmaceutical for the treatment of infection by *Blastocystis*. However, studies have reported resistance of the microorganism towards this pharmaceutical. In Mexico, studies concerning the prevalence of this parasite and its relationship to Irritable Bowel Syndrome have been carried out. **Objective.** To evaluate the *in vitro* effect of metronidazole and the compound 1,3-Bis-(4-phenyl-[1,2,3] triazole-1-il)2-propanol over *Blastocystis*, as well as the prevalence of *Blastocystis* in patients with Irritable Bowel Syndrome. **Materials and Methods.** A prospective, transversal study (April 2016 – April 2017) of 51 samples of patients with Irritable Bowel Syndrome, obtained from the ISSEMyM Medical Center in Toluca, Mexico. The identification of *Blastocystis* was done in three serial stool samples through direct microscopic examination and the Ritchie technique. The *in vitro* susceptibility test towards metronidazole and the triazolic compound was done through a microculture in concentrations of 1 to 1000 µg/mL, each one in triplicate. **Results.** A 31.3% prevalence of *Blastocystis* was observed in the population, with greater prevalence in women (30.2%) than in men (25%). In the susceptibility test, a CL<sub>50</sub> of 64 µg/mL was obtained for metronidazole, in comparison to the CL<sub>50</sub> of 250 µg/mL for 1,3-Bis-(4-phenyl-[1,2,3] triazole-1-il)2-propanol. **Conclusion.** Metronidazole continues to be the best option for the treatment of infection by *Blastocystis*.

Key words: *Blastocystis*, Irritable Bowel Syndrome, triazole, metronidazole, susceptibility

## INTRODUCTION

*Blastocystis* is a eukaryotic, anaerobic, chromist parasite that infects a great variety of vertebrates, including humans. This parasite is characterized by its vacuolar, granular, ameboid, cystic, multivacuolar and avacuolar forms. The last two forms are exclusive to the *in vitro* culture [1]. Its transmission mechanism is fecal-oral, in the form of a cyst, when ingesting contaminated water and food. Its prevalence is higher in developing countries (60%) than in developed countries (10%) [2] and tropical and subtropical climates [3]. The most common clinical manifestations associated to a *Blastocystis* infection are a variety of gastrointestinal disorders, including diarrhea, abdominal spasms, fatigue, constipation, flatulence, nausea, cutaneous allergies [4, 5, 6, 7] and, in recent years, Irritable Bowel Syndrome, characterized by inflammation, abdominal distension, presence of recurrent abdominal pain associated to alterations of the depositional rhythm, be this in the form of constipation, diarrhea or both (constipation with diarrhea) [8, 9, 10, 11]. This association is attributed to the infection, given that forms of *Blastocystis* have been found in stool samples of patients with IBS in comparison to the control group [12].

The treatments that has been used for infection by *Blastocystis* have been pharmaceuticals such as metronidazole, nitazoxanide, trimethoprim-sulfamethoxazole, paromomycin, iodoquinol, ketoconazole, secnidazole, emetine, tinidazole and the probiotic *Saccharomyces boulardii*, of which metronidazole is the pharmaceutical of choice to treat the infection [13]. Metronidazole belongs to the nitroimidazoles and is used to treat infections by anaerobic microorganisms, such as parasites and bacteria. It possesses a variety of functional groups and two hydrogen atoms coordinated to the imidazole ring [14].

Triazoles, on the other hand, are molecules with a triazole core and are composed by a pair of isomeric chemical compounds with the molecular formula  $C_2H_3N_3$ , with a 2-carbon, 3-nitrogen ring. The importance of these triazolic compounds is given by its therapeutic properties as an: antifungal, antiviral, anti-inflammatory, anticarcinogenic, anticonvulsive, antidepressant, antitubercular, antihypertensive, hypoglycemic, antiparasitic, enzyme inhibitor, herbicide, insecticide and antibacterial agent. Because of such properties, they are considered “privileged” molecules and are used frequently in the pharmaceutical industry [15, 16, 17].

The purpose of this work was to evaluate the effect of 1,3-Bis-(4-phenyl-[1,2,3] triazole-1-yl)2-propanol and compare it with metronidazole, in regard to the *in vitro* culture of *Blastocystis* in samples of patients with Irritable Bowel Syndrome.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Population and sample**

A cohort study of patients with IBS was carried out over a year (April 2016 – April 2017), in the gastroenterology department of the State of Mexico Institute of Social Security Medical Center, in the city of Toluca, where 321 patients were received during the sampling period, were diagnosed based on the Rome IV criteria (2016). The patients diagnosed with IBS were selected under the following inclusion criteria: patients with IBS, exclusion criteria: patients under treatment with metronidazole or another antiparasitic agent (automedication), elimination criteria: patients with no diagnosis of Irritable Bowel Syndrome and patients that present IBS but would not like to participate in the study. Of the sample size (321 patients), only 51 patients participated in the study and signed a letter of informed consent for the donation of three serial stool samples.

#### **1. Rome IV criteria used for the diagnosis of IBS.**

Diagnosis of Irritable Bowel Syndrome. It is diagnosed by the presence of recurrent abdominal pain that must be present at least one day a week, with two or more of the following characteristics: a) associated to defecating, b) related to a change in the frequency of deposition, c) related to a change in the consistency of the depositions. It can be predominantly constipation, where more than a 25% of the depositions are Bristol type 1 or 2 feces and less than 25% are Bristol type 6 or 7 feces. On the other hand, there are those associated predominantly to diarrhea, in which more than 25% of the intestinal evacuations are Bristol type 6 or 7 and less than 25% are Bristol type 1 and 2. The criteria must be met at least during the first three months and the symptoms must have initiated at least six months prior to diagnosis. As for the requirements of duration of the symptoms, it must be considered that the criteria must be met during the first three months and must have started at least six months before diagnosis.

#### **2. Detection of Blastocystis in stool samples**

A total of 51 samples were analyzed through direct microscopic examination, previously described by Beltran et al. (2013) and concentrated through the Ritchie sedimentation method, as indicated in the Laboratory Procedure Manual for the Diagnosis of Intestinal Parasites in Man (No. 37). The samples were observed through an electronic NIKON microscope, with a 40X objective. The analyses were carried out at the Zamser Clinical Analysis Laboratory (sanitary license: 19782).

### **3. Extraction of *Blastocystis***

For the extraction of *Blastocystis*, a 10-mL saline solution suspension of 5 g of stool was prepared, and was then centrifuged at 3500 rpm. To extract it, the layer that formed in the sediment where *Blastocystis* concentrated, was taken. The extract was afterwards placed in Locke solution within a capped test tube in order to conserve the conditions of anaerobiosis. The entire process aforementioned was repeated until the supernatant became transparent. Posteriorly, the tube was incubated at 36° C in a Rios Rotcha incubator in anaerobic conditions until inoculation.

### **4. Susceptibility of *Blastocystis***

#### **Inoculation of the parasite**

A microculture was prepared using Boeck-Drbohlav media in a sterile 96-well microplate. Each well was inoculated with 100 µL of media with a concentration of 325 parasites/10µL (M1), 312.5 parasites/10µL (M2), 150 parasites/10µL (M3), 300 parasites/10µL (M4), 212.5 parasites/10µL (M5) and 100 µL of Locke solution for each one of these, with concentrations of 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 250, 500 and 1000 µg/mL, prepared through double dilution of metronidazole acquired from Sigma-Aldrich and 1,3-Bis-(4-phenyl-[1,2,3] triazole-1-il)2-propanol (synthesized by Dr. Erick Cuevas Yañez). The analyses was carried out in triplicate.

As a control, a fourth column was filled, in which the same quantity of parasites was placed for each of the sample without any of the test compounds. The parasites were incubated at 36° C in the Rios Rotcha incubator in anaerobic conditions during 48 hours and were evaluated each twelve hours.



## 5. Viability of the cells

In order to determine the viability of the parasites, the trypan blue technique was used [18]. 10 mL of the media were taken, stirring the sediment in order to obtain a uniform distribution, to which 10  $\mu$ L of trypan blue solution were added. The Neubauer chamber was filled through capillarity and the count of the morphotypes was carried out each 12 hours.

## 6. Statistical analysis

In order to obtain the prevalence of *Blastocystis*, the number of patients with presence of *Blastocystis*, divided by the total of patients analyzed, multiplied by one-hundred percent, was calculated. To determine if there was a difference in the prevalence of parasites found, A t-student test was carried out.

## RESULTS

### Characteristics of the population

In the sampled population, an n=51 patients was obtained, which complied with the Rome IV criteria, as shown in Table 1.

Table 1. Demographic characteristics and diagnosis evaluated in patients with IBS.

Characteristics of the patients with IBS	
	Sample (n=51)
Gender	
Femenine/Masculine	43/8
Age (years)	
Mean $\pm$ SD.	56 $\pm$ 13
Range	28-76

Diagnosis of IBS depending on the type of feces in the Bristol scale	
Prevalence (%): Femenine/masculine	84.3/15.7
<b>IBS-C</b>	
more than 25% are Bristol type 1 or 2 feces	30
less than 25% with Bristol type 6 or 7 feces	30
Average	15
No. Patients: Femenine/Masculine	26/4
Total prevalence(%):	58.8
Prevalence(%): femenine/masculine	60.5/50
<b>IBS-D</b>	
More than 25% of the intestinal evacuations are Bristol type 6 or 7	17
Less than 25% are Bristol type 1 or 2	17
Average	8.5
No. Patients: Femenine/Masculine	15/2
Total prevalence(%)	33.3
Prevalence(%): femenine/masculine	34.9/25
<b>IBS-M</b>	
More than 25% are Bristol type 1 or 2 feces	4
More than 25% are type 6 or 7 feces	4
Average	2
No. Patients: Femenine/Masculine	2/2
Total prevalence (%)	7.9
Prevalence(%): femenine/masculine	4.6/25

From the 51 patients, Table 2 was obtained, with data related to the diagnosis of IBS.

Diagnosis de IBS	No. patients	Prevalence (%)	Femenine (%)	Masculine (%)	Average	+ -
IBS-C	28	54.9	49.0	5.8	14	15.6
IBS-D	13	25.4	21.5	3.9	2	0
IBS-M	4	7.8	3.9	3.9	2	0
IBS-I	6	11.7	9.8	1.9	6	7.1

Table 2 shows the characteristics that were observed in the studied population, in which IBS-C is the most predominant in patients with IBS and women have the highest incidence of IBS. It is also observed that *Blastocystis* is more present in women than in men.

### Diagnosis of *Blastocystis*

A total of 51 samples of patients with Irritable Bowel Syndrome were analyzed, in which *Blastocystis*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Ascaris lumbricoides* and *Giardia lamblia* were identified, as shown in Table 3.

### Prevalence of *Blastocystis* and other parasites found

Species of parasite	No.	Prevalence (%)	Femenine (%)	Masculine (%)	P
<i>Blastocystis</i>	16	31.3	30.23	25	0.0001
<i>E.nana</i>	3	5.8	6.9	0	0.0001
<i>E. coli</i>	3	5.8	6.9	0	0.0001

<i>G. lamblia</i>	1	1.9	0	12.5	0.0001
<i>A. lumbricoides</i>	1	1.9	0	12.5	0.0001

Table 3. Prevalence of *Blastocystis* and other intestinal parasites found in patients with Irritable Bowel Syndrome. It can be observed that *Blastocystis* is the parasite with the highest prevalence in comparison with the other parasites found. It can also be noted that women present higher incidence of infection by *Blastocystis*.

### Extraction of *Blastocystis*

For each of the samples, 15 mL of *Blastocystis* concentrate was extracted, with an average of 325 parasites/10  $\mu$ L (M1), 312.5 parasites/10  $\mu$ L (M2), 150 parasites/10  $\mu$ L (M3), 300 parasites/10  $\mu$ L (M4) and 212.5 parasites/10  $\mu$ L (M5).

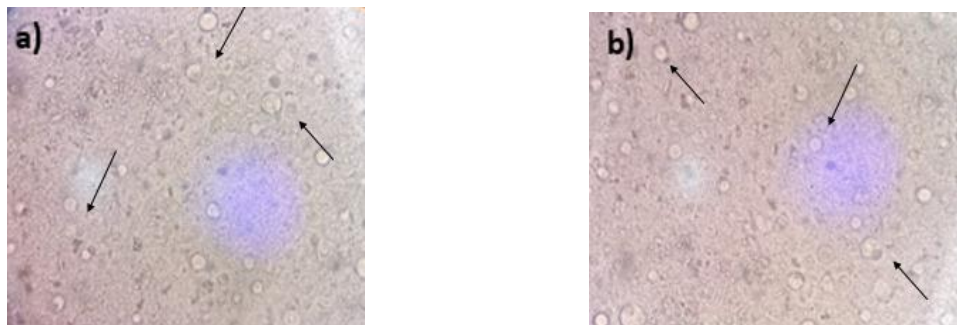


Figure 1(a) and 1(b) show extraction of *Blastocystis*, in which the concentrate that was obtained from the samples for the inoculation of the microculture can be seen.

## Determination of the Minimum Inhibitory Concentration

Determination of the MIC					
Pharmaceutical	M1	M2	M3	M4	M5
Metronidazole	64µg/mL	64µg/Ml	32µg/mL	64µg/mL	64µg/mL
1,3-Bis-(4-phenyl-[1,2,3] triazole-1-il)2-propanol	-	250 µg/Ml	250 µg/mL	250 µg/mL	250 µg/mL

Table 4. Determination of the MIC, in which an MIC of 64µg/mL was obtained for metronidazole in majority of the samples, except in M3; the MIC for 1,3-Bis-(4-phenyl-[1,2,3] triazole-1-il)2-propanol was of 250 µg/mL. However, in M1 there was no inhibition.

## DISCUSSION

In the results obtained, the sampled population (n=51), IBS was more present in women (84.3%) than in men (15.7%). Likewise, IBS-C is the most prevalent form of IBS (58.8%) in men (50%) as well as women (60.5%), in comparison with IBS-M (7.9%) for both genders. This is corroborated with that reported by Schmulson and Drossman in 2017 [19], who described that Irritable Bowel Syndrome (IBS) is the gastrointestinal disorder with the highest incidence in the human population, in which Irritable Bowel Syndrome associated to constipation (IBS-C) is the most predominant in patients with IBS. Also, IBS can be present in people ages of 28-76 years, with an average age of 56 years.

*Blastocystis* is the parasite with the highest prevalence in patients with Irritable Bowel Syndrome (IBS), when compared to the control group [20, 21]. In a study carried out in patients with IBS, the prevalence of *Blastocystis* was of 13.6% [22]. In Mexico, it has been reported that *Blastocystis* has a prevalence of 31% in patients with IBS [23]. In the present work, the prevalence of *Blastocystis* was of 31.3% in patients with IBS, in comparison with other intestinal parasites such as *Entamoeba coli* (5.8%), *Endolimax nana* (5.8%), *Ascaris lumbricoides* (1.9%) and *Giardia lamblia* (1.9%). Likewise, *Blastocystis* was more present in women (30.23%) than in men (25%) (see Table 1). Taking into account the prevalence presented in both studies, it can be observed that it is very similar. It has been described that the high prevalence of *Blastocystis* is linked to the coexistence with animals, lack of

hygiene and consumption of contaminated water and food [24, 25]. When compared to the prevalence seen in developing countries (30-60%) [2], it can be observed that the prevalence of *Blastocystis* is within that previously established. However, based on the results obtained, it is the parasite with the highest prevalence in patients with IBS.

As for the extraction of *Blastocystis*, there are no specialized methods of extraction for this parasite. However, there are specialized methods for its identification, such as polymerase chain reaction (PCR) [26], immunofluorescence assay, lugol stain, direct observation and trichrome stain [27]. In the present work, the extraction was done in order to obtain a greater concentration in the number of microorganisms and have a cleaner microculture. This process was carried out through repeated rinses and centrifugations of the sample, and allowed for the omission of a previous culture in order to obtain a greater number of microorganisms. This technique facilitated the acquisition of a *Blastocystis* culture that does not have to be prepared directly from the sample and thus reduces the risk of culture contamination.

Metronidazole is the antibiotic most widely accepted for the treatment of an infection by *Blastocystis* [28]. Clinical reports have shown that at least 80% of the patients treated with metronidazole has achieved the elimination of the parasite in stool samples 6 months later [29]. However, in patients with IBS, 60% presented resistance to 0.1mg/mL of metronidazole (in Indonesia, a resistance to 1.0 mg/mL was observed) [13]. In the study carried out, an MIC of 64  $\mu$ g/mL was obtained for metronidazole at 48 hours (see Table 4), but in sample 3, there was an MIC from 32  $\mu$ g/mL onwards. Likewise, it was observed that in low concentrations of 1-2  $\mu$ g/mL, there were not adverse effects over *Blastocystis*. With the compound 1,3-Bis-(4-phenyl-[1,2,3] triazole-1-yl)2-propanol, an MIC of 250  $\mu$ g/mL was obtained for M2, M3, M4, M5 and for M1, no susceptibility in *Blastocystis* was observed. It is possible that this is a result of resistance to the compound. It has been described that this parasite has presented resistance to some pharmaceuticals such as metronidazole [30, 31] and that it should not be the first therapeutic choice, due to the fact that there is not a complete eradication of the parasite [32]. This parasite has demonstrated resistance in some cystic and ameboid forms, to 0.01 mg/mL of metronidazole [33]. Reports on the *in vitro* susceptibility of *Blastocystis* have described that the resistance towards metronidazole is generated in accordance to the subtype. These reports mention that the ST7 subtype is the most pathogenic and resistant to metronidazole, while ST4 has demonstrated to be susceptible [34, 35, 36]. In the results obtained, comparing both compounds, for 1,3-Bis-(4-phenyl-[1,2,3] triazole-1-yl)2-propanol, resistance was observed with M1, while with metronidazole, an MIC was obtained for all samples. Thus, comparing both compounds, it can be stated that metronidazole continues to be the better option for the treatment of an infection

by *Blastocystis*, with an MIC of 64 µg/mL. However, studies of subtypification are necessary in order to determine which subtypes were those that present susceptibility towards both compounds. It is likewise necessary to carry out *in vivo* studies in order to evaluate toxicity and pharmacokinetics, as well as any adverse effects of the novel compound.

## CONCLUSION

Blastocystis is the most prevalent parasite in patients with IBS in Mexico and metronidazole continues to be the best option as a treatment for an infection by Blastocystis, when compared with the compound 1,3-Bis-(4-phenyl-[1,2,3] triazole-1-yl)propanol. However, studies of subtypification are still needed in order to determine which subtypes present susceptibility towards both compounds. Likewise, *in vivo* studies are recommended in order to analyze of the effects of the novel compound in greater detail.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To CONACyT, chemist Zamudio-Chávez of HGI Valentín Gómez Farías, to the Zamser Clinical Analysis Laboratory of Ixtlahuaca and to Caballero-Vásquez, P.MD, of the ISSEMyM Medical Center of Toluca, Mexico.

## REFERENCES

- [1] Tan KS, Singh M, Yap H. Recent advances in Blastocystis hominis research: hot spots in terra incognita. Int J Parasitol. 2002; 32:789-804.
- [2] Khoshnood S, Rafiei A, Saki J, Alizadeh K. Prevalence and Genotype Characterization of Blastocystis hominis Among the Baghmalek people in Southwestern Iran in 2013-2014. Microbiol. 2015; 8(10): e23930.
- [3] Duda A., Kosick D., Lanocha N., Kolodziejczyk L., Lanocha A. (2015) The prevalence of Blastocystis hominis and Other Protozoan Parasites in soldiers Returning from Peacekeeping Missions. Am. J. Trop. Med. Hyg. 92(4):805-806.
- [4] Ramirez M, Hernandez R, Lopez E, Moncada D, Rodriguez A, Pagaza C, Gonzales A, Flisser A, Kawa A, Maravilla P. Parasites in Mexican patients with irritable bowel syndrome: a case-control study. Parasit Vectors. 2010; 96 (3):1-3.
- [5] Shawky A, Maha M, Reham A, Mohamed H. The pathogenic role of different Blastocystis hominis genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. Arab J Gastroenterol. 2011;12: 194-200.
- [6] Stark D, Van Hal S, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Irritable bowel syndrome: A review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. Int J Parasitol. 2007; 37:11-20.

- [7] Rajic B, Arapovic J, Raguz K, Boskovic M, Babic S, Maslac S. Eradication of *Blastocystis hominis* prevents the development of simtomatic Hashimoto's thyroiditid: a case report. *J Infect Dev Ctries*. 2015; 9(7):788-791.
- [8] Mearin F., Ciriza C., Mínguez M., Rey E., Mascort J, Peña E., Cañones P., JúdezJ. (2016) Guía de Práctica Clínica: Síndrome del intestino irritable con estreñimiento y estreñimiento funcional en adultos. *Rev Esp Enferm Dig*. 6 (108):332-363.
- [9] Longstreth G., Thompson W., Chey W., Houghton L., Mearin E., Spiller R. (2006) Functional bowel disorders. *Gastroenterology*. 130(5):1480-91. doi:10.1053/j.gastro.2005.11.061
- [10] Sinagra E, Pompei G, Tomasello G, Cappello F, Morreale G, Amvrosiadis G, Rossi F, Lo monte A, Rizzo A, Raimondo D. Inflammation in irritable bowel syndrome: Myth or new treatment target? *World J Gastroenterol*. 2016; (7):2242-2255.
- [11] Occhipinti K, Smith J. Irritable Bowel Syndrome: A Review and Update. *Clin Colon Rectal*. 2012; 25:46-52.
- [12] Das R, Khalil S, Mirdha B, Makharia G, Dattagupta S, Chaudhry R. Molecular Characterization and Subtyping of *Blastocystis* Species in Irritable Bowel Syndrome Patients from North India. *PLoS ONE*. 2016; 11(1): e0147055.
- [13] Sekar U, Shanthi M. *Blastocystis*: Consensus of treatment and controversies. *Trop parasitol*. 2013; 3(1):35-39.
- [14] Quinlivan J., Wu J. y Upmancis R. (2015) Crystal structure of metronidazolium tetrachloridoaurate. *Acta Cryst*. 71: 810-812.
- [15] Keri R., Patil S., Budagumpi S. Nagaraja B. (2015) Triazole: A Promising Agent. *Chem Biol. Drug Des*. 86(4):410-23.
- [16] Miceli M. and Kauffman C., (2015) Isavuconazole: A New Broad-Spectrum Triazole Antifungal Agent. *Clin Infect Dis*. 61(10): 1558-65.
- [17] Ye W., Yao Q., Yu S., Gong P., Qin M., (2017) Synthesis and Antitumor Activity of triazole-Containing Srafennib Analogs. *Molecules*. 22(10): E1759.
- [18] Strober W. 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols Immunology* 21(3B): A.3B.1–A.3B.2.
- [19] Schmulson and Drossman. (2017) What is New in Rome IV. *Journal of Neorogastroenterology and Motility*. 33(2): 2093-0887.
- [20] Yakoob J., Jafri W. Jafri N., Khan R., Islam M., Beg M., Zaman V. (2004) Irritable bowel síndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. *The American journal of tropical medicine and higiene*. 70(40):383-5.
- [21] Ustün S. y Turgay N. (2006) *Blastocystis hominis* and bowel diseases. *Turkiye Parasitol Derg*. 30(1):72-6.
- [22] Tungtrongchitr A., Manatsathi S., Kositchaiwat C., Ongrotchanakun J., Munkong N., Chinabutr P., Leelakusolvong E., Chaicumpa W. (2004) *Blastocystis hominis* infection in irritable bowel síndrome patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*.35(3):705-10.



- [23] Jiménez G., Martínez F., Reyes G., Ramírez M., Arroyo E., Romero V., Stark D., Souza S., Martínez H., Elisser A., Olivo A., Maravilla P. (2012) Blastocystis infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican Patient population population. *Parasitol Res.* 110(3):1269-75. doi: 10.1007/s00436-011-2626-7
- [24] Beyham Y, Yilmaz H, Cengiz Z, Ekici A. Clinical significance and prevalence of Blastocystis hominis in Van, Turkey. *Saudi Med J.* 2015; 9(36):1118-1121.
- [25] Mostafa S, Abd K, Salah Z, Mostafa S. Prevalence and diagnostic approach for a neglected protozoa Blastocystis hominis. *Asian Pac J Trop Dis.* 2015; 5(1):51-59. doi: 10.1016/S2222-1808(14)60626-5
- [26] Stensvold R., Brillowska D., Nielsen H., Arendrup M. (2006) Detection of Blastocystis hominis in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol.* 92(5):1081-7. doi: 10.1645/GE-840R.1
- [27] Dogruman A., Simsek Z., Boorum K., Ekici E., Tuncer C., Kustimur (2010) Comparison of methods for detection of Blastocystis infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PLoS One* 5(11):e15484. doi: 10.1371/journal.pone.0015484v
- [28] Roberts T., Stark D., Harkness J. y Ellis J. (2014) Update on the pathogenic potential and treatment options for Blastocystis sp. *Gut Pathogens.* 6:17.
- [29] Aguilar C. y Lucia J. (2009) An Overview of Blastocystis hominis Infection and Published Experience in Hemophilic Population. *Journal of Coagulation Disorders.* *Journal of coagulation disorders.* 000(000):1-4.
- [30] Batista L., Pérez J., Rosinach M., Gonzalo E., Sainz E., Loras C., Forné M., Esteve M., Fernández F. (2017) Low efficacy of metronidazole in the eradication of Blastocystis hominis in symptomatic patients: Case series and systematic literature review. *Gastroenterol Hepatol.* 40(6):381-387.
- [31] Tamalee R., Ellis J., Harkness J., Marriott D. y Stark D. (2014) Treatment failure in patients with chronic Blastocystis infection. *63: 252-257.* doi: 10.1099/jmm.0.065508-0.
- [32] Tamalee R., Stephen B., Ellis J., Harkness J., Stark D. (2015) In vitro Antimicrobial Susceptibility Patterns of Blastocystis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 59(8): 4417-4423. doi: 10.1128/AAC.04832-14
- [33] Yakoob J., Abbas Z., Asim M., Naz S., Awan S., Hamid S. Jafri W. (2011) In vitro sensitivity of Blastocystis hominis to garlic, ginger, White cumin, and black pepper used in diet. *Parasitol Res.* 109:379-385.
- [34] Mirza H., D. J., Upcroft J., Tan K. (2011) A Rapid, High-Throughput Viability Assay for Blastocystis spp. Reveals Metronidazole Resistances and Extensive Subtype-Dependent Variations in Drug Susceptibilities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2 (5): 637-648
- [35] Mirza H., Tan K. (2014) Intra-Subtype Variation in Enteroadhesion Accounts for Differences in Epithelial Barrier Disruption and is Associated with Metronidazole Resistance in Blastocystis Subtype-7 *8(5): e2885.* doi: 10.1371/journal.pntd.0002885
- [36] Wu Z., Mirza H., Tan K, (2014) Intra-Subtype variation in enteroadhesion accounts for differences in epithelial barrier disruption and is associated with metronidazole resistance in Blastocystis subtype-7. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(5): e2885. doi: 10.1371/journal.pntd.0002885

[22] Manatsathit S., Kositchaiwat C., Ongrotchnakun J., Munkong N., Chinabutr P., Leelakusolvong S. (2004) Blastocystis hominis infection in irritable bowel syndrome patients. The southeast Asian Journal of tropical medicine and public health. 35(3): 705-10.

## 5.2. REFERENCIAS

Aggawal, N., Kumar, R., Dureja, P., Y Kurana, J., (2011). Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR analysis of novel nalidixic acid based 1,2,3- triazole derivatives. *European Journal Medical of Chemistry*, 46, 4089-4099.

Aguilar, C., Y Lucia, J., (2009). An Overview of *Blastocystis hominis* Infection and Published Experience in Hemophilic Population. *Journal of Coagulation Disorders. Journal of Coagulation Disorders*, 000(000),1-4.

Al-Fellani, M., Khan, A., Gazoui, R., Zaid, M., Y Ferjani, M. (2007). Prevalence and Clinical Features of *Blastocystis hominis* Infection among Patients in Sebha, Libia. *Clinical and Basic Research*, 1(7), 35.40.

Andiran, N., Cibali, A., Turkay, S. Y Andiran, F. (2006). *Blastocystis hominis*- an emergin and imitating cause of acute abdomen in children. *Journal pediatric Surgery*, 41, 1489-1491.

Audebert, C., Even, G., Y Cian, A., The *Blastocystis* investigation Group, Loywick A., Merlin, S., Viscogliosi, E., Y Chabe, M. (2016). Colonization with the enteric protozoa *Blastocystis* is associated with increased diversity of human. *Scientific reports*, 6, 25255.

Bart, A., Wentink, Bonnema, E., Gilis, H., Verhaar, N., Wassenaar, C., Vugt, M., Goorhuis, A., Gool, T. (2013). Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. In 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *Biomed Central Infectious Diseases*, (13) 389,1471-2334.

Barret, H. (1921). A method for the cultivation of *Blastocystis*. *Annales of Tropical Medical Parasitology*, 15, 113-116.

Balkrishnan, D., Suresh, K., Y Chye, T. (2016). Granular Formation during Apoptosis in *Blastocystis* sp. Exposed to Metronidazole (MTZ). *PloS One*, 11(7), e0155390.

Beltran, M., Casanova, R., Y Naquirá, C. (2003) Manual de procedimientos de laboratoeio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre. *Nacional de Salud*. MPR-CNSP-015.

Boorom, K., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Spanakos, G., Parkar, U., Zhou, X., Leelayoova, S., Y Jones, M. (2008). Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, Blastocystis, and asymptomatic infection. *Parasites & vectors*, 40(1), 1-16.

Boreham P., Y Stenzel D. (1993). Blastocystis in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Advances in Parasitology*, 32, 1-70.

Casero, R., Mongi, F., Sánchez, A., Y Ramírez, J. (2015). Blastocystis and urticaria: Examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. *Acta Tropica*, 148,156-61.

Das, R., Khalil, S., Mirdha, B., Makharia, G., Dattagupta, S., Y Chaudhry, R. (2016). Molecular Characterization and Subtyping of Blastocystis Species in Irritable Bowel Syndrome Patients from North India. *PLoS ONE*, 11(1), e0147055.

Del Coco, V., Molina, N., Basualdo, J., Y Córdoba, M. (2017). Blastocystis spp.: avances, controversias y desafíos futuros. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1),110-118.

Dhurga, D., Suresh, K., Tan, T., Y Chandramathi, S. (2015). Apoptosis in *Blastocystis* spp. Is related to subtype. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106, 725-730.

Dhurga, B., Suresh, K., Y Tan, T. (2016). Granular Formation during Apoptosis in *Blastocystis* sp. Exposed to Metronidazole (MTZ). *PLoS One*, 11(7), e0155390.

Duda, A., Kosick, D., Lanocha, N., Kolodziejczyk, L., Y Lanocha, A. (2015). The prevalence of Blastocystis hominis and other protozoan parasites in Soldiers Returning from peacekeeping Missions. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(4),805-806.

Dvenko, A., Y Williams, J. (2000). *Blastocystis hominis*: neutral red supravital staining and its application to intro drug sensivity testing. *Parasitology Research*, 86, 573-581.

El- Salhy, M. (2012) Irritable Bowel Syndrome: Diagnosis and pathogenesis. *World Journal Gastroenterology*, 18(37), 5151-5163.

El safadi, D., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Dabboussi, F., Seck, M., Hamze, M., Riveau, G., Y Viscogliosi, E. (2014). Children of Senegal river River

Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. Ever observed worldwide. *BMC Infectious Diseases*, 164(14), 1471-2434.

Ertug, S., Ertabaklar, H., Y Gultekin, B. (2009). The effect of trimethoprim-sulfamethoxazole in *Blastocystis hominis* infection. *Turkiye Parazitoloji Derguesi*, 33(4), 270-2.

Foad, A., Basyoni, M., Fahmy, R., Y Kobaisi, H. (2011). The patogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolate from patients with irritable bowel syndrome. *Arab Journal of Gastroenterology*. 12, 194-200.

Francois, J., Kambil, S., Said, M., Samir, H., Y Younis, A. (2005). Effect of Nitazoxanide in Persistent Diarrhea and Enteritis Associated with *Blastocystis hominis*. *Clinical Gastroenterology and hepatology*, 10(3), 987-991.

Gallegos, L., Gonzalez, A., Urbina, T., Gonzales, E., Gómez, L., Y Arroyo, G. (2013). Comparación de la eficacia de tres medios de cultivo in vitro para el desarrollo de *Blastocystis* spp. *Revistas de Investigaciones veterinarias del Peru*, 24(4), 480-488.

González, J., Pérez, V., Jiménez, D., Lopez, G., Corona, D., Y Cuevas, E. (2011). Effect of temperature on triazole and bistriazole formation through copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition. *Tetrahedron Letters*, 52, 3514-3517.

Hilmi, A., Cekin, Y., Adakan, Y., Tasdemir, E., Gulsun, F., Y Oguz, B. (2012). *Blastocystis* in patients with gastrointestinal symptoms: a case-control study. *Biomed Central Infectious Diseases*, 12,122.

Hotez, P. (2000). The other intestinal protozoa: Enteric infections Caused by *Blastocystis hominis*, *entamoeba coli*, and *Diantamoeba fragilis*. *Seminars in pediatric Infectious diseases*, 3(11), 178-181.

Ibarra, C., Herrera, V., Pérez, E., Gil, C., Madrid, A., Valenzuela, L., Y Beltran, C. (2016). Parasitosis y Síndrome de intestino irritable. *Revista Chilena de Infectologia*, 33(3), 268-274.

Jadallah, K., Nimri, L., Y Ghaenem, R. (2017). Protozoan parasites in irritable bowel syndrome: A case-control study. *World Journal Gastroenterology Pharma Therapy*, 8(4), 201-207.

Jimenez, D., Martinez, W., Reyes, J., Ramirez, M., Arroyo, S., Romero, M., Stark, D., Souza, V., Martínez, F., Flisser, A., Olivo, A., Y Maravilla, P. (2012). *Blastocystis* infection is associated with irritable bowel syndrome in a Mexican patient population. *Parasitology Research*, 110, 1269-1275.

Kaya, S., Cetin, E., Andogan, B., Arikan, S., Y Demirci, M. (2007). Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. *Turkiye parazitolojii dergisi*, 31(3), 189-7.

Khademvatan S., Masiedizadeh R., Rahim F., Mahbodfar H., Salehi R., Razin, Y., Y Foroutan, M. (2017). *Blastocystis* and irritable bowel syndrome: Frequency and subtypes from Iranian patients. *Parasitology International*, 6(2), 142-145.

Lepzynska, M., Dzika, E., Kubiak, K. Y Korycinska, J. (2015). The role of *Blastocystis Sp.* As an etiology of irritable bowel syndrome. *Journal homepage*, 70(4), 383-5.

Longstreth, G., Thompson, W., Chey, W., Houhhton, L., Mearin, F., Y Spiller, R. (2006) Functional Bowel Disorders. *Gastroenterology*, 130, 1480-1491.

Madi, M., Aly, M., Behnke, J., Clark, G., Y Balkhy, H. (2015). The distribution of *Blastocystis* subtypes in isolates from Qatar. *Parasites & vectors*, 8, 465.

Mearin, F., Ciriza, C., Mínguez, M., Rey, E., Mascort, J., Peña, E., Cañones, P., Y Júdez, J., (2016). Guía de Práctica Clínica: Síndrome del intestino irritable con estreñimiento y estreñimiento funcional en adultos. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 6(108), 332-363.

Meloni, D., Poirier, P., Mantini, C., Noel, C., Gantois, N., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Chabé, M., Delhaes, L., Dei-Cas, E., Fiori, P., Alaoui, H., Y Viscogliosi, E. (2012). Mixed Human Intra- and inter-subtype infections with the parasite *Blastocystis sp.* *Parasitology International*. 61, 719-722.

Mirza, H., Wu, Z., Kidwai, F., Y Tan, K. (2011). A metronidazole-Resistant Isolate of *Blastocystis* spp. Is Susceptible to Nitric Oxide and Downregulates Intestinal Epithelial Inducible Nitric Oxide Synthase by a Novel Parasite Survival Mechanism. *Infection and Immunity*, 79(12), 5019-5026.

Mirza, H., Teo, J., Upcroft, J., Y Tan, K. (2011). A rapid, High-Throughput Viability Assay for *Blastocystis* spp. Reveals Metronidazole Resistance and Extensive Subtype-Dependent Variations in Drug Susceptibilities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2), 637-648.

Moghaddam, D., Ghadirian, E., Y Azami, M. (2015). *Blastocystis hominis* and the evaluation of efficacy of metronidazole and trimethoprim/sulfamethoxazole. *Parasitology Research*, 96(4), 273-5.

Mostafa, S., Abd, K., Salah, Z., Y Mostafa, S. (2015). Prevalence and diagnostic approach for a neglected protozoan *Blastocystis hominis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(1), 51-59.

Nagel, R., Traub, R., Kwan, M., Y Belefeld, O. (2015). *Blastocystis* specific serum immunoglobulin G in patients with irritable bowel syndrome (IBS) versus healthy controls. *Parasites & vectors*, 8,453.

Nasser, S., (2010). Efficient synthesis of novel 1, 2, 4- triazole fused acyclic and 21-28 membered macrocyclic and/or lariat macrocyclic oxazanthia crown compounds with potential antimicrobial activity. *European Journal Medical of Chemistry*, 45, 5265-5277.

Nasirudeen, A., Eu, Y., Sigh, M., Y Tan, K. (2004). Metronidazole induces programmed cell death in the protozoan parasite *Blastocystis hominis*. *Microbiology*, 150, 33-43.

Occhipinti, K., Y Smith, J. (2012). Irritable Bowel Syndrome: A Review and Update. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, 25,46-52.

Ortigoza, S., Y Cruz, M. (2011). Hernández, M., Castañeda, M. () Medio de cultivo alternativo para el diagnóstico de *Blastocystis hominis*. *Peruvian Journal of Parasitology*, 10 (2), 52-59.

- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., Alaoui, H., Delbac, F. Y Livrelli, V. (2011). Development and Evaluation of Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of Blastocystis Parasites in Human Stool Samples: Prospective Study of Patients with Hematological Malignancies. *Journal of Clinical Microbiology*. 3(49), 975-983.
- Quinlivan, J., Wu, J. Y Upmacis, R. (2015). Crystal structure of metronidazolium tetrachloridoaurate. *Acta Crystallography*, 71, 810-812.
- Rajamanikam, A. Y Suresh, K. (2013). Amoebic forms of Blastocystis spp.-evidence for a pathogenetic role. *Parasites & vectors*, 6, 295.
- Ramirez, M., Hernandez, R., Lopez, E., Moncada, D., Rodriguez, A., Pagaza, C., Gonzales, A., Flisser, A., Kawa, A., Y Maravilla, P. (2010). Parasites in Mexican patients with irritable bowel syndrome: a case-control study. *Parasites & Vectors*, 96 (3), 1-3.
- Ramírez J., Sánchez, L., Bautista, D., Corredor, A., Flárez, A., Y Stensvold, C. (2014). Blastocystis subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infection Genetics and Evolution*, 22, 223-8.
- Roberts, T., Ellis, J., Marriott D., Y Stark D. (2014). Treatment failure in patients with chronic Blastocystis infection. *Journal of Medical Microbiology*, 63(2), 252-7).
- Roberts, T., Stark, D., Harkness, J. Y Ellis, J. (2014) Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathogens*, 6,17.
- Roberts, T., Bush, S., Ellis, J., Harkness, J., Y Stark, D. (2015). In vitro Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Blastocystis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8), 4417-4423.
- Romero, C. (2010). *Microbiología y parasitología humana*. 2ª. México. Panamericana. Pp. 811-814.
- Rostami, A., Rhihi, S., Haghghi, A., Sever, V., Y Armon, S. (2017). The role of Blastocystis sp. And Dientamoeba fragilis in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Parasitology Research*, 16,2361-2371.



Safadi, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Dabboussi, F., Delhaes, L., Seck, M., Hamze, M., Riveau, G., Y Viscogliosi, E. (2014). Children of Senegal River Basin Show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. Ever observed worldwide. *Biomed Central Infectious Diseases*, 14, 164.

Salvador, F., Sulleiro, E., Sanchez, M., Alonso, C., Santos, J., Fuentes, I., Y Molina, I. (2016). Epidemiological and clinical profile of adult patients with *Blastocystis* sp. Infection in Barcelona, Spain. *Parasites & vectors*, 9, 548.

Sekar, U. Y Shanthi, M. (2013). *Blastocystis*: Consensus of treatment and controversies. *Tropical parasitology*, 3(1), 35-39.

Speich, B., Marti, H., Ame, S., Ali, S., Bogoch, I., Utzinger, J., Albonico, M., Y Keiser, J. (2013). Prevalence of intestinal protozoa infection among school-aged children on Pemba Island, Tanzania, and effect of single-dose albendazole, nitazoxanide y albendazole-nitazoxanide. *Parasites & vectors*, 6,3.

Shawky, A., Maha, M., Reham, A., Y Mohamed, H. (2011). The pathogenic role of different *Blastocystis hominis* genotypes isolated from patients with irritable bowel syndrome. *Arab Journal of Gastroenterology*, 12, 194-200.

Shiang, H., Fun, Z., Hsiang, W., Cheng, T. Y Wei, L. (2006). Epidemiology of *Blastocystis hominis* and Other Intestinal Parasites in a Vietnamese Female Immigrant Population in Southern Taiwan. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 4 (22), 166-170.

Schmulson, M., Y Drossman, D. (2017). What is New in Rome IV. *Journal of Neorogastroenterology and Motility*, 33(2), 2093-0887.

Silva, H., Flores, L., Llatas, D., Guevara, G., Y Silva, T. (2016). Frecuencia y susceptibilidad antiparasitaria In vitro de *Blastocystis hominis* en pacientes admitidos en elHospital Regional Lambayeque, Peru. *Revista de Gastroenterologya del Perú*, 36(3),197-202.

Sinagra, E., Pompei, G., Tomasello, G., Cappello, F., Morreale, G., Amvrosiadis, G., Rossi F., Lo monte, A., Rizzo, A., Y Raimondo, D. (2016). Inflammation in irritable bowel syndrome: Mythor new treatment target? *World Journal Gastroenterology*, (7), 2242-2255.

Stark, D., Van, H., Marriott, D., Ellis, J., Y Harkness, J. (2007). Irritable bowel syndrome: A review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *International Journal for Parasitology*, 37,11-20.

Stesvold, R., Nielsen, V., Molbak, K. Y Smith, V. (2008). Pursing the clinical significanse of *Blastocystis*- diagnostic limitations. *Trends in parasitology*, 1(5), 23-29.

Stensvold, C., Smith, H., Nagel, R., Olsen, K., Y Traub, R. (2010). Eradication of Blastocysts Carriage with Antimicrobials: Reality or Delusion? *Journal of Clinical Gastroenterology*, 4(2),85-90.

Suresh, K., Y Smith, H. (2004). Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *European Journal Clinic of Microbiology Infectious Diseaces*, 33(6), 509-511.

Suresh, K., Venilla, G., Tan, T., Y Rohelia, M. (2006). In vivo encystation og Blastocystis hominis. *Parasitology Research*. 104, 1373-1380.

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

Tan, K. (2004). *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Veterinary parasitology*, 126,121-144.

Tan, K. (2008). New Insights on Classification, Identification, and Clinical Revelance of Blastocystis spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 39-665.

Tan K., Mirza H., Joshua D., Wu B., Y MacAry, P. (2010). Current views on the Clinical revelance of Blastocystis spp. *Curr Infect Dis Rep*. 12(1), 28-35.

Vipra, A., Narayanamurthy, S., Patil, J., Roy, P., Poonacha, N., Ravinder, P., Sriam, B. Y Paddmanabham, S. (2013). Determining the minimum inhbitory concentration of bacteriophages: potential advantages. *Advances in Microbiology*, 3, 181-190.

Vdovenko, A., Y Williams, J. (2000). *Blastocystis hominis*: neutral red supravital staining and its application to intro drug sensivity testing. *Parasitology Research*, 86, 573-581.

Wawrzyniak, I., Texier, C., Poirier, P., Viscogliosi, E., Tan, K., Delbac, F., Y Alaoui, H. (2012). Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human intestinal parasite. *Parasitology International*, 61, 437-442.

Yakoob, J., Jafri, W., Jafri, N., Khan, R., Islam M., Asim, B., Y Zaman, V. (2004). Irritable bowel syndrome in search of an etiology: role of *Blastocystis hominis*. *The American Journal of tropical Medicine and higyne*, 70(4), 383-5.

Zeber, N., Kulecka, M., Ambrozkiwicz, F., Paziewska, A., Goryca, K., Karczmariski, J., Rubel, T., Wojtowicz, W., Mlynarz, P., Marczak, L., Tomecki, R., Mikula, M., Y Ostrowski, J. (2016). Limited prolonged effects of rifaximin treatment on irritable bowel síndrome-related differences inthe fecal microbiome and metabolome. *Gut Microbes*,7(5), 397-413.

Zerpa, L., Espinoza, B., Y Huiza, F. (2012). In vitro antiparasite susceptibility test for *Blastocystis hominis*, *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *Balantidium coli*. *Anales de la Facultad de Medicina*, 73(1), 47-9.

## CAPITULO VI. ANEXOS

### 6.1. Productividad

6.1.2 Artículo de revisión: **García L., Santillán JG. Hernandez MD. (2016). Blastocystis: Biología, Subtipos Genéticos, Patología y Tratamiento, *Parasitología Latinoamericana*.65(2):0719-6326.**



## **Blastocystis: Biología, Subtipos Genéticos, Patología y Tratamiento**

---

GARCÍA FLORES L\*, SANTILLÁN-BENÍTEZ JL\*, HERNÁNDEZ NAVARRO MD\*

\* Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).

---

**Correspondencia:**

Dr. Jonathan G. Santillán Benítez, Facultad de Química • Paseo Colón Esq. Paseo Tollocan, CP 50120 • Toluca Estado de México Tel. + 52 722 217-41 20 ext 134. jonsthangb@yahoo.com.mx

- 6.1.3. Constancia de participación como ponente en cartel, en el segundo congreso de enfermedades crónico de degenerativas y de rezago.

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



**UAEM** | Universidad Autónoma del Estado de México

Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados  
Secretaría de Docencia  
Centro de Investigación en Ciencias Médicas  
Facultad de Química  
Cuerpos Académicos: Salud del Universitario,  
Investigación Educativa en Química e Investigación  
Biomédica

Otorga la presente

# Constancia

A: Lizbeth García Flores, Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez, María Dolores Hernández Navarro, Priscila Caballero Vazquez, Salud Zamudio Chávez.

por su valiosa participación como ponente en presentación cartel:  
Crecimiento in vitro de *Blastocystis* en pacientes con síndrome de colo irritable

en el **Segundo Congreso Nacional de Enfermedades Crónico Degenerativas y de Rezago**

“Educación integral del profesionista del área de la salud”

Que se llevó a cabo, en la Facultad de Química los días 10 y 11 de Noviembre de 2016

**PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO**

“2016, Año del 60 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México”

“2016, Año de Leopoldo Flores Veldra”

Toluca, México, Noviembre de 2016

Centro de Investigación en Ciencias Médicas  
Dr. en E.P. J. Amado López Arriaga  
Coordinador

Dr. en Ing. Carlos Eduardo Barrera Díaz  
Director de la Facultad de Química



**6.1.4. Reporte de resultados de pacientes con SII del Centro Médico ISSEMyM.**



**FACULTAD DE QUÍMICA**

Referencia del paciente: \_\_\_\_\_

Fecha de recepción: \_\_\_\_\_

PACIENTE: \_\_\_\_\_

MÉDICO: Priscila Caballero Vásquez

**ESTUDIO: COPROPARASITOSCÓPICO SERIADO (III) POR LA TÉCNICA DE CONCENTRACIÓN POR SEDIMENTACIÓN DE RITCHIE MODIFICADO Y OBSERVACIÓN DIRECTA**

**RESULTADO:**

**Observaciones:**

**RESPONSABLES DEL ESTUDIO**

\_\_\_\_\_  
**Biol. Lizbeth García Flores**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Jonnathan G. Santillán Benítez**

**Criterios de lectura microscópica para parásitos intestinales**

**Escasos <2 células /400X**

**Moderados: 3-5 células/400X**

**Abundantes: >5 células/400X**



### **6.1.5. Transporte, envase y embalaje de material biológico.**

El transporte de material infeccioso y potencialmente infeccioso está sometido a reglamentaciones y principalmente en México a la norma nacional (NOM-087-ECOL-SSA1-2002) en donde se señala en el numeral 4 la clasificación de los residuos peligrosos biológico infecciosos (RPBI) y para efectos de esta norma mexicana, en el número 4.3.2 la exclusión de las muestras de excremento como RPBI.

Las muestras que NO son consideradas RPBI no están sujetas a reglamentación para su transporte. Para el objeto de estudio de este proyecto se establece el siguiente procedimiento exclusivamente con el fin de preservar las condiciones adecuadas para la realización de los experimentos.

El transporte, envase y embalaje de muestras NO consideradas RPBI describen el uso apropiado de materiales de embalaje/envasado, además de otros requisitos. En el laboratorio donde se procesan las muestras de material fecal del proyecto el personal recolecta las mismas de acuerdo con el proceso que se señala adelante, cuyo cumplimiento permite: Reducir la probabilidad del deterioro de las muestras, la correcta identificación de las mismas, estropear o derramar su contenido, y con ello reducir la exposición.

#### **6.1.5.1. Sistema básico de embalaje/emvasado.**

El sistema de embalaje/envasado que se elige, se muestra a modo de ejemplo en la figura 1. Este sistema de embalaje/envasado consta de dos componentes: el recipiente primario, el embalaje/envase externo.

El recipiente primario que contiene la muestra es de material plástico rígido con tapa y debidamente etiquetado en relación con el contenido. Estará envuelto en bolsa de plástico. Pueden colocarse varios recipientes primarios en un solo embalaje junto con el gel refrigerante. Este embalaje se introduce en envase externo que podrá ser una caja plástica o de unicel para proteger de los daños físicos durante el transporte.



Los formularios de datos relativos a la muestra, las cartas y demás material informativo que permitan identificarla o describirla, así como identificar al remitente y al destinatario, junto con toda la demás documentación requerida, también se incluirán en una bolsa plástica dentro del envase externo.

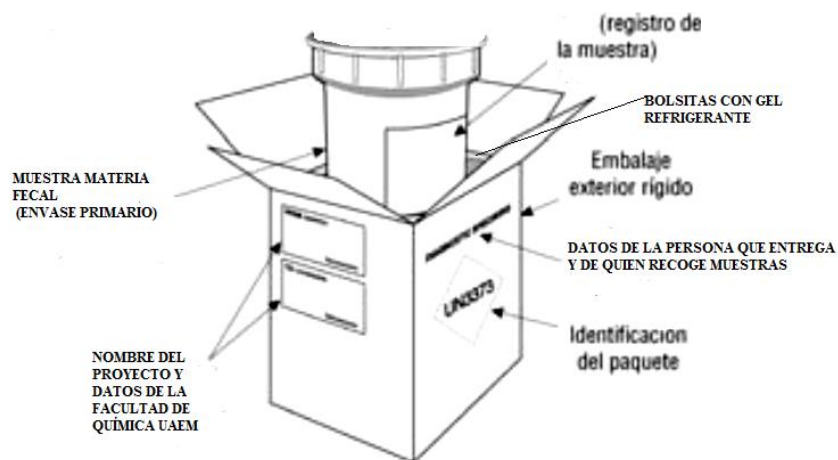


Figura 1. Ejemplo del sistema de embalaje doble, donde pueden transportarse de una a varias muestras.

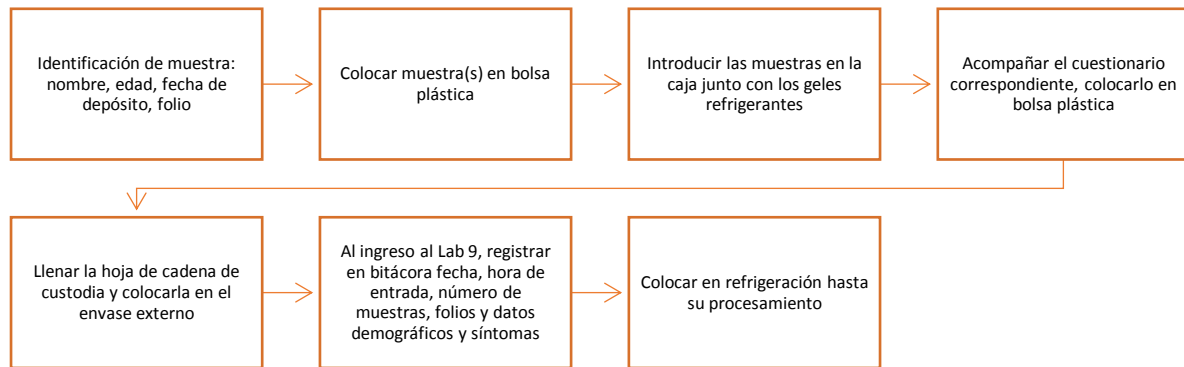
### 6.1.5.2. Marcas y etiquetas.

1. Los botes o frascos con muestra fecal tendrán un rótulo con los siguientes datos:
  - a. Nombre del paciente
  - b. Edad
  - c. Fecha en la que depositó cada muestra
  - d. Folio
2. Etiqueta que se adhiere al envase externo como se observa en la figura 2.
3. Datos que se señalan en el envase externo:
  - a. Nombre del proyecto
  - b. Dirección del remitente: Laboratorio 9 de la Facultad de Química UAEMex. Paseo Colón esq. Paseo Toluca. Toluca Estado de México. Tel. del Dr. Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez. Responsable del proyecto 722 2174129 ext. 159
  - c. Datos de identificación del paquete: Muestras de materia fecal. NO RPBI
  - d. Datos del servicio que proporciona las muestras
  - e. Nombre del médico titular

Figura 2. Ejemplo de etiqueta externa para la cadena de custodia.

CADENA DE CUSTODIA				
MUESTRAS DE MATERIA FECAL				
LUGAR			FECHA	HORA DE ENTRADA
CENTRO MÉDICO ISSEMYM TOLUCA			DD/MM/AAAA	
SERVICIO DE GASTROENTEROLOGÍA			NUM. DE REGISTRO CONSECUTIVO:	HORA DE SALIDA
SERVICIO DE GASTROENTEROLOGÍA				
NÚMERO DE FOLIOS DE LAS MUESTRAS	DESCRIPCION DE LA MUESTRA			
			CONDICIONES DE TRANSPORTE	OBSERVACIONES
	FRASCO (S) PRIMARIO (S)	Número de frascos	Con geles refrigerantes	
	ENVASE EXTERNO			
NOMBRE Y FIRMA DE LA PERSONA QUE ENTREGA			NOMBRE Y FIRMA DE LA PERSONA QUE RECIBE	
OBSERVACIONES:				

### 6.1.6. Diagrama de flujo para la recolección y transporte de muestras.



### Referencias

- NOM-087-ECOL-SSA1-2002

### 6.1.6. Carta de consentimiento informado

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Toluca, México, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.  
Día / Mes / año

Nombre del paciente \_\_\_\_\_

Se le invita a participar en el proyecto de investigación “Evaluación del efecto de 1,3-Bis-(4-fenil-[1,2,3] triazol-1-il)-2 propanol en comparación con metronidazol en cultivo *in vitro* de *Blastocystis* spp. en muestras de pacientes con Síndrome de intestino irritable”

**Información general del estudio:** El estudio será realizado en pacientes con Síndrome de intestino irritable, quienes participarán en la donación de muestra fecal en serie de tres. Así mismo, el paciente firmará la carta de consentimiento informado, en donde, autoriza participar en la donación de muestra fecal, para el desarrollo de esta investigación.

#### **El objetivo del estudio:**

Evaluar el efecto de 1,3-Bis-(4-fenil-[1, 2, 3] triazol-1-il)-2- propanol y compararlo con el efecto de metronidazol en cultivo *in vitro* de *Blastocystis* spp. en muestras de pacientes con Síndrome de intestino irritable.

#### **Se me ha explicado que mi participación consistirá en:**

- Firmar una carta de consentimiento informado.
- Se me pedirá donación de muestra de materia fecal en serie de tres.

**Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:**

- **Riesgos, inconvenientes y molestias:** El material empleado para la colecta de la muestra es nuevo, desechable y estéril. La toma de muestra no genera alguna intervención por

parte de los investigadores que genere algún daño o lesión al paciente. Las molestias son aquellas propias del proceso al cual está solicitando.

- **Beneficios:** Se me hará entrega del resultado del estudio coproparasitológico, por escrito y se me otorgará el tratamiento adecuado en caso de necesitarlo.

El Investigador se ha comprometido a darme información a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Centro Médico ISSEMyM.

El Investigador me ha dado seguridad de que, no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial, quedando registrado con el **NUMERO DE FOLIO** \_\_\_\_\_.

**Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado:** “Evaluar el efecto de 1,3-Bis-(4-fenil-[1, 2, 3] triazol-1-il)-2- propanol y compararlo con el efecto de metronidazol en cultivo *in vitro* de *Blastocystis* spp. en muestras de pacientes con Síndrome de intestino irritable”

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del paciente

**Biol. Lizbeth García Flores /Dr. en C. Jonnathan G. Santillán Benítez**

**Investigadores Responsables**

**Centro de Investigaciones en Ciencias Médicas**

Av. Jesús Carranza No. 205. Col Universidad, Toluca, Méx. C. P. 50130  
Tels (01722) 2806822 y 219412