

UNA ACTUALIZACIÓN SOBRE *BLASTOCYSTIS* SP.

JORGE IVÁN ZAPATA VALENCIA, BSc, MSc, DSc¹, CONSUELO ROJAS-CRUZ, Bact. Msc²

RESUMEN

Blastocystis sp. (anteriormente *B. hominis*) es uno de los principales parásitos intestinales que afectan a humanos y animales. Se considera un complejo de varios subtipos (genotipos) y presenta morfologías múltiples (vacuolar, granular, formas multivacuolar, avacuolar, ameboide y quiste) con diferentes estrategias de replicación. Inicialmente considerado como un comensal, los actuales estudios epidemiológicos sugieren que *Blastocystis* es patógeno u oportunista y se asocia con una amplia gama de trastornos gastrointestinales y extraintestinales, pero la asociación de los diferentes subtipos y morfologías a la patología observada en pacientes, es aún desconocida. *Blastocystis* se considera un parásito ubicuo de distribución en todo el mundo y es el patógeno más frecuentemente aislado en las heces humanas. El uso de técnicas moleculares ha permitido nueva información sobre la distribución de los subtipos de diferentes regiones, su potencial zoonótico y las vías de transmisión.

Palabras claves: *Blastocystis* sp., Zoonótico, Trastornos gastrointestinales, Trastornos extraintestinales

INTRODUCCIÓN

Gracias a los avances de la microscopia se ha logrado la identificación de los principales parásitos intestinales que afectan al hombre y los animales, entre ellos se encuentra *Blastocystis* sp. (anteriormente *B. hominis*). La blastocistosis y su agente etiológico, han sido objeto de múltiples estudios. Alexeieff en 1911, describió a *Blastocystis* como un quiste protozoario, denominándolo *B. enterocola* y Brumpt en 1912 redescubrió al organismo como *B. hominis*, levadura del tracto digestivo del hombre. Durante mucho tiempo su taxonomía fue controversial pero actualmente se ubica en el reino Chromista y los expertos recomiendan usar *Blastocystis* sp. hasta tanto no se defina si es o no un

SUMMARY

Blastocystis sp. (formerly *B. hominis*) is one of major intestinal parasites affecting humans and animals. It is considered a complex of several subtypes (genotypes) and presents multiple morphologies (vacuolar, granular, multivacuolar, avacuolar, ameboid and cyst forms) with various replication strategies. Initially considered as a commensal, current epidemiological studies suggest that *Blastocystis* is pathogenic or opportunistic and is associated with a wide range of gastrointestinal and extraintestinal disorders, but the association of the different subtypes and morphologies to the pathology seen in patients is still unknown. *Blastocystis* is considered an ubiquitous parasite with worldwide distribution and is the most frequently isolated pathogen in human feces. The use of molecular techniques has allowed new information on the distribution of subtypes in different regions, their zoonotic potential and transmission routes.

Key words: *Blastocystis* sp., Zoonotic, Gastrointestinal disorders, Extraintestinal disorders

complejo de varias especies morfológicamente muy difíciles de diferenciar.

No hay un acuerdo sobre su ciclo de vida. Su clasificación inicial como organismo comensal hizo que no se despertara ningún interés en su estudio, por lo que no se le dio mayor importancia durante mucho tiempo; sin embargo, en los últimos años ha ganado importancia y algunos trabajos recientes permiten demostrar su participación, directa o indirecta, en trastornos gastrointestinales y extraintestinales pero se desconoce cuál es la asociación de las diferentes morfologías y genotipos con la patología que se observa en algunos pacientes.

MORFOLOGÍA Y TAXONOMÍA DE *BLASTOCYSTIS* SP.

Varios estudios de microscopia han permitido establecer que hay variaciones morfológicas en *Blastocystis*, entre las que se cuentan formas

¹Profesor. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad del Valle. Cali, Colombia

Recibido para publicación: septiembre 15, 2012
Aceptado para publicación: noviembre 15, 2012

vacuolares (figura 1A), granulares (figura 1B), multivacuolares, avacuolares, ameboides y quistes. El tamaño de *Blastocystis* varía de 5 a 200 μm de diámetro (figura 1C) y la forma más fácilmente identificada en materia fecal es la vacuolar, llamada también de cuerpo o de vacuola central, cuya vacuola desplaza los organelos a la periferia del trofozoito. Sin embargo, otras formas presentes en muestras fecales, como las multivacuolares y las quísticas inducen a errores en el diagnóstico¹⁻⁵. También se ha podido establecer que *Blastocystis* presenta diversas formas de replicación, observadas principalmente en medios de cultivo, como son fisión binaria, plasmotomía, esquizogonia o fisión múltiple, endodiogonia y endopoligenia, siendo la fisión binaria la más frecuente de todas y observable en materia fecal^{6,7} (figura 1D).

La clasificación taxonómica de *Blastocystis* aceptada actualmente, basada en el análisis del gen de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSU-rDNA)⁸, lo ubica en la clase Blastocystea, subfilo Opalinata, infrareino Heterokonta, subreino Chromobiota, reino Chromista (sinónimo de Estramenopila)⁹. Estudios moleculares adelantados en los últimos años han permitido dividir a *Blastocystis* en subtipos (genotipos) y

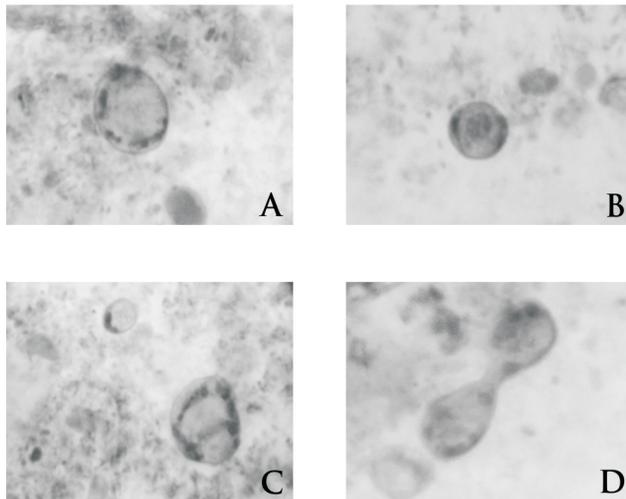


Figura 1. A: Forma vacuolar. B: Forma granular. C: Variación en tamaño de las formas vacuolares. D: División por fisión binaria de la forma vacuolar. Todas las fotografías de esta figura, corresponden a *Blastocystis* sp en frotis de materia fecal con tinción de Hematoxilina Férrica visualizados por microscopia de luz óptica (100X).

aún falta establecer si las diferencias genéticas son lo suficientemente amplias para hablar de varias especies, lo que ha llevado a proponer, con base en el estudio de genes homólogos, que podría dividirse a *Blastocystis* sp en 12 o más especies^{10,11}. También se han reportado variaciones intra-subtipos para la secuencia *ssrRNA*, especialmente para los subtipos 1 y 2⁹.

Por medio de técnicas como PCR-RFLP, PCR y secuenciación y PCR-SSCP se ha establecido que existen varios genotipos (llamados subtipos) de *Blastocystis* sp^{8,12}. Por consenso se ha propuesto utilizar como nomenclatura la designación de *Blastocystis* sp como subtipos, demarcados por un número romano. Hasta la fecha se han descrito 10 subtipos y estos se denominan entonces como *Blastocystis* sp subtipos 1 al 10^{8,13}.

EPIDEMIOLOGÍA

La importancia de *Blastocystis* como causa de patología gastrointestinal es aun motivo de controversia, aunque su aislamiento es frecuente en materia fecal de pacientes sintomáticos¹⁴ e individuos saludables¹⁵.

Blastocystis se considera un parásito ubicuo con distribución mundial. Con frecuencia, es el parásito más frecuentemente aislado en estudios de parasitismo intestinal. Su prevalencia varía entre países y entre regiones de un mismo país y con la población estudiada. Los países en vía de desarrollo presentan, por sus condiciones climáticas e higiénico-sanitarias, prevalencias mayores que los países desarrollados⁹ (Tabla 1). Entre los factores asociados a la infección se cuentan pobre higiene, contacto con animales y consumo de alimentos y aguas contaminados con quistes infectivos^{9,16-23}. La identificación del parásito basada únicamente en el reporte de formas vacuolares y el desconocimiento de las otras formas, conlleva a un subdiagnóstico de la parasitosis.

Los estudios realizados en los últimos años, utilizando técnicas de biología molecular, han permitido arrojar luces sobre la distribución de los subtipos en distintas regiones, su potencial zoonótico y las vías de transmisión. Entre los subtipos aislados de humanos, el más frecuente es el subtipo 3, pero también están presentes con relativa frecuencia los subtipos 1 y 6; mientras que los otros subtipos se encuentran con

Tabla 2

Prevalencia de *Blastocystis* sp basada en su identificación morfológica en materia fecal en varios países⁹

País	Prevalencia
Japón	0.5 a 1%
Singapur	3.30%
Argentina	27.20%
Brasil	40.90%
Cuba	38.50%
Egipto	33.30%
Indonesia	60%

prevalencias muy bajas. Se sugiere entonces que el subtipo 3 es de origen humano y no hay correlación entre el origen geográfico y los subtipos aislados. Estos datos pueden verse alterados por situaciones como la temperatura a la que se hacen los cultivos pues para el genotipo aviar 7, cuya temperatura óptima de cultivo es 40°C, se requiere el doble de tiempo para su crecimiento, lo cual puede llevar a una sub-representación de este genotipo en los estudios adelantados. La mayoría de los portadores presentan infecciones por un solo genotipo pero no son raras las infecciones mixtas, su frecuencia puede variar del 1.1 al 14.3%, siendo la asociación entre los subtipos 1 y 3 la más frecuente⁹.

Los datos de los estudios epidemiológicos de los últimos siete años y otros estudios sugieren que *Blastocystis* es patógeno u oportunista y está asociado a una amplia gama de desórdenes⁹. Se ha podido establecer que ciertas poblaciones son susceptibles a desórdenes asociados a la presencia de *Blastocystis* y los factores de riesgo para estas presentaciones incluyen inmunocompromiso (portadores de VIH, pacientes tratados con corticosteroides, con malignidades hematológicas y transplantados), pobre higiene, inmigrantes y viajeros a países tropicales en desarrollo y la exposición a animales o el consumo de agua o alimentos contaminados^{9,16-23}.

En algunos estudios realizados en pacientes inmunocompetentes se ha reportado la asociación de *Blastocystis* con desórdenes intestinales cuando se les compara con la población sana, así como en pacientes con enfermedades alérgicas de la piel, dolor abdominal, diarrea y flatulencia. La infección por *Blastocystis* se ha visto que es más común en niños y que estos sufren de enfermedad gastrointestinal^{16,24}. Otros estudios han

permitido determinar una asociación entre blastocistosis y ciertas ocupaciones que implican contacto con animales (manipuladores de alimentos, manipuladores de animales en zoológicos y trabajadores de plantas de beneficio), lo cual destaca su potencial zoonótico^{9,25}. Estudios adelantados en varios países para determinar la prevalencia de *Blastocystis* sp en niños muestran prevalencias que van de 1.1% a 48.7% sin diferencias entre géneros^{16,18}. En Colombia, se reportó en escolares una prevalencia de 22.4% en un estudio adelantado en Bogotá y 36,4 % en otro realizado en Calarcá (Quindío)^{26,27}.

Entre las especies animales que presentan infección intestinal por *Blastocystis* se encuentran el perro, el gato, el cerdo, la vaca, varios primates (orangután, chimpancé, macacos, mandriles, lémures y otros), roedores (cobayos y ratas) y varias aves (gallinas, codornices, faisanes, pavos, gansos y patos, entre otros). Algunos de los aislados de *Blastocystis* obtenidos de animales se han caracterizado genéticamente y se ha establecido que pueden tener potencial zoonótico o infectar cruzadamente a diversas especies; sin embargo, se desconoce su papel en la patología de la infección^{28,29}.

Una de las preguntas que aun espera respuesta es si existe asociación entre el desarrollo de enfermedad y los genotipos de *Blastocystis*. Se han realizado algunos estudios pero sus resultados no han sido del todo concluyentes. Por ejemplo, los subtipos 1, 2 y 4 se han asociado a síntomas gastrointestinales, con evidencia colonoscópica de inflamación asociada a los dos últimos⁹. En otros estudios se ha establecido que el subtipo 3 no se asocia a sintomatología pero, trabajos realizados en Grecia y otros países, han asociado este subtipo a enfermedad³⁰. El subtipo 7 se ha aislado solo de pacientes asintomáticos y el subtipo 8 se aisló de una paciente que presentaba diarrea, dolor, distensión abdominal y flatulencia⁹.

Existen pocos estudios que relacionen la presencia de *Blastocystis* con factores como edad y sexo; sin embargo, se han reportado prevalencias elevadas en niños y jóvenes, y prevalencias más bajas en adultos mayores³¹⁻³⁴.

CICLO DE VIDA DE *BLASTOCYSTIS* SP.

Hasta la fecha no está esclarecido el ciclo de vida, pero sea cual fuere, éste debe tener presente los diversos

reservorios animales y que los humanos son hospederos potenciales para diversos genotipos de origen zoonótico. Se han propuesto varios ciclos de vida debido a los diversos mecanismos reproductivos que muestra *Blastocystis* en cultivo, como son plasmotomía, gemación y endodiogenia. Sin embargo, algunos autores solo consideran válido como mecanismo de reproducción la fisión binaria^{7,36}. Tan et al., consideran que las múltiples formas de división observadas se deben más al pleomorfismo que presenta el parásito y no a verdaderas formas de reproducción⁹. Otros autores sugieren un ciclo de vida que comprende quistes de pared delgada, los cuales inducen la autoinfección, y otros quistes de pared gruesa, que son importantes en la transmisión externa^{36,37}.

Los quistes se ingieren y luego en el intestino grueso se produce el desenquistamiento, con el desarrollo de la forma vacuolar (figura 2). A medida que avanza el bolo fecal se da el proceso de enquistamiento formándose quistes que tienen una cubierta fibrilar la cual se pierde en el proceso de maduración del quiste. Hay un estadio granular transitorio entre la forma quística y la vacuolar y es ésta última la que sufre la división celular. La forma vacuolar también puede transformarse a forma ameboide y se propone que estas no pueden dividirse, por lo cual deben revertir a la forma vacuolar⁹.

IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LA PRESENCIA DE *BLASTOCYSTIS* SP.

Hasta el momento no es claro cuál es el periodo de incubación de la infección por *Blastocystis* ni la duración de la infección con un subtipo particular. Hay pocos reportes de brotes de gastroenteritis por

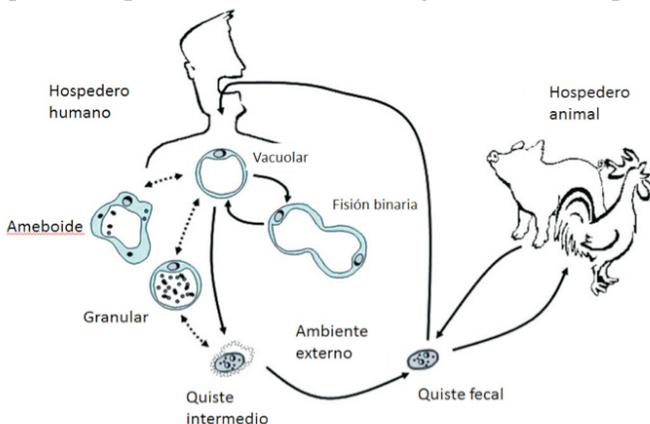


Figura 2. Ciclo de vida de *Blastocystis hominis* propuesto por Tan⁹

Blastocystis; sin embargo, la información disponible parece indicar que la infección es persistente si no es tratada y dura varios meses e incluso años³⁸⁻⁴⁰.

La mayoría de estudios sobre el papel patogénico de *Blastocystis* se basan en la evaluación de pacientes divididos en dos grupos de individuos portadores, los sintomáticos y los asintomáticos. Sin embargo, la interpretación de los datos obtenidos se complica pues varía la definición de caso y no se conoce la duración del estado portador, con lo cual no se podría decir con claridad si los síntomas son agudos, crónicos o intermitentes. Además quedan abiertas las preguntas sobre si hay secuelas de la infección crónica, si estas son intestinales o extraintestinales, si hay inmunidad adquirida y como se puede pasar del estado de portador asintomático a sintomático o viceversa⁹. Las técnicas moleculares han permitido comprender mejor el conocimiento sobre la biología, la taxonomía, las rutas de transmisión, el rango de hospederos y la epidemiología de las infecciones, especialmente en aquellas en las que las especies, los genotipos y los subgenotipos son morfológicamente indistinguibles. Este es el caso de *Blastocystis*, donde se ha empezado a estudiar el papel de los diferentes genotipos en la patología humana, sin embargo, hasta la fecha los resultados aun presentan muchos problemas de interpretación.

Blastocystis ha sido aislado de individuos con síntomas gastrointestinales y extraintestinales y de individuos asintomáticos con prevalencias similares. Algunos autores consideran a *Blastocystis* un comensal, mientras otros lo consideran un patógeno oportunista y otros más indican que es más frecuente aislarlo de pacientes sintomáticos que asintomáticos. Entre los síntomas más frecuentemente descritos en blastocistosis están diarrea, dolor abdominal, flatulencia, vómito, estreñimiento, fatiga, colitis, náuseas, distensión abdominal, anorexia, abdomen agudo en niños, proctosigmoiditis hemorrágica, hipoalbuminemia, edema generalizado o anasarca, urticaria crónica, artritis infecciosa y prurito palmoplantar y ciertos estudios asocian a este parásito con el síndrome de colon irritable (SCI) y la enfermedad inflamatoria del colon (EIC). A pesar de que no se ha establecido cual es el mecanismo patofisiológico implicado en la presentación extraintestinal, en SCI o EIC, en estos últimos se ha aislado con mayor frecuencia a los genotipos 3 y 2 y

podrían ser factores del hospedero los que determinen la severidad de la presentación clínica^{9,39,41,42}.

Entre los factores que determinan la patogenicidad y virulencia de *Blastocystis* se incluyen su abundancia, el estado inmune del hospedero, el genotipo del parásito (subtipo) y el tratamiento aplicado. Otros factores que se han podido estudiar *in vitro* incluyen la estimulación de reacciones toxico-alérgicas, la presencia de proteasas que degradan la IgA, la inducción de apoptosis por contacto con las células intestinales que lleva a cambios en la permeabilidad del epitelio intestinal y de la función de barrera del epitelio y modulación de la respuesta inmune por acción de cistein proteinasas que alteran la producción de citoquinas en las células epiteliales colónicas³⁹. También se han asociado cambios en la dieta, en la flora intestinal y en la función de la barrera intestinal⁴³. Sin embargo, los estudios sobre patogenicidad pueden estar influenciados por el tipo de prueba usada (examen directo, concentración, cultivo y PCR), el número de muestras analizadas (usualmente solo se ha analizado una muestra por paciente, pero la excreción del parásito no es constante) y criterios de reporte como establecer si el número de parásitos por campo de 400X o 1000X es mayor a 5 formas. Stenzel y Boreham establecieron la presencia de cinco o más organismos por campo de alto poder en aceite de inmersión como un indicador de patogenicidad⁴⁴, sin embargo, Doyle et al., no encontraron asociación estadística entre el número de organismos presentes en 400X y el estado de enfermedad⁴⁵.

DIAGNÓSTICO DE BLASTOCISTOSIS

Gran parte de los trabajos realizados para establecer el papel patogénico de *Blastocystis* fue realizada antes de que se estableciera la presencia de los diversos genotipos y por tanto dependía de la capacidad de detectar el organismo en muestras fecales. La demostración del organismo ha recaído en los métodos parasitológicos convencionales (microscopía de luz en coprológicos seriados) que tienen como gran ventaja la posibilidad de detectar infecciones por múltiples enteroparásitos pero no es factible con ellos establecer el genotipo de *Blastocystis*. De hecho, una de las grandes dificultades en el diagnóstico de la blastocistosis está dada por la gran variedad de morfologías que presenta este microorganismo (Tabla 2), lo cual dificulta su identificación por microscopía de luz convencional cuando el personal encargado del diagnóstico no está

familiarizado con todas ellas; es así como usualmente las formas más reportadas son la de cuerpo o vacuola central y la granular (figuras 1A y 1B). Ocasionalmente se pueden apreciar formas en fisión binaria (Figura 1C) en muestras de materia fecal. Conocer su distribución en la población humana es necesario para establecer la sensibilidad de las pruebas diagnósticas. Al igual que para otras infecciones por enteroparásitos, la excreción de *Blastocystis* varía de un día a otro, por lo cual se recomienda emplear varias muestras para aumentar las probabilidades de detectar este microorganismo tanto en los portadores asintomáticos como en los sintomáticos³⁹.

Otras técnicas usadas para su identificación son la concentración con formol-éter, la tinción permanente (hematoxilina férrica o tricrómica) (figuras 1A-D), tinta china modificada^{5,33,46,47} y el cultivo xénico *in vitro*, presentándose una sensibilidad mayor para el cultivo con respecto a la microscopía^{32,48} y menor para la concentración en formol-éter^{47,49-51}. La coloración tricrómica muestra mejores resultados que el examen directo de materia fecal⁴², pero algunos autores consideran el cultivo como el estándar de oro para el diagnóstico de la blastocistosis⁵². Sin embargo, para otros investigadores, el estándar de oro son las técnicas moleculares⁴⁹. Esta disparidad de métodos y resultados ha llevado a que se considere que los estudios sobre la patogenicidad de y la eficacia del tratamiento contra *Blastocystis* se deban tomar con precaución pues no se emplearon en muchos casos las técnicas más sensibles para determinar la presencia (portador) o ausencia (no portador) del parásito.

Hasta la fecha se han descrito 10 subtipos de *Blastocystis* basados en el análisis del gen de la subunidad pequeña del RNA^{8,13}. De estos genotipos, el subtipo 3 es el que con mayor frecuencia se aísla en humanos³⁰. La frecuencia con que los diversos subtipos se recuperan de muestras humanas varía entre estudios y puede ser un reflejo de las condiciones epidemiológicas de cada subtipo (localización geográfica, rutas de transmisión, reservorios o población a estudio) y su presencia puede afectar no solo el desenlace clínico del paciente si no también su respuesta al tratamiento^{9,39}.

Los métodos indirectos para establecer la respuesta inmune del hospedero han presentado bajo desempeño, en su mayoría emplean anticuerpos dirigidos contra las

Tabla 2
Características morfológicas de *Blastocystis hominis*⁴⁴

Forma	Tamaño (µm)	Vacuola Central	Capa Superficial	Observaciones	Forma
Vacuolar	2 - > 200	Presente	Presente, delgada o ausente	La vacuola central ocupa la mayor parte de la célula	0.5 a 1%
Granular	6,5 – 80	Presente	Presente, delgada o ausente	Gránulos en la vacuola central	3.30%
Multivacuolar	5 – 8	Ausente	Presente, gruesa	Múltiples vacuolas pequeñas	27.20%
Avacuolar	~ 5	Ausente	Ausente	Raramente reportada	40.90%
Ameboide	2,6 – 7,8	Ausente	Ausente	Raramente reportada	38.50%
Quiste	3 – 10	Ausente	Presente o ausente	Pared quística presente	33.30%

formas vacuolares obtenidas en medio de cultivo, pero la alta variabilidad genética y antigénica del microorganismo hace que estas pruebas no den los mejores resultados^{9,53}. Las pruebas de ELISA e inmunofluorescencia son las más empleados, siendo la última la que presenta una mayor especificidad para formas vacuolares, granulares y ameboides^{9,54}. También se han empleado técnicas complementarias como la endoscopia para la obtención de biopsias^{55,56}.

TRATAMIENTO

Con respecto al tratamiento son escasos los reportes de ensayos aleatorios controlados y la evidencia que muestre la eficacia de los medicamentos en la erradicación de *Blastocystis*. El metronidazol, el trimetropim-sulfametoxazol (co-trimoxazole), la iodoquinolona, la paramomicina, la rifaximina y la nitazoxanida se ha visto que mejoran total o parcialmente la sintomatología y eliminan el parásito en los pacientes tratados^{9,39}.

REFERENCIAS

- Zaman V, Howe J, Ng M. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* cysts. *Parasitol Res* 1995; 81: 465-469
- Boreham PFL, Stenzel DJ. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, biology, and epizootiology. *Adv Parasitol* 1993; 32: 1-70
- Stenzel DJ, Boreham PFI, McDougall R. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* in human stool samples. *Int J Parasitol* 1991; 21: 807-812
- Stenzel DJ, Boreham PFI. A cyst-like stage of *Blastocystis hominis*. *Int J Parasitol* 1991; 21: 613-615
- MacPherson DW, MacQueen WM. Morphological diversity of *Blastocystis hominis* in sodium acetate-acetic acid-

- formalin-preserved stool samples stained with iron hematoxylin. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 267-268
- Zhang X, Qiao JY, Zhou XJ, Yao FR, Wei ZC. Morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis* in diarrhea and in vitro. *Parasitol Res* 2007; 101: 43-51
- Zaman V. Phase-contrast microscopy of cell division in *Blastocystis hominis*. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91: 223-224
- Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. *Trends Parasitol* 2007; 23: 93-96
- Tan KS. 2008 New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 639-665
- Abe N. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Vet Parasitol* 2004; 120: 235-242
- Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1998; 73: 203-266
- Vassalos CM, Vakalis N, Papadopoulou C. *Blastocystis* and its pathogenic potential: latest aspects. *Rev Med Microbiol* 2008; 19: 87-97
- Stensvold CR, Alfellani MA, Nørskov-Lauritsen S, Prip K, Victory EL, Maddox C, et al. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *Int J Parasitol* 2009; 39: 473-479
- Zierdt CH, Zierdt WS, Nagy B. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. *J Parasitol* 1995; 81: 127-129
- Ashford RW, Atkinson EA. Epidemiology of *Blastocystis hominis* infection in Papua New Guinea: age-prevalence and associations with other parasites. *Ann Trop Med Parasitol* 1992; 86: 129-136
- Abdulsalam AM, Ithoi I, Al-Mekhlafi HM, Ahmed A, Surin J, Mak JW. Drinking water is a significant predictor of *Blastocystis* infection among rural Malaysian primary schoolchildren. *Parasitology* 2012; 139: 1014-1020
- Li LI, Chye TT, Karmacharya BM, Kumar S. *Blastocystis* sp.: waterborne zoonotic organism, a possibility? *Parasit Vectors* 2012; 28: 130
- Ithoi I, Azman J, Mak JW, Wan Yusoff WS, Rohela M. Occurrence of *Blastocystis* in water of two rivers from recreational areas in Malaysia. *J Parasitol Res* 2011; 123916. Epub 2011 Jun 6

19. Al-Megrin WAI. Prevalence of Intestinal Parasites in Leafy Vegetables in Riyadh, Saudi Arabia. *Int J Trop Med* 2010; 5: 20-23
20. Kurniawan A, Karyadi T, Dwintasari SW, Sari IP, Yunihastuti E, Djauzi S, Smith HV. Intestinal parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea in Jakarta, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103: 892-898
21. Muñoz V, Laura N. 2008 Alta contaminación por enteroparásitos de hortalizas comercializadas en los mercados de la ciudad de La Paz, Bolivia. *Biofarbo* 2008; 16: 1-8
22. Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, Mungthin M. Drinking water a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 401-406
23. Al-Binali AM, Bello CS, El-Shewy K, Abdulla SE. The prevalence of parasites in commonly used leafy vegetables in South Western, Saudi Arabia. *Saudi Med J* 2006; 27: 613-616
24. Requena I, Devera R, Agreda Y, Córdova Y, Castillo H, Velásquez V. Infección por *Blastocystis hominis* en pacientes pediátricos hospitalizados. *Rev Bioméd (México)* 1999; 10: 199-208
25. Abe N, Nagoshi M, Takami K, Sawano Y, Yoshikawa H. A survey of *Blastocystis* sp. in livestock, pets, and zoo animals in Japan. *Vet Parasitol* 2002; 106: 203-212
26. Boeke CE, Mora-Plazas M, Forero Y, Villamor E. Intestinal protozoan infections in relation to nutritional status and gastrointestinal morbidity in Colombian school children. *J Trop Pediatr* 2010; 56: 299-306
27. Londoño AL, Mejía S, Gómez-Marín J. Prevalencia y Factores de Riesgo Asociados a Parasitismo Intestinal en Preescolares de Zona Urbana en Calarcá, Colombia. *Rev Salud Pública* 2009; 11: 72-81
28. Daryani A, Sharif M, Amouei A, Ettehad GH, Ziaei H, Gohardehi SH et al. *Blastocystis* sp a Neglected Zoonotic Protozoan. *Proc ASEAN Congr Trop Med Parasitol* 2008; 3: 59-62
29. Abe N. Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Vet Parasitol* 2004; 120: 235-242
30. Vassalos CM, Spanakos G, Vassalou E, Papadopoulou C, Vakalis N. Differences in Clinical Significance and Morphologic Features of *Blastocystis* sp Subtype 3. *Am J Clin Pathol* 2010; 133: 251-258
31. Herwaldt BI, de Arroyave KR, Wahlquist SP, de Merida AM, Lopez AS, Juranek DD. Multiyear prospective study of intestinal parasitism in a cohort of peace corps volunteers in Guatemala. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 34-42
32. Soriano SV, Barbieri LM, Pierángeli NB, Giayetto AL, Manacorda AM, Castronovo E et al. Intestinal parasites and the environment: frequency of intestinal parasites in children of Neuquén, Patagonia, Argentina. *Rev Latinoam Microbiol* 2001; 43: 96-101
33. Guimaraes S, Sogayar MIL. *Blastocystis hominis*: occurrence en children and staff members of municipal day-care centers from Botucatu, Sao Paulo State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz (Rio J)*. 1993; 88: 427-429
34. Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 116-121
35. Govind SK, Khairul AA, Smith HV. Multiple reproductive processes in *Blastocystis*. *Trends Parasitol* 2002; 18: 528
36. Leelayoova S, Siripattanapipong S, Thathaisong U, Naaglor T, Taamasri P, Piyaraj P, Mungthin M. Drinking water a possible source of *Blastocystis* spp. subtype 1 infection in schoolchildren of a rural community in central Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 401-406
37. Sukthana Y. Is *Blastocystis hominis* a Human Pathogenic Protozoan?. *J Trop Med Parasitol* 2001; 24: 16-22
38. Baldursson S, Karanis P. Waterborne transmission of protozoan parasites Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. *Water Res* 2011; 45: 6603-6614
39. Stensvold CR, Nielsen HV, Mølbak K, Smith HV. Pursuing the clinical significance of *Blastocystis* – diagnostic limitations. *Trends Parasitol* 2009; 25: 23-29
40. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health* 2007; 5: 1-38
41. Dogruman-Al F, Kustimur S, Yoshikawa H, Tuncer C, Simsek Z, Tanyuksel M, Araz E, Boorum K. *Blastocystis* subtypes in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease in Ankara, Turkey. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 724-727
42. Kaya S, Cetin ES, Aridoğan BC, Arıkan S, Demirci M. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a Clinical Reevaluation. *Turkiye Parazitoloj Derg* 2007; 31: 184-187
43. Vassalos CM, Papadopoulou C, Vakalis NC. *Blastocystis*: an emerging or re-emerging potential zoonosis? *Vet Ital* 2008; 44: 679-684
44. Stenzel DJ, Boreham PFL. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 563-584
45. Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 116-121
46. Wang KX, Li CP, Wang J, Cui YB. Epidemiological survey of *Blastocystis hominis* in Huainan city, Anhui province, China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 928-932
47. Zerpa R, Huicho L. Tinta china modificada para la detección de formas encapsuladas de *Blastocystis hominis*. *Rev Mex Patol Clin* 1999; 46: 184-186
48. Graham-Clarck G. Extensive genetic diversity in *Blastocystis hominis*. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 87: 79-83
49. Stensvold CR, Arendrup MC, Jespersgaard C, Mølbak K, Nielsen HV. Detecting *Blastocystis* using parasitologic and DNA-based methods a comparative study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59: 303-307
50. Devera R, Blanco Y, Requena I, Velásquez V. Diagnóstico de *Blastocystis hominis* bajo rendimiento de los métodos de concentración de formol éter. *Rev Biomed* 2006; 17: 231-233
51. Zerpa RL, Huicho L, Naquira C, Espinoza I. A simplified culture method for *Blastocystis hominis*. *Rev Mex Patol Clín* 2000; 47: 17-19
52. Termmathurapoj S, Leelayoova S, Aimpun P, Thathaisong U, Nimmanon T, Taamasri P, Mungthin M. The usefulness of short-term in vitro cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol Res* 2004; 93: 445-447
53. Boorum KF, Smith H, Nimri L, Viscogliosi E, Spanakos G, Parkar U et al. Oh my aching gut irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasit Vectors* 2008; 1: 40
54. Kaneda Y, Horiki N, Cheng X, Tachibana H, Tsutsumi Y. Serologic response to *Blastocystis hominis* infection in asymptomatic individuals. *Tokai J Exp Clin Med* 2000; 25: 51-56
55. Janarthanan S, Khoury N, Antaki F. An unusual case of invasive *Blastocystis hominis* infection. *Endoscopy* 2011; 43 Suppl 2: E185-E186
56. Chen TL, Chan CC, Chen HP, Fung CP, Lin CP, Chan WL et al. Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis hominis* in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 213-216