

Artículo original

Uso del cultivo en el diagnóstico de *Blastocystis* sp.

Rodolfo Devera*, Nayellis Jaimes, Andreina Yáñez, Iván Amaya, Ytalia Blanco, José Mata, Ixora Requena

Grupo de Parasitosis Intestinales, Departamento de Parasitología y Microbiología, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente. Estado Bolívar, Venezuela.

Recibido 20 de abril de 2012; aceptado 12 de diciembre de 2012

Resumen: Se realizó un estudio para comparar el rendimiento del cultivo con el examen directo y la sedimentación espontánea en el diagnóstico de *Blastocystis* sp. Para el cultivo de *Blastocystis* sp. se utilizó una modificación del medio de Boeck y Drbohlav. Se emplearon 100 muestras fecales procedentes de habitantes de la comunidad indígena Itopoicon, municipio Heres, estado Bolívar. De las 100 muestras cultivadas y sometidas a examen directo y sedimentación espontánea, en 90 se diagnosticó *Blastocystis* sp. De ellas, 83 resultaron positivas en el cultivo; mientras que 60 fueron positivas en el examen directo y 57 en la sedimentación espontánea. En conclusión, el cultivo presentó un mayor rendimiento (83%) que el examen directo (60%) y la sedimentación espontánea (57%) en el diagnóstico de *Blastocystis* sp.

Palabras clave: *Blastocystis* sp., diagnóstico, cultivo.

Use of cultures for the diagnosis of *Blastocystis* sp.

Abstract: A study for comparing the yield of cultures by direct examination and by spontaneous sedimentation for the diagnosis of *Blastocystis* sp. was carried out. *Blastocystis* sp. was cultured in a modification of the Boeck and Drbohlav medium. The material used corresponded to 100 fecal samples from inhabitants of the Itopoicon indigenous community, Heres municipality, Bolivar State. Of the 100 samples cultured and submitted to direct examination and spontaneous sedimentation, 90 gave a diagnosis of *Blastocystis* sp. Of these 90, 83 were positive in culture, while 60 were positive at direct examination, and 57 in spontaneous sedimentation. In conclusion, culture showed a higher yield (83%), than direct examination (60%) and spontaneous sedimentation (57%), for the diagnosis of *Blastocystis* sp.

Keywords: *Blastocystis* sp., diagnosis, culture.

* Correspondencia:

E-mail: rodolfodevera@hotmail.com

Introducción

Dentro de los protozoarios causantes de parasitosis intestinales, *Blastocystis* sp. se puede diagnosticar fácilmente con técnicas de laboratorio rutinarias. Sin embargo, para su estudio morfológico, bioquímico y molecular generalmente se requiere cultivar al parásito [1-6]. *Blastocystis* sp. tiene una amplia variabilidad genética y se intenta relacionar ésta con los aspectos bioquímicos, moleculares y la patogenicidad del microorganismo [6-8].

Por otro lado, para realizar los controles postratamiento se requiere de una técnica diagnóstica específica, donde el cultivo del parásito ha demostrado ser el más efectivo [5]. Actualmente la mayoría de los estudios bioquímicos sobre *Blastocystis* sp. han sido realizados en células procedentes de cultivos [9]. Todo lo anterior justifica la necesidad de contar

con un método de cultivo confiable y estandarizado para el diagnóstico, aislamiento y mantenimiento del parásito. Este cultivo puede ser de tipo xénico o axénico [1,6,10]. El medio de Boeck-Drbohlav o su modificación (llamada LE por Locke-egg) es uno de los más empleados para el cultivo axénico de *Blastocystis* sp. [11,12]. Inicialmente se usó para el diagnóstico de amibas hasta que Zierdt *et al* lo utilizaron por primera vez, en 1967, para el diagnóstico y aislamiento de *Blastocystis* sp., mostrando resultados satisfactorios [3-5,7,10-15]. Sin embargo, el cultivo es realizado de forma restringida por algunos investigadores y en determinados centros de investigación, siendo difícil que laboratorios clínicos lo utilicen. Debido a ello se escogió este medio de cultivo para verificar su utilidad en nuestros laboratorios.

En los últimos 10 años se han realizado en Venezuela varios trabajos sobre *Blastocystis* sp. [16-21]. Sin embargo, en

pocos se ha utilizado el cultivo del parásito ya sea para fines diagnósticos, control de tratamiento o para su aislamiento y posteriores estudios bioquímicos o moleculares [4,5,22]. El objetivo de este estudio fue comparar el rendimiento diagnóstico del cultivo de *Blastocystis* sp. en el medio de Boeck y Drbohlav con las técnicas de examen directo y sedimentación espontánea, de reconocida utilidad para diagnosticar este protozooario.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio de tipo transversal que consistió en el uso de las muestras fecales procedentes de habitantes de la comunidad indígena Itopoicon del municipio Heres, ubicada a 7 kilómetros al noroeste de Ciudad Bolívar, vía Ciudad Piar, sector Cardozo, parroquia José Antonio Páez, estado Bolívar.

Universo y muestra: El universo lo conformaron los 584 habitantes de la comunidad indígena Itopoicon y la muestra estuvo constituida por 100 muestras de heces seleccionadas aleatoriamente, obtenidas en un estudio coproparasitológico realizado en julio de 2010 y que fueron sembradas en el medio de Boeck y Drbohlav para realizar las comparaciones con las otras técnicas diagnósticas aplicadas.

Recolección de datos: Los datos de identificación de los habitantes de la comunidad indígena Itopoicon fueron obtenidos directamente mediante interrogatorio empleando una ficha de control. Todos los habitantes que participaron del estudio coproparasitológico dieron su consentimiento por escrito. La investigación se realizó cumpliendo lo establecido en la declaración de Helsinki [23]. Al final del estudio se entregó a cada persona participante los resultados de sus exámenes y tratamiento antiparasitario específico.

Obtención y procesamiento de las muestras fecales: En una primera etapa se realizó la preparación, modificación y estandarización del medio de Boeck y Drbohlav que ha sido empleado previamente en el diagnóstico de protozoarios intestinales [1-6]. En esa primera etapa se emplearon muestras con diagnóstico de *Blastocystis* sp. como controles positivos y sin la presencia de dichas formas parasitarias como controles negativos. La identificación del microorganismo en esas muestras se realizó mediante examen directo. Una vez estandarizada la preparación del medio y logrado el crecimiento del parásito se realizó el establecimiento en el cultivo, para ello se realizaron repiques o pasajes sucesivos con intervalos de 72 a 96 horas después de la siembra primaria [10].

Para la segunda parte del estudio, es decir, la comparación de las técnicas con el cultivo, cada una de las 100 muestras seleccionadas se sometieron a las técnicas de examen directo con solución salina fisiológica y lugol y método de concentración de sedimentación espontánea [24]. Una alícuota de cada muestra fresca se utilizó para el cultivo de *Blastocystis* sp.

Preparación del medio de cultivo de Boeck y Drbohlav: Se trata de un medio compuesto por una fase semisólida a base de huevo y otra líquida formada por la solución de Locke. El medio fue preparado según Botero y Restrepo [24] con modificaciones, las cuales después de varios ensayos, permitieron obtener un medio adecuado. Varios autores han realizado diversas modificaciones a este mismo medio como es el empleo de suero, glucosa o adición de algún antibiótico en la solución de Locke [2,5,11,12].

Las modificaciones realizadas en el presente estudio fueron las siguientes:

1. La gelificación del medio se realizó en autoclave y no en baño de María. Se verificó que haciendo esta modificación el medio resultante es más compacto sin presencia de grietas o burbujas, las cuales no son recomendables [10].

2. Uso de antibiótico (gentamicina) en la solución de Locke sobrenadante. Otros autores han empleado otros antibióticos [2]. De esta forma el cultivo elaborado fue de tipo axénico aunque no totalmente. Esa modificación se realizó debido a que la gran proliferación bacteriana estaba interfiriendo con el desarrollo del parásito o dificultaba su observación.

3. Se usó polvo de arroz comercial empleado como alimento infantil como sustituto.

Siembras: Con los medios a temperatura ambiente se procedió a la siembra de las 100 muestras fecales. Se agregó solución de Locke como sobrenadante a la base semisólida hasta cubrir el bisel. Con la ayuda de un aplicador de madera se emulsionó aproximadamente 1 g de muestra fecal y se agregó al medio de cultivo frotando sobre el bisel (en forma de estría, de abajo hacia arriba), sin realizar punción. Luego se le añadió 30 mg de polvo de arroz esterilizado en horno durante 2 1/2 horas a 150 °C. Se mezcló por inversión. Se llevaron los tubos a una estufa a 37 °C y se realizaron observaciones a las 24, 48 y 72 horas.

Estudio microscópico: Para la visualización microscópica se tomó, una alícuota de 2 mL del líquido del fondo del bisel y se centrifugó, se desechó el sobrenadante y se utilizó una gota del sedimento resuspendida en solución salina fisiológica y otra en lugol. Se empleó un solo tubo con medio para cada muestra fecal.

Análisis estadístico: Con la información obtenida se construyó una base de datos con ayuda del programa SPSS 8.0 para Windows. Para el análisis comparativo entre las técnicas diagnósticas empleadas se utilizaron frecuencias relativas (%) y el coeficiente Kappa (k) para verificar concordancia de resultados entre las técnicas empleadas para diagnosticar *Blastocystis* sp. Se consideró una concordancia deficiente cuando el valor calculado es $\leq 0,4$; buena cuando el valor calculado estuvo entre $>0,4$ y $\leq 0,75$ y excelente si era $>0,75$. También se calculó la Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) del cultivo comparado con el examen directo y con la sedimentación espontánea.

Resultados

De las 100 muestras evaluadas, 90 resultaron positivas para *Blastocystis* sp. en al menos una de las tres técnicas empleadas; esto representó una prevalencia global de 90%. De estas 90 muestras, 83 resultaron positivas en el cultivo; mientras que 60 fueron positivas en el examen directo y 57 en la sedimentación espontánea. De las 90 muestras positivas, 19 (21,1%) resultaron positivas por una sola técnica (6 por el directo y 13 por cultivo), 31 (34,4%) por dos técnicas (14 casos el directo y el cultivo, 1 caso directo y sedimentación y 16 casos cultivo más sedimentación) y un total de 40 muestras (44,4%) resultaron positivas por las tres técnicas. Cabe resaltar que en 10 muestras no se observaron estadios del parásito para las tres evaluaciones empleadas.

En la tabla 1 se muestra la comparación entre el examen directo y el cultivo en el diagnóstico de *Blastocystis* sp. Se determinó la presencia del parásito por ambas técnicas en 53 (88,3%). De las 40 muestras que resultaron negativas en el examen directo, 30 fueron positivas en el cultivo. Mientras que de las 60 muestras positivas en el examen directo, 7 fueron negativas en el cultivo. A pesar de ello no hubo diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2=3,024$, g.l.=1, $p>0,05$) entre ambas técnicas pero la concordancia de las técnicas según el índice Kappa calculado, fue deficiente (<4). La sensibilidad del cultivo comparada con la del examen directo fue elevada (88,3%); aunque la especificidad fue baja (25%). Por otro lado, el VPP del examen directo fue mayor que el del cultivo y el VPN del cultivo fue mayor que el del examen directo.

Cuando se realizó este mismo análisis comparando el cultivo con la sedimentación espontánea la situación fue la siguiente (Tabla 2): de las 57 muestras positivas en la sedimentación espontánea, 1 resultó negativa en el cultivo, mientras que de las 43 muestras negativas en la sedimentación espontánea, 27 fueron positivas en el cultivo. En esta comparación los resultados son significativos estadísticamente ($\chi^2=21,836$, g.l.=1, $p<0,05$) a favor del cultivo, aunque el coeficiente Kappa muestra una concordancia deficiente (<4) entre ambas técnicas.

Tabla 1. Relación entre las técnicas de examen directo y el cultivo en el diagnóstico de *Blastocystis* sp. Comunidad indígena Itopoicon, estado Bolívar, julio de 2010.

Cultivo	Examen directo			Estadístico				
	Positivo	Negativo	Total	Cultivo	Examen directo			
	No.	%	No.	%	No.	%	S: 88,3%	S: 63,8%
Positivo	53	88,3	30	75,0	83	83	E: 25%	E: 58,8%
Negativo	7	11,7	10	25,0	17	17	VPP: 63,8%	VPP: 88,3%
Total	60	60,0	40	40,0	100	100	VPN: 58,8%	VPN: 25%
k: 0,147 (Deficiente)								

$$\chi^2 = 3,024 \quad g.l. = 1 \quad p > 0,05$$

S: Sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, k: coeficiente Kappa de concordancia.

Tabla 2. Relación entre las técnicas de sedimentación espontánea y el cultivo en el diagnóstico de *Blastocystis* sp. Comunidad indígena Itopoicon, estado Bolívar, julio de 2010.

Cultivo	Sedimentación espontánea			Estadístico				
	Positivo	Negativo	Total	Cultivo	Sediment. espontánea			
	No.	%	No.	%	No.	%	S: 98,2%	S: 67,5%
Positivo	56	98,2	27	62,8	83	83	E: 37,2%	E: 94,1%
Negativo	1	1,8	16	37,2	17	17	VPP: 67,5%	VPP: 98,2%
Total	57	57,0	43	43,0	100	100	VPN: 94,1%	VPN: 37,2%
k: 0,383 (Deficiente)								

$$\chi^2 = 21,836 \quad g.l. = 1 \quad p < 0,05$$

S: Sensibilidad, E: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo, k: coeficiente Kappa de concordancia.

La sensibilidad del cultivo fue buena (98,2%) no así su especificidad que fue de 37,2%. El VPP de la sedimentación espontánea fue elevado, es decir, hay 98,2% de probabilidad que esta prueba resulte positiva si el cultivo resulta también positivo; mientras que apenas hay 37,2% de probabilidad de que la sedimentación resulte negativa siendo el cultivo negativo, es decir, un VPN bajo.

Discusión

Aunque el cultivo puede emplearse para el diagnóstico de varias especies parasitarias, en especial de protozoarios, éste no siempre forma parte de la rutina diagnóstica debido a que hay otras técnicas más sencillas, rápidas y de igual o mayor rendimiento diagnóstico [9,10,25].

En general, en el caso de las protozoosis intestinales, el cultivo suele hacerse no sólo para establecer el diagnóstico, sino con fines didácticos y de investigación [10,25]. En el caso de *Blastocystis* sp., la técnica de examen directo es la más adecuada para realizar el diagnóstico en las muestras fecales [20,26]. Sin embargo, varios autores han mostrado utilidad del cultivo en el diagnóstico, empleándose incluso para realizar control postratamiento [5,9,12-15, 22].

Para el cultivo de *Blastocystis* sp. se han empleado varios medios [3,5,9,10,13,14,22,27-37], sin embargo, el de Boeck y Drbohlav o alguna modificación, ha sido el más común. Este es un medio utilizado inicialmente para el diagnóstico de amibas y como en el presente estudio, ha mostrado resultados satisfactorios para el diagnóstico y aislamiento de *Blastocystis* sp. [3-5,7,10,12,15,24,38]. A nivel local, en nuestros laboratorios, a veces resulta difícil elaborar el medio debido a falta de alguno de los insumos y reactivos o por su elevado costo. Además, una vez elaborado el medio requiere su estandarización para poder ser usado rutinariamente en el laboratorio. En el presente estudio se realizó la modificación y estandarización de algunas condiciones de cultivo, las cuales permitieron que el parásito se reprodujera adecuadamente.

Se determinó una elevada prevalencia de *Blastocystis*

sp. en los 100 habitantes evaluados, lo cual confirma que actualmente es el parásito intestinal más común en el estado Bolívar, Venezuela y en el mundo [6,21,39].

La prevalencia del parásito varió según la técnica empleada siendo mayor con el cultivo (83%). Otros autores han comparado el examen directo con otras técnicas diagnósticas para *Blastocystis* sp. [20,22]. Los resultados mostraron que el cultivo suele ofrecer un mayor porcentaje de positividad, en términos de sensibilidad, comparado con las otras técnicas utilizadas. Hallazgos similares han sido señalados previamente tanto con el medio de Boeck y Drbohlav como con otros medios [3,7,11,14,22,29,32].

Cuando se compara el cultivo con el examen directo, que es reconocido como el mejor método diagnóstico para este protozooario [20,26], se verificó una buena sensibilidad (88,3%), aunque baja especificidad (25%). El VPP del cultivo no fue muy elevado (63,8%), lo que indica que la probabilidad de que esta técnica resulte positiva estando positivo el examen directo tampoco es muy elevada. Igual ocurre con el resultado del VPN que fue de 58,8% para el cultivo, eso indica que hay 58,8% de probabilidad de que esta técnica resulte negativa siendo el examen directo también negativo. Finalmente, la concordancia entre esas dos técnicas fue deficiente como lo indicó el coeficiente Kappa calculado. Todos esos resultados indican que ambas técnicas ofrecen resultados diferentes siendo mejor el cultivo.

En nuestro estudio se empleó como método de concentración la sedimentación espontánea la cual puede ser comparada en sensibilidad al formol-éter, resultando la de menor rendimiento para el diagnóstico del parásito, coincidiendo con estudios previos [14,20].

Según el resultado del VPP, hay 98,2% de probabilidad que la técnica de sedimentación espontánea resulte positiva si el cultivo resulta también positivo; mientras que apenas hay 37,2% de chance (VPN) de que la sedimentación resulte negativa siendo el cultivo negativo. Además, la concordancia de resultados entre ambas técnicas fue deficiente ($k < 4$). Todo lo anterior sugiere que el cultivo al igual que sucedió al comparar con el examen directo, ofrece mejores resultados que la sedimentación espontánea. En la literatura no existen estudios donde se hayan empleado estos estadísticos para la comparación de técnicas.

Como sucedió en nuestro trabajo, el cultivo puede ser positivo aun en muestras donde las otras técnicas resultan negativas y la positividad no necesariamente depende de la cantidad de formas parasitarias detectadas en las heces del paciente sino tal vez de la viabilidad y otras características biológicas, bioquímicas y/o moleculares del parásito [20]. En siete casos el examen directo resultó positivo y el cultivo negativo; mientras que en otro caso la sedimentación espontánea fue positiva y el cultivo negativo. Esto puede ser explicado porque el parásito no estaba viable o no se adaptó al medio artificial. Es sabido que ciertos clones, aislados o subtipos de *Blastocystis* son más difíciles de cultivar que otros [2,26,40,41]. Finalmente, a pesar de la elevada sensibilidad que puede tener el cultivo, la ausencia

de crecimiento, no descarta la presencia de infección [10].

Por otro lado, el cultivo puede resultar una herramienta útil para realizar los controles postratamiento como han sugerido otros autores [5,15]. Aunque el examen directo es la técnica más idónea para el diagnóstico [20], cuando el paciente recibe tratamiento el número de formas vacuolares tiende a disminuir y a aumentar las formas quísticas, lo que determina que el examen directo vaya perdiendo eficacia y el cultivo tiende a mejorar su rendimiento en los controles de cura posteriores [5].

Otro aspecto a considerar es que con el cultivo se pueden estudiar los aspectos morfológicos y biológicos del parásito [4,5,25,28,31,42]. Varios autores han mostrado que algunas formas del parásito sólo se observan en cultivo o son más comunes en éste, lo que ha ayudado a dilucidar varios aspectos de la morfología y biología de *Blastocystis* sp. [2,4,12,22,26,31,43]. Aunque no era parte de los objetivos de este estudio, al realizar la observación microscópica se pudo verificar la presencia de abundantes formas granulares que son no comunes en la heces, además en muchos casos se verificaron formas vacuolares en división mostrando una intensa actividad replicativa del parásito en el cultivo. Observaciones similares han realizado otros autores [4,6,22,26].

El cultivo también es el paso inicial para lograr cantidades adecuadas del parásito puro para realizar estudios bioquímicos y moleculares [1,25,33,35,36,42,44-46]. En nuestro estudio se logró mantener a *Blastocystis* sp. en repiques sucesivos durante tres semanas empleando este medio de cultivo. Aunque no se logró la axenización completa, ésta podría conseguirse y pudiera ser parte de otros estudios futuros. La axenización es necesaria para realizar estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares del parásito que, aunque no se realizan en nuestro medio, son fundamentales para establecer la verdadera relevancia clínica del parásito una vez que se ha demostrado actualmente que hay genotipos que son más prevalentes que otros y lo más importante, existe además de diversidad genética, variabilidad en la patogenicidad de los genotipos [8,36,39-41,47,48].

A pesar de lo anterior y considerando la elevada frecuencia de formas vacuolares en las muestras fecales de pacientes con blastocistosis (superior al 90%), por la sencillez del examen directo y su bajo costo, éste debe seguir siendo de elección para el diagnóstico de *Blastocystis* sp. [2,20,22,26]. La situación cambia cuando el diagnóstico con las otras técnicas sea incierto o se requiera hacer controles de cura o se necesite aislar el parásito para realizar otro tipo de estudio [10]. En esos casos se requiere cultivar al parásito y el medio utilizado parece ser una opción adecuada.

En conclusión, basados en los resultados obtenidos en este trabajo, el cultivo presentó un rendimiento diagnóstico elevado (83%) y pudiera ser una alternativa al examen directo y la sedimentación espontánea que resultaron positivas en el 60% y 57% de los casos respectivamente.

Referencias

1. Upcroft JA, Dunn LA, Dommett LS, Healey A, Upcroft P, Boreham PFL. Chromosomes of *Blastocystis hominis*. *Inter J Parasitol.* 1989; 19:879-83.
2. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*-Past and Future. *Clin Microbiol Rev.* 1991; 4:61-79.
3. Leelayoova S, Taamasri R, Rangsin T, Naaglor U, Thathaisong U, Mungthin M. *In-vitro* cultivation: a sensitive method for detecting *Blastocystis hominis*. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002; 96:803-7.
4. Guzmán de Rondón C, Arrechereda H, Pérez E. Ultraestructura de *Blastocystis hominis* y su enquistamiento en cultivo polixénico. *VITAE Academia Biomédica Digital.* [Serie en línea]. 2007; 30. Disponible en: <http://caibco.ucv.ve/vitae>. Acceso abril de 2010.
5. Guzmán de Rondón C, Vethencourt MA, Galindo Pérez M, Chacón N, Wagner C, Nessi Paduani A. Comportamiento biológico de *Blastocystis hominis* en pacientes tratados con secnidazol (Unidazol®). *Rev Soc Ven Microbiol.* 2008; 28:66-71.
6. Tan KS. New Insights on classification, identification and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21:639-65.
7. 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; 59:303-7.
8. Hamblin K, Standley D, Matthew R, Stechmann A, Andrew R, Maytum R, *et al.* Localization and nucleotide specificity of *Blastocystis succinyl-CoA* synthetase. *Mol Microbiol.* 2009; 68: 1395–1405.
9. Salinas JL, González H. Infección por *Blastocystis*. *Rev Gastroenterol Perú.* 2007; 27:264-74.
10. Clark GC, Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15: 329-41.
11. Zierdt CH, Williams RL. *Blastocystis hominis*: axenic cultivation. *Exp Parasitol.* 1974; 36:233-43.
12. Lanuza MD, Carbajal JA, Villar J, Borrás R. Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. *Parasitol Res.* 1997; 83:60-3.
13. Zierdt CH, Rude W, Bull B. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *Am J Clin Pathol.* 1967; 48:495-501.
14. Suresh K, Smith H. Comparison of methods for detecting *Blastocystis hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23:509-12.
15. Idris N, Dwipoerwantoro P, Kurniawan A, Said M. Intestinal parasitic infection of immunocompromised children with diarrhoea: clinical profile and therapeutic response. *J Infect Dev Ctries.* 2010; 4:309-17.
16. Chourio Lozano G, Díaz I, Casas M, Sánchez M, Torres L, Luna M, *et al.* Epidemiología y patogenicidad de *Blastocystis hominis*. *Kasmera.* 1999; 27:77-102.
17. Sulbaran S, Carrero de Pérez MC, Pérez M, Carrero JE. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en pacientes sintomáticos. *Med-ULA.* 1999; 5:48-55.
18. Requena I, Hernández Y, Ramsay M, Salazar C, Devera R. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en vendedores ambulantes de comida del municipio Caroní, estado Bolívar, Venezuela. *Cad Saude Pub.* 2003; 19:1-12.
19. Traviezo L, Triolo M, Agobian G. Predominio de *Blastocystis hominis* sobre otros enteroparasitos en pacientes del municipio Palavecino, estado Lara, Venezuela. *Rev Cub Med Trop.* 2006; 58:1-6.
20. Devera R, Blanco Y, Requena I, Velásquez V. Diagnóstico de *Blastocystis hominis*: bajo rendimiento de los métodos de concentración de formol-éter y sedimentación espontánea. *Rev Biomed.* 2006; 17:231-3.
21. Devera R, Amaya I, Blanco Y, Montes A, Muñoz M. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en estudiantes de la Unidad Educativa Bolivariana Alejandro Otero “Los Alacranes”, San Félix, estado Bolívar. *VITAE Academia Biomedica Digital.* 2009. No. 39. Disponible en: <http://vitae.ucv.ve/pdfs>. Acceso en septiembre de 2010.
22. Pérez de Suárez E, Guzmán de Rondón C. La morfología de *Blastocystis hominis* en las heces y evaluación de métodos parasitológicos. *GEN.* 1994; 48:226-31.
23. World Medical Association. Ethical principles for medical research involving human subjects. Declaration of Helsinki. 2008. Disponible en: <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>. Acceso abril de 2010.
24. Botero D, Restrepo M. *Parasitosis Humanas.* 4ta ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2005.
25. Visvesvara GS, Garcia LS. Culture of Protozoan Parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15:327–8.
26. Stenzel D, Boreham P. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9:563-84.
27. Zierdt CH. Studies of *Blastocystis hominis*. *J Protozool.* 1973; 20:114-21.
28. Dunn LA, Boreham PLF, Stenzel DJ. Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *Intern J Parasitol.* 1989; 19:43-56.
29. Kukoschke KG, Necker A, Müller HE. Detection of *Blastocystis hominis* by direct microscopy and culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990; 9:305-7.
30. Ho LC, Singh M, Suresh G, Ng GC, Yap EH. Axenic culture of *Blastocystis hominis* in Iscove's modified Dulbecco's medium. *Parasitol Res.* 1993; 79:614-6.
31. Suresh K, Ng GC, Ramachandran NP, Ho LC, Yap EH, Singh M. *In vitro* encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 1993; 79:456-60.
32. Zaman V, Khan KZ. A comparison of direct microscopy with culture for the diagnosis of *Blastocystis hominis*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1994; 25:792-3.
33. Yoshikawa H, Kuwayama N, Enose Y. Histochemical detection of carbohydrates of *Blastocystis hominis*. *J Eukaryot Microbiol.* 1995; 42:70-4.
34. Tan KS, Ng GC, Queck E, Howe J, Ramachandran NP, Yap EH, Singh M. *Blastocystis hominis*: a simplified, high-efficiency method for clonal growth on solid agar. *Exp Parasitol.* 2000; 96:9-15.
35. Termmathurapoj S, Leelayoova S, Aimpun P, Thathaisong U, Nimmanon T, Taamasri P, *et al.* The usefulness of short-term *in vitro* cultivation for the detection and molecular study of *Blastocystis hominis* in stool specimens. *Parasitol Res.* 2004; 93:445-7.
36. Wong KH, Ng GC, Lin RT, Yoshikawa H, Taylor MB, Tan KS. Predominance of subtype 3 among *Blastocystis* isolates from a major hospital in Singapore. *Parasitol Res.* 2008; 102:663-70.
37. Rene B, Stensvold CR, Badsberg JH, Nielsen HV. Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80:588-92.
38. Gonçalves A, Da Costa Viana J, Pires EM, Bóia M, Coura JR, Silva EF. The use of the antifungal agent miconazole as an inhibitor of *Blastocystis hominis* growth in *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* cultures. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007; 49:201-2.
39. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, Abbas Z, Naz S, Islam M, Khan R. Irritable bowel syndrome: is it associated with genotypes of *Blastocystis hominis*. *Parasitol Res.* 2010; 106:1033- 8.
40. Domínguez-Márquez MV, Guna R, Muñoz C, Gómez-Muñoz MT, Borrás R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitol Res.* 2009; 105:949-55.

41. Stensvold CR, Suresh GK, Tan KS, Thompson RC, Traub RJ, Viscogliosi E, *et al.* Terminology for *Blastocystis* subtypes—a consensus. *Trends Parasitol.* 2009; 23:93–6.
42. Zierdt CH, Donnelly C, Muller J, Constantopoulos G. Biochemical and ultrastructural study of *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol.* 1988; 26:965-70.
43. Kukoschke K, Muller H. Varying incidence of *Blastocystis hominis* in cultures from faeces of patients with diarrhoea and from healthy persons. *Zentralbl Bakteri.* 1992; 277:112–8.
44. Mansour NS, Mikhail EM, El Masry NA, Sabry AG, Mohareb EW. Biochemical characterization of human isolates of *Blastocystis hominis*. *J Med Microbiol.* 1995, 42:304-7.
45. Ho LC, Jeyaseelan K, Singh M. Use of the elongation factor-1 gene in a polymerase chain reaction-based restriction-fragment-length polymorphism analysis of genetic heterogeneity among *Blastocystis* species. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; 112: 287-91.
46. Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, *et al.* Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of *Stramenopiles* inferred from multiple molecular sequence data. *J Euk Microbiol.* 2002; 49:42-53.
47. Elwakil HS, Talaat RM. Genetic analysis of *Blastocystis hominis* isolated from symptomatic and asymptomatic human hosts in Egypt. *J Egypt Soc Parasitol.* 2009; 39:99-109.
48. Eroglu F, Genc A, Elgun G, Koltas IS. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitol Res* 2009; 105:1589-92.