

CARACTERIZACION MOLECULAR DE *Blastocystis sp* EN MUESTRAS
FECALES DE MASCOTAS (CANINAS) Y DE NIÑOS DE UNA INSTITUCION
ESCOLAR EN POPAYÁN, CAUCA.



LORENA BUITRON CAICEDO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2017

CARACTERIZACION MOLECULAR DE *Blastocystis sp* EN MUESTRAS
FECALES DE MASCOTAS (CANINAS) Y DE NIÑOS DE UNA INSTITUCION
ESCOLAR EN POPAYÁN, CAUCA

Trabajo de Grado como requisito para optar el título de Bióloga

LORENA BUITRON CAICEDO

DIRECTOR

MSc. Luis Reinel Vásquez A.

Grupo de investigación Centro de Estudios en Microbiología y Parasitología
CEMPA

CO-DIRECTOR

MSc, PhD Leydy Lorena Mendoza Tobar.

Grupo de Investigaciones Infección e Inmunidad - UTP

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGIA
POPAYÁN
2017

Nota de aceptación

Director _____
MSc. Luis Reinel Vásquez A.

Jurado _____
MSc. Fabiola E. González

Jurado _____
PhD. Astrid Lorena Urbano

Lugar y fecha de sustentación: Popayán, 15 de Noviembre de 2017

Contenido

1. INTRODUCCION	5
2. JUSTIFICACION	9
3. MARCO TEORICO.....	10
4. ANTECEDENTES	14
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
5. METODOLOGIA	18
6. RESULTADOS	20
7. LITERATURA CITADA.....	36

INTRODUCCION

Blastocystis sp es un protozoo entérico que ha sido aislado previamente en humanos y animales incluyendo mamíferos, aves, reptiles, artrópodo, anfibios y peces, puede ser transmitido por consumo de agua no tratada o alimentos contaminados con heces de los hospederos parasitados^{1,2,3,4,5,6,7,8,}

Este parásito presenta una gran variedad morfológica, entre las cuales se reconocen las formas vacuolar, ameboide, quística y granular, se puede presentar clínicamente como asintomática o asociarse a signos y síntomas gastrointestinales tales como diarrea, dolor intestinal, vómito, malestar general, disminución de peso, fiebre, anorexia, presencia de moco sin sangre y flatulencias. Puede afectar a pacientes inmunosuprimidos y estar asociado a colon irritable en diarreas de tipo crónico, sin embargo, es bastante frecuente encontrarlo en poblaciones infantiles^{9,10,11,12,13,14}.

Estudios endoscópicos y biopsias realizadas en pacientes demuestran que éste parásito se localiza en el intestino grueso en donde puede dar lugar a un proceso inflamatorio y cambios de la permeabilidad de la pared de éste órgano. Por otro lado, *Blastocystis* sp secreta sustancias con capacidad de inducir apoptosis (muerte celular) en las células del epitelio entérico^{15,16,17,18,19,20,21}.

Éste parásito ha tenido una historia controversial en cuanto a su capacidad patógena, pues hasta el momento no se ha establecido con claridad si es un patógeno, un microorganismo comensal o un oportunista^{14,22,23,24}.

Hasta el momento la vía de transmisión no se ha definido, sin embargo algunos estudios realizados han encontrado trasmisión entre miembros de una misma familia, pacientes internados, comunidades sin un manejo sanitario adecuado, por medio del consumo de agua sin hervir, transmisión fecal-oral, por falta de higiene, como también la ruta humano-animal que aún está en estudio^{11,25,26}

Según las investigaciones en especies animales que presentan infección por *Blastocystis* sp encontramos una variedad de hospederos como el perro, gato, cerdo, primates, aves, roedores entre otros^{10,13,27,28,29,30}.

Los análisis de laboratorio clínico que se realizan para la detección de *Blastocystis* sp con una aproximación más directa al diagnóstico, se llevan a cabo a través de los exámenes coproparasitológicos empleando muestras seriadas de heces, métodos de sedimentación bifásicos, coloraciones permanentes como la tricrómica y hematoxilina férrica, la utilización de la prueba de ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para la evaluación de la infección y a través de pruebas moleculares como la PCR (Polymerase Chain reaction) que permiten una determinación con una mayor sensibilidad que los métodos convencionales^{15,31,32,33}.

El diagnóstico de esta parasitosis intestinal se realiza usualmente haciendo un estudio de las heces con un montaje directo o por medio de técnicas de concentración³⁴. Sin embargo las técnicas moleculares son de mayor sensibilidad y especificidad para hacer el diagnóstico de esta parasitosis, de tal forma que algunas de ellas logran determinar los subtipos, y de esta forma acrecentar el conocimiento epidemiológico en cuanto a la transmisión del parásito^{35,71,85,88,89}.

La blastocystosis se puede prevenir teniendo en cuenta algunas prácticas de higiene y cuidado como: 1. Una buena frecuencia de lavado de las manos con abundante agua y jabón, 2. Hervir el agua de consumo, 3. Lavar bien los alimentos antes de consumir, 4. Lavar los utensilios de cocina antes de utilizarlos, 5. Prestar mayor atención en los menores de edad debido a que ellos están más propensos a contagiarse por estar en contacto con elementos posiblemente contaminados³⁶.

La prevalencia de este parásito varía mucho de un país a otro y dentro de comunidades de una misma región, mientras en las naciones industrializadas varía de 0,3% a 33% , en los países en vía de desarrollo fluctúa entre 0,8% a 95,7%,^{9,25,37,38,39,40} dado que entre los factores de riesgo para la infección por *Blastocystis* sp están el bajo nivel socio-económico, insuficiente suministro de agua potable y alimentos contaminados, mala higiene personal, exposición a

animales, bajo nivel educativo, desnutrición y deficiente cobertura del servicio de salud^{1,41,42,43}.

Estudios adelantados en varios países para determinar la prevalencia de *Blastocystis* sp en población infantil ha demostrado que varía de 0,8% a 100% sin diferencias entre géneros^{42,44,45,46,47,48}

En Colombia, la blastocistosis fluctúa en población humana de 0,8% a 88% sin distinguir hospederos sintomáticos o asintomáticos^{40,49,50,51,52,53,54,55}, adicionalmente, se han observado diferentes porcentajes de prevalencia en población infantil, que fluctúan entre 0,8% a 88%^{16,40,43,51,55,56,57,58,59,60}. Estos análisis se basan mediante microscopía óptica, con un desconocimiento total de los subtipos o genotipos que se encuentran circulando en el territorio nacional⁴².

Por otro lado estudios realizados en animales domésticos, en Colombia la prevalencia de *Blastocystis* sp es del 55.3% y dentro de este porcentaje, 63,3% corresponde a los perros. En un estudio realizado en Popayán en caninos con dueño se registró un porcentaje de 14,8% (55/372)⁵⁶, lo cual puede indicar una importante fuente de transmisión al humano^{10,42,61}. Se debe agregar que para el departamento del Cauca el diagnóstico de parasitismo intestinal se hace por medio de coprología.

La epidemiología molecular es muy variable entre países y de una región a otra, ha sido de gran importancia a nivel clínico debido a que gracias a su eficacia y sensibilidad que muestra en los resultados de parasitismo intestinal, se ha logrado establecer diagnósticos tempranos y apropiados, que cobran gran importancia para la prevención, vigilancia, control y tratamiento, especialmente cuando las técnicas convencionales han sido muy limitadas para lograr estos propósitos.

De manera que éste trabajo se realizó con el fin de aplicar biología molecular como la PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction) para la detección de *Blastocystis* sp en muestras de heces provenientes de niños de una

institución escolar y sus mascotas caninas, en el municipio de Popayán, siendo éste el primer estudio de esta naturaleza realizado en el departamento del Cauca.

JUSTIFICACION

En Colombia el parasitismo intestinal ocasionado por *Blastocystis* sp. es muy frecuente en la población infantil y puede pasar desapercibido al presentarse sin ningún cuadro clínico^{11,10,34,62,63}. En algunas ocasiones puede provocar signos y síntomas que van desde diarrea, distensión abdominal, flatulencias, respuesta inflamatoria sin presencia de sangre, fiebre y pocas veces prurito anal y urticaria; éstas situaciones provocan ausentismo escolar, disminución en su capacidad cognitiva y problemas de mal nutrición^{10,11,64,65}.

Blastocystis sp puede parasitar al ser humano, pero también puede infectar diversos hospederos animales (perros, primates no humanos, aves, roedores, etc.), sin embargo poco es lo que se conoce sobre los subtipos, que se podrían compartir entre estos hospederos vertebrados y su rol en la transmisión de la parasitosis hacia los humanos^{42,44}.

Por otra parte estudios adelantados en varios países para determinar la prevalencia de *Blastocystis* sp en niños, muestran que esta va de 1.1% a 48.7% sin diferencias entre géneros⁴⁴.

El coprológico acompañado de métodos de concentración son procedimientos válidos para la detección de *Blastocystis* sp ya que es la más utilizada en los laboratorios debido a su bajo costo y la sencillez de la prueba, sin embargo esta requiere de experiencia y al mismo tiempo es poco sensible e inespecífica, ya que los quistes pueden confundirse con otros parásitos que presentan morfología semejante, por lo cual algunos autores manifiestan que la técnica molecular PCR^{23,26,66,67,68,69,70}, ha demostrado ser de vital importancia con el fin de esclarecer la dinámica de trasmisión, los factores determinantes de la infección tanto en aislados provenientes de animales como de Humanos, y por otra parte brinda una mayor sensibilidad, especificidad y rapidez^{49, 66,67, 70,71,72,73}.

Por ésta razón, el presente proyecto propuso la implementación de la técnica a nivel molecular, PCR, ya que permite determinar la presencia de *Blastocystis* sp debido a la amplificación del ADN, mejorando con ello el diagnóstico y así amplia el conocimiento de la epidemiología en el Cauca.

MARCO TEORICO

Historia

Blastocystis sp es un protozoo anaerobio que se encuentra con mayor frecuencia en el intestino ya sea de animales o del humano^{9,15,44}.

El parasito fue descrito por Alexeief (1911) quien le dio el nombre de *Blastocystis enterocola* y Brumpt (1912) con el nombre de *Blastocystis hominis*, en donde hasta ése momento no se prestó mayor interés y se lo consideró como una levadura, tan solo 1967 Charles Zierdt y colaboradores retomaron el interés por el parásito presentando evidencia para clasificar a *Blastocystis hominis* como un protozoario^{11,74}.

Hoy en día la realización de estudios filogenéticos de la subunidad pequeña del rRNA y la subunidad de rDNA acerca de éste parásito ha permitido ubicarlo como un protozoo, supergrupo chromoalveolata, primer rango Stramenopiles, segundo rango opalinata, género *Blastocystis*^{15,75,76}.

Actualmente con los avances de las técnicas moleculares se ha logrado comprobar la gran variabilidad genética tanto en humanos como en animales, por lo cual se ha propuesto la eliminación de la nomenclatura *Blastocystis hominis* para aquellos aislamientos en personas y ser remplazada por la de *Blastocystis sp* según el consenso de 2007¹⁵.

Ciclo de vida

En cuanto a la trasmisión de este parásito en humanos se asume que es por vía fecal-oral, y la literatura a nivel mundial agrupa a la blastocistosis como una infección olvidada causada por un protozoo asociada a la calidad de agua consumida por las comunidades, pero también se observa la infección como una entidad zoonótica^{11,77,78}

Blastocystis sp se encuentra localizado en el colon en donde se han detectado cuatro formas de reproducción asexual: División binaria; Plasmotomía que consiste en la formación de varios núcleos, que dan origen a varios organismos; Endodiogenia en la que una célula madre da origen a dos hijas, antes de que se divida el parásito; y Esquizogonia, que es la formación de gran cantidad de células hijas que forman un esquizonte²⁵, sin embargo hasta el momento el único modo de división demostrado es la fisión binaria^{11,5,6,24}.

Éste parásito registra numerosas formas evolutivas (vacuolares, granulares, ameboidales, avacuolares, multivacuolares y quísticas) que conforman un ciclo vital aún en estudio^{11,79}. Figura 1

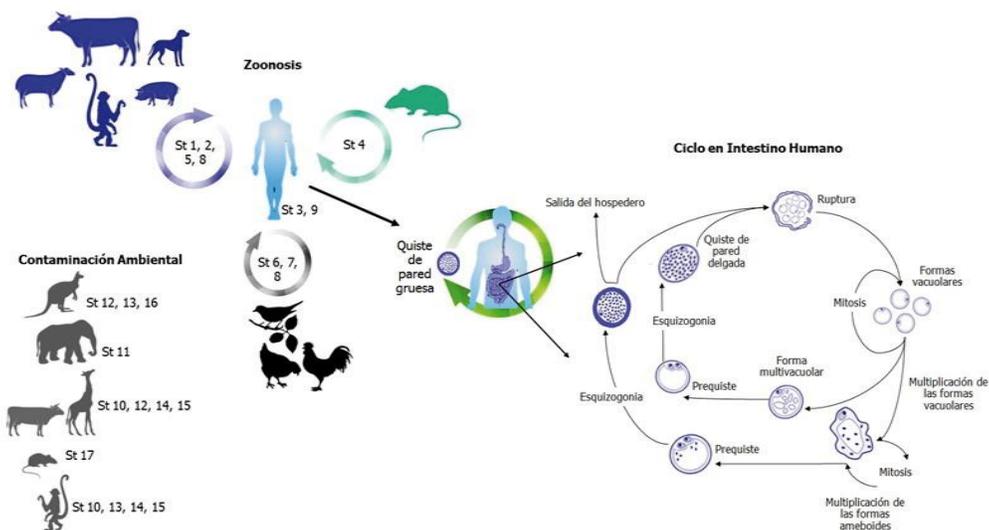


Figura 1. Ciclo de vida. En este ciclo se evidencia diecisiete subtipos (St) de *Blastocystis* sp. y sus respectivos hospederos intermediarios. Tomado de: Amaya, et al. 2015.

Epidemiología

Epidemiológicamente la distribución de éste organismo es mundial, probablemente es el parásito más común, con un porcentaje que oscila entre 0,8% a 100% de prevalencia en países tropicales y 0,3% a 33% en países desarrollados^{15,49,79}.

De acuerdo a investigaciones a nivel mundial, la presencia de *Blastocystis* sp en poblaciones humanas se asocia con la eliminación de las heces, deficiente saneamiento ambiental, contaminación de agua y alimentos que se consumen crudos como frutas y verduras, un bajo control veterinario de mascotas que son hospederos del parásito o contacto con otros animales, entre otras^{51,80}.

Diagnostico

El diagnóstico parasitológico se realiza por coprología, el cual aumenta la sensibilidad de la búsqueda del protozoo; también se debe acompañar con técnicas de concentración de heces como ritchie-frick o sheatter las cuales aumentan la probabilidad de ver el parásito por un profesional con experiencia en el laboratorio clínico³⁴. Esta técnica es empleada para la búsqueda de huevos, quistes y larvas de parásitos, no importa la densidad que tengan. Se utiliza para protozoos y helmintos^{24, 25}.

Por otro lado las tinciones de frotis de heces como hematoxilina o tricómica son de gran utilidad pero estas no suelen estar estandarizadas en laboratorios clínicos de primer nivel de atención en Colombia y otros países.

Otras pruebas que no son de rutina como la ELISA y PCR, son de mejor sensibilidad y especificidad pero lastimosamente no se encuentran de gran acceso en los centros hospitalarios^{15,81}.

Se debe recalcar la importancia de una buena historia clínica realizada a los pacientes humanos que permita una sospecha de esta parasitosis en las personas acompañada de una buena anamnesis

Técnicas moleculares

La biología molecular y la genética han contribuido al amplio conocimiento acerca de *Blastocystis* sp, es por ello que hoy día es importante conocer las diferentes técnicas empleadas entre las cuales tenemos:

La PCR es una técnica molecular *in vitro* que permite la síntesis de grandes cantidades de un fragmento específico de ADN. Esta técnica tuvo éxito a mediados de los 80s, gracias al descubrimiento por Mullis y sus colaboradores, haciéndolos merecedores del premio Nobel. Sus ventajas y características han permitido descubrir importantes hallazgos para la epidemiología molecular, genética y oncología, debido a que es altamente específica, susceptible, y versátil⁸².

Esta técnica ha sido empleada en diagnóstico de enfermedades hereditarias, infecciosas, prenatales, oncológicas, y medicina forense, demostrando así el potencial para la investigación y las aplicaciones clínicas^{82,83}. Como también ha sido utilizada para discriminar cepa, especie, y el potencial patogénico de aislamientos de *Blastocystis* sp⁶⁷.

Tratamiento

El tratamiento para *Blastocystis* sp por lo general no es necesario, pero el suministro de medicamento dependerá del sistema inmunitario del paciente,^{15,65}. Cuando se decide suministrar tratamiento se utiliza: 5-nitroimidazoles, el más frecuente a suministrar es el metronidazol (1.5 gr/día, por diez días); cuando estos medicamentos son intolerables para el paciente o no han causado efecto, se utilizan dos medicamentos alternativos como lo son: trimetoprim-sulfametoxazol (6 mg/kg/día, la primera dosis y 30 mg/kg/día la segunda dosis por siete días) y nitazoxanida (dos veces al día por tres días, 500mg adulto; 200mg cuatro a doce meses; 100mg menores de cuatro meses)⁸¹

ANTECEDENTES

En Nueva York se realizaron estudios en el laboratorio de Centro Médico Montefiore, Albert Einstein College of Medicina, para detectar la presencia de *Blastocystis sp*, llegando a la conclusión que este parasito intestinal es prevalente en heces de humanos con un porcentaje del 16%(62/358)⁴⁷. Lee (1991) indica que de todos los organismos observados en heces, *B. hominis* ocupa el segundo lugar en frecuencia, estando por debajo de las levaduras⁸⁴.

Los estudios en diferentes localidades geográficas han empleado una serie de métodos para la investigación acerca de la variación genética de blastocystosis utilizando en pequeñas sub unidades de rRNA, éstos análisis dejaron en evidencia que no había una correlación entre *Blastocystis sp* de las localidades geográficas y los STs ⁸⁵.

Al sur de Taiwán el porcentaje de *Blastocystis sp*. en matrimonios inmigrantes fue del 20.4% y en extranjeros del 18.1% siendo el parásito más prevalente, llegando a la conclusión que éste protozoo se trasmite por vía fecal-oral ⁸⁶; se cree que los aislados de este organismo son potencialmente zoonoticas debido a que se han encontrado algún grado de relación con los genotipos de otras especies, sin embargo la transmisión de esta parasitosis de humanos hacia animales no ha sido confirmada experimentalmente.

Estudios realizados actualmente en África en la ciudad de Senegal, han revelado un alto índice de prevalencia alcanzando el 100%, todos estos casos fueron causados por los subtipos 1,2,3 y 4 con un predominio del subtipo 3, para estos análisis se utilizó el PCR cuantitativa con cebadores dirigidos al gen SSU rDNA, éste alto índice de prevalencia de *Blastocystis sp* en los países en desarrollo hacen que sea un verdadero reto para las autoridades de la salud pública⁸⁷.

En Suramérica existen investigaciones que reportan la presencia de *Blastocystis sp*, los estudios en países como Perú acerca de los síntomas y factores asociados a la infección por éste parásito, han registrado que los pacientes sintomáticos

están asociados con este protozoo ocasionando dolor abdominal y urticaria, su infección se relacionaría por consumo de agua sin hervir¹⁴.

En ciudad Bolívar, Venezuela, reportan que los niños entre los 3 y 6 años de edad de un preescolar correspondientes a estratos socioeconómicos medio y bajo, dando como resultado que *Blastocystis* sp fue el parasito más dominante con una frecuencia del 29.09% de 32 casos observándose solamente formas vacuolares⁸⁸.

En Argentina los estudios fueron realizados en la ciudad de San Luis, en menores de 12 años donde se utilizaron muestras de materia fecal en 175 niños de los cuales 14 casos fueron identificados con *este protozoo* lo que corresponde a una prevalencia de 4.3% y una frecuencia de 8% de la población parasitada³⁹.

En Colombia se han realizado diferentes estudios acerca de *Blastocystis* sp con relación a su prevalencia; en ciudades como Calarcá se estimó la frecuencia de este protozoo y las posibles asociaciones de infección, manifestaciones clínicas y algunas fuentes ambientales, en una población de 1.993 niños menores de 5 años, y se seleccionaron 275 niños al azar, dando como resultado la prevalencia de infección en un 57.5% en niños, y una asociación significativa entre la presencia de parásitos en heces y su hallazgo en recipientes⁴².

Las frecuencias de *Blastocystis* sp para las diferentes ciudades de Colombia son el 25% en Suaita, Santander en 2002, en Santa Marta con un 62,6% en 2004, en Bogotá, DC en niños menores de 5 a 12 años con un porcentaje del 22.4%, en Armenia Quindío con una prevalencia del 6,1% en el 2004, Calarcá Quindío 36,4%, Medellín 4.8%, en Circasia Quindío el estudio que se realizo fue determinar la prevalencia de protozoos intestinales en infantes de 2 a 5 años, se realizaron tres muestreos para cada niño, dando como resultado porcentajes del 49.4%, 57%, 64,6% solo para *Blastocystis* sp.^{40,51,89,42}.

El no conocimiento de otras formas y la identificación basada únicamente en formas vacuolares han llevado a sub diagnosticar esta parasitosis.

En el Cauca se realizó un estudio de parasitismo intestinal en perros con dueño y se encontró que el 14,8% (55/372) presentaba *Blastocystis* sp en el año 2004⁶¹. Esta investigación no conto con las suficientes herramientas de investigación para la identificación de los subtipos y la posible relación entre huésped y hospedero, es por eso que hasta la presente no hay estudios publicados sobre el tema para esta zona.

En Guapi Cauca, la investigación del 2005 se observó que los niños en estudio presentaron un 30,6% infectados de algún tipo de parasito entre ellos *Balstocystis* sp. estos resultados fueron asociados a condiciones sanitarias y sociales de la región⁵⁵.

La blastocistosis es conocida como infección zoonoticas olvidada de acuerdo a la OMS, se conocen prevalencias en animales como roedores, perros, felinos, cerdos y otros. En Colombia estos porcentajes han fluctuado en mascotas caninas entre 2% a 37%^{10, 51,90}.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinación molecularmente a *Blastocystis sp* observados en muestras fecales provenientes de niños y caninos en una comunidad en Popayán, Cauca, 2016.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar socio demográficamente a la comunidad infantil y canina vinculada al estudio.
- Determinar la prevalencia de parásitos intestinales con especial énfasis en *Blastocystis sp*.
- Comparar la eficiencia en el diagnóstico de *Blastocystis sp*. entre el análisis molecular PCR y la técnica tradicional.
- Establecer la relación estadística entre el diagnóstico de *Blastocystis sp*. a nivel molecular y las variables de estudio.

METODOLOGIA

El trabajo fue desarrollado con el apoyo de ICBF (Instituto Colombiano de Bienestar Familiar) ubicado en la comuna 8 al suroccidente de la ciudad de Popayán, teniendo en cuenta a niños entre los 19 y 60 meses de edad. La población de niños matriculados en este jardín infantil es de 300 de los cuales se obtuvo 258 muestras fecales.

Tomas de muestra y análisis de laboratorio

Las muestras de materia fecal fueron recogidas en niños entre los 19 y 60 meses de edad que se encontraban matriculados en el ICBF, donde facilitaron la muestra de materia fecal con el consentimiento de los padres o acudientes que aceptaron participar en el estudio, como también se les solicitó a las familias que tengan como mascota un perro, la muestra de heces para realizar la búsqueda de *Blastocystis* sp.

Todas las muestras fueron procesadas por el personal calificado del laboratorio de Parasitología, de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Cauca.

El estudio coprológico de las muestras se llevó a cabo por medio de un directo de heces, acompañada por el método de concentración de Ritchie-Frick con algunas modificaciones. (Anexo1)

Determinación Molecular de *Blastocystis* sp.

Para el análisis molecular de las muestras de estudio, se realizó la extracción de DNA por medio del Kit Comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)⁹¹; de acuerdo a los protocolos del fabricante. (Anexo 2).

La Determinación de *Blastocystis* sp se llevó a cabo mediante la PCR en tiempo real para la amplificación del gen de la SSUr DNA utilizando los primers o cebadores RD5 (5'ATCTGGTTGATCCTGCCAGT3') y BhRDr (5'GAGCTTTTTAACTGCAACG3'). Las condiciones de la amplificación consistieron en 40 ciclos a 95°C 15 seg y 58°C 1min. Se empleó el sistema

TagMan para la qPCRs, en placas de 96 pozos MicroAmp (Applied Biosystems) y la enzima Taqman Maxtermix^{TM92,93}.

Análisis de datos

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 19 en el cual se determinó las frecuencias de las variables, medidas de tendencia central y de dispersión. La asociación entre las variables cualitativas se determinó a través de la prueba chi cuadrado y el test exacto de Fisher con una significancia estadística menor a 0,05.

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, que fue avalado por el comité de ética de la Universidad del Cauca.

RESULTADOS

Para el análisis se incluyeron un total de 258 niños del área urbana de Popayán, donde el 51.9% fueron niños y el 48.1% niñas, sus edades con un 1,6% menores a 24 meses, seguido de un 15,1% con edades de 26 a 36 meses y mayores hasta los 60 meses con un porcentaje de 41.8% y 41.5%.

El estrato de mayor población es el nivel uno con un 80.6% seguido del 17.1% de estrato dos y finalmente el de menor porcentaje el estrato tres con 2.3% de habitantes, reflejando así en la prestación de servicio de salud donde la gran parte de la comunidad está afiliada a subsidios del gobierno con un porcentaje del 95.3%, el 3.1% es contributivo y una minoría con 1.6% sin seguro social.

El 67.8% cuenta con vivienda propia, el resto de la población en estudio el 27.9% vive en arrendo y 4.3% casa de la familia.

En cuanto a la vivienda el material del piso era de cemento 79.8%, baldosa 18.6%, 0.8% tierra y 0.8% madera, las paredes fabricadas en ladrillo en un 67.4% de las casas.

El 99.6% de la población suministra agua a sus hogares del acueducto urbano y tan solo un 0.4% veredal. El consumo de agua en las diferentes familias el 81.8% utiliza el agua hervida; en cuanto al lavado de manos el 96.1% siempre lava sus manos. Tabla1.

Tabla 1. Perfil socio-demográfico de niños de 1 año a 6 años de un hogar infantil en Popayán Cauca.

Perfil sociodemográfico	N (258)	Porcentaje
Genero		
Masculino	134	51.9
Femenino	124	48.1
Edad (meses)		
17 – 24	4	1.6
26 – 36	39	15.1
37 – 48	107	41.5
49 – 60	108	41.8
Procedencia		
Urbano	252	97.7
Rural	6	2.3
Estrato Social		
Uno	208	80.6
Dos	44	17.1
Tres	6	2.3
Afiliación SGSS		
Ninguno	4	1.6
Subsidiado	246	95.3
Contributivo	8	3.1
Tipo de vivienda		
Propia	175	67.8
Arrendo	72	27.9
Familiar	11	4.3
Tipo de pared		
Ladrillo	174	67.4
Cemento	70	27.1
Tabla	14	5.4

Perfil sociodemográfico	N (258)	Porcentaje
Tipo de acueducto		
Veredal	1	0.4
Urbano	257	99.6
Agua para consumo humano		
Hervida	211	81.8
No Hervida	47	18.2
Lavado de manos		
Algunas veces	10	3.9
Siempre	248	96.1

Prevalencia de *Blastocystis* sp. y otros parásitos.

La prevalencia de *Blastocystis* sp hallada en los análisis de materia fecal fue del 30.6%(79/258) y 9.3%(24/258) para *Giardia lamblia*, tabla 2.

En cuanto a la presencia de otros parásitos se observó en menor frecuencia con un 26% considerando estos como no patógenos para la población humana. No hay hallazgo de helmintos lo que favorece el estado nutricional de la población Tabla2.

Tabla 2. Prevalencia de *Blastocystis* sp y otros parásitos.

Parásito	Número (258)	Porcentaje
<i>Blastocystis</i> sp	79	30,6
<i>Giardia lamblia</i>	24	9,3
<i>Entamoeba coli</i>	37	14,3
<i>Chilomastix</i>	3	1,2
<i>Endolimax nana</i>	22	8,5
<i>E. histolytica/E. dispar/E. moshkovsky</i>	4	1,6
<i>Entamoeba hartmanni</i>	1	0,4

Se hizo un análisis entre las diferentes edades de los niños en estudio, para observar que rangos presentan con mayor frecuencia el parásito, los datos estadísticos indicaron que *Blastocystis* sp se halla en los infantes mayores a 2 años, en donde no se encontró una diferencia significativa entre la presencia o ausencia en las diferentes categorías de edades. El rango de edad que no estaba infectado por el parásito fue el de 17-24 meses, como se muestra en la figura1.

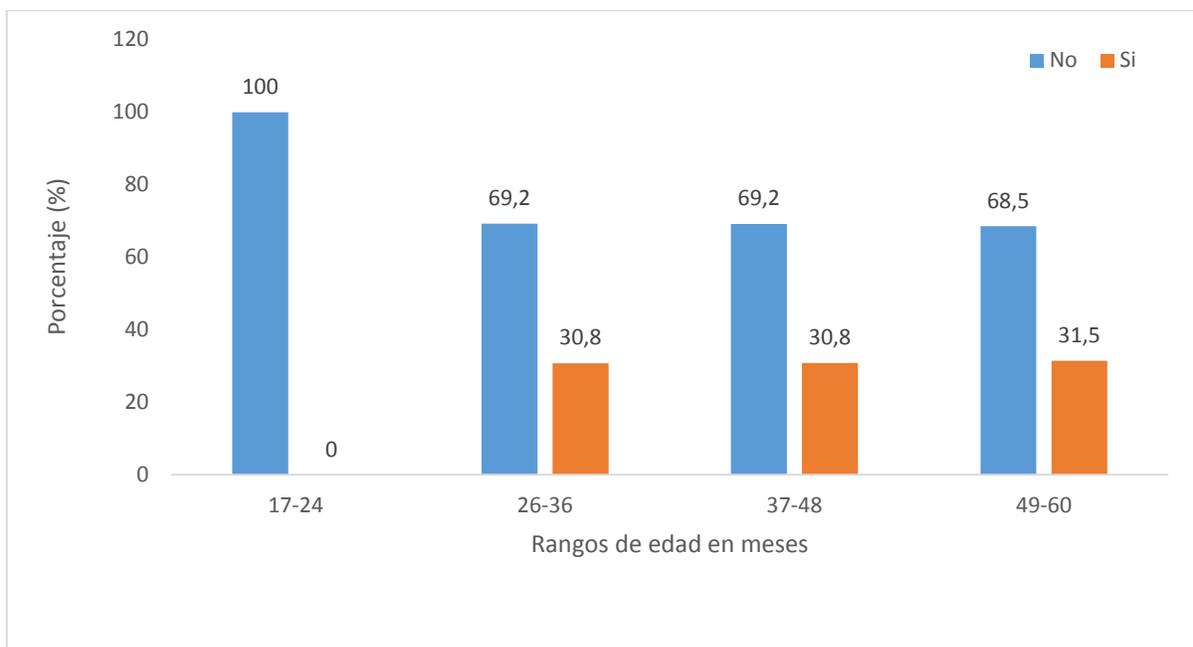


Figura1. Rango de edades para la presencia o ausencia de *Blastocystis* sp utilizando métodos directos.

Al realizar el análisis bivariado para establecer la asociación entre la presencia de *Blastocystis* sp y las variables evaluadas se observó $P=0,049$ para el consumo de agua. Tabla 3

Tabla 3. Prevalencia de *Blastocystis* sp en las diferentes variables sociodemográficas utilizando el método directo.

Variable	n/N	Positivos (%)	IC _{95%}		p (Chi ²)
Genero					
Masculino	42/134	31,3	23,4	39,3	0,8
Femenino	37/124	29,8	21,7	38,0	
Edad (meses)					
26 – 36	12/39	30,8	15,6	45,9	0,61
37 – 48	33/107	30,8	21,9	39,7	
49 – 60	34/108	31,5	22,6	40,4	
Estrato Social					
Uno	60/208	28,8	22,6	35,1	0,22
Dos	18/44	40,9	25,8	56,0	
Tres	1/6	16,7	-26,2	59,5	
Afiliación SGSS					
Ninguno	1/4	25,0	-54,0	104,6	0,47
Subsidiado	74/246	30,1	24,3	35,9	
Contributivo	4/8	50,0	5,3	94,7	
Tipo de piso					
Tierra	2/2	100,0			0,97
Madera	1/2	50,0	585,3	685,3	
Cemento	65/206	31,6	25,2	38,0	
Baldosa	11/48	22,9	10,6	35,2	
Tipo de pared					
Ladrillo	55/174	31,6	24,6	38,6	0,88
Cemento	20/70	28,6	17,7	39,4	
Tabla	4/14	28,6	1,5	55,6	
Tipo de acueducto					
Veredal	0/1	0,0			0,5
Urbano	79/257	30,7	25,1	36,4	
Agua para consumo humano					
Hervida	59/211	28,0	21,9	34,1	0,049 *
No Hervida	20/47	42,6	27,9	57,2	
Lavado de manos					
Algunas veces	2/10	20,0	-10,2	50,2	0,45
Siempre	77/248	31,0	25,2	36,8	

Análisis por PCR en *Blastocystis* sp.

Realizando la PCR que permitió amplificar el ADN de *Blastocystis* se encontró una prevalencia de 40.7% que correspondieron a 105 niños, demostrando que las técnicas moleculares son más eficientes que la observación directa de la materia fecal, una actividad normal en los laboratorios clínicos de Colombia. No se encontró una relación estadísticamente significativa entre las variables del estudio y la positividad a nivel molecular.

TABLA 4. PCR-*Blastocystis* sp en las diferentes variables de estudio.

Variable	n/N	Positivos (%)	IC _{95%}		p (Chi ²)
Genero					
Masculino	49/134	36,6	28,3	44,8	0,16
Femenino	56/124	45,2	36,3	54,0	
Edad (meses)					
17 – 24	1/4	25,0	-54,6	104,6	0,24
26 – 36	21/39	53,8	37,5	70,2	
37 – 48	44/107	41,1	31,6	50,6	
49 – 60	39/108	36,1	26,9	45,3	
Estrato Social					
Uno	81/208	38,9	32,3	45,6	0,5
Dos	21/44	47,7	32,4	63,1	
Tres	3/6	50,0	-7,5	107,5	
Afiliación SGSS					
Ninguno	4/4	100,0			0,02*
Subsidiado	96/246	39,0	32,9	45,2	
Contributivo	5/8	63,5	19,2	105,8	
Tipo de piso					
Tierra	1/2	50,0	-585,3	685,3	0,34
Madera	2/2	100,0			
Cemento	81/206	39,3	32,6	46,0	
Baldosa	21/48	45,8	29,2	58,3	
Tipo de pared					
Ladrillo	71/174	40,8	33,4	48,2	0,97
Cemento	28/70	40,0	28,2	51,8	
Tabla	6/14	42,9	13,2	72,5	
Tipo de acueducto					
Veredal	0/1	0,0			0,4
Urbano	105/257	40,9	34,8	46,9	

Variable	n/N	Positivos (%)	IC _{95%}	p (Chi ²)	Variable
Agua para consumo humano					
Hervida	80/211	37,9	31,3	44,5	0,054
No Hervida	25/47	53,2	38,4	68,0	
Lavado de manos					
Algunas veces	4/10	40,0	3,1	76,9	0,96
Siempre	101/248	40,7	34,6	46,9	

El porcentaje de *Blastocystis* sp en mascotas fue de 10% de 10 muestras evaluadas con el método directo (coprológico más técnica de Ritichie-Frick modificada), mientras que por PCR se obtuvo un porcentaje del 50% (5/10), aunque el tamaño de la muestra no es significativa se puede observar que la técnica de biología molecular es muy útil debido a su alta sensibilidad.

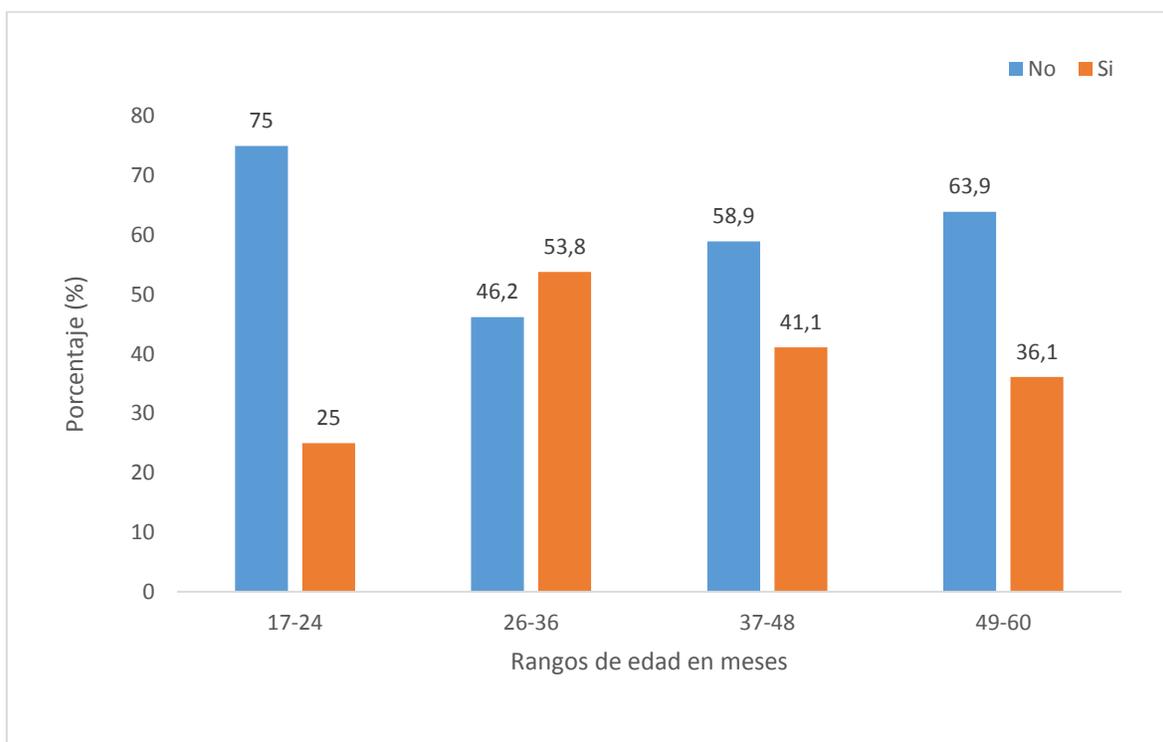


Figura 2. . Rango de edades para la presencia o ausencia de *Blastocystis* sp utilizando el método PCR.

DISCUSION

Este es el primer reporte de blastocistosis en humanos y caninos realizado en el departamento del Cauca, Colombia, diagnosticado mediante técnicas moleculares y coproparasitológicas encontrando una prevalencia de 40.7% (105/258) y 30.6% (79/258) respectivamente en los niños evaluados y de 50% (5/10) por PCR y 10% (1/10) en heces en la población canina evaluada. La prevalencia del parasitismo intestinal fue 48% (134/258) en la población infantil.

La prevalencia encontrada en la comunidad infantil del estudio se encuentra en el rango reportado en la literatura de la blastocistosis que oscila entre 0,8% y 100% en países desarrollados y en vía de desarrollo^{49,94,95}.

En Colombia los estudios de prevalencia realizados en población similar varía de 4,3% a 81,9% y la investigación realizada en Popayán demostró con técnicas moleculares un 40.7%. Sin embargo, la prevalencia en este estudio alcanzó esta magnitud por la utilización de la PCR, que como lo indica diferentes artículos aumenta la probabilidad de hallar el ADN de *Blastocystis* sp en heces ya que estos métodos moleculares demuestran mayor sensibilidad que técnicas tradicionales como el coprológico donde se busca algún estadio del ciclo de vida del parásito^{10,66,67,70,71,35,96}.

En Colombia el acceso a las técnicas moleculares se encuentra restringido a instituciones o grupos de investigación que posean esta tecnología lo que usualmente no se encuentra en los laboratorios de primer nivel de atención en salud de los hospitales o clínicas de los municipios del país. Cabe anotar que la PCR si resulta asequible de acuerdo a un estudio del 2007 realizado en Dinamarca que demostró que los costos aproximados del tiempo para el diagnóstico de *Blastocystis* sp a nivel molecular osciló entre 0,5 USD/10 minutos y 5 USD/240 minutos⁹⁷.

La utilización de la PCR permite mejorar la epidemiología a nivel molecular que redundará en un diagnóstico y tratamiento rápido a bajo costo para que el médico tratante realice una mejor actividad para el control de la blastocistosis. Esta

investigación realizada en Popayán permitiría a futuro una mejor vigilancia para las parasitosis que se asocian a la transmisión por el agua.

En este estudio se evidenció una asociación estadísticamente significativa con las variables agua para consumo humano y con la afiliación Sistema General de Seguridad Social (SGSS) en donde investigaciones nacionales indican que la blastocistosis está relacionada directamente a factores ambientales, educativos, contacto con las heces de animales hospederos, aseo personal entre otros⁴³.

La población en estudio indica que el 80.3% pertenecen a zonas vulnerables en donde se puede encontrar un bajo nivel educativo y por ende no obtener información adecuada para evitar y controlar el parasitismo, como son el lavado de manos, el buen aseo personal, los alimentos bien cocinados y tener en cuenta que los infantes son más propensos a ser infectados lo que coincide con la literatura mundial y nacional^{11,43,44}.

Aunque en este estudio no se encontró una relación significativa entre las diferentes variables ambientales, se observó *Blastocystis* sp en 81 niños que indicaron siempre haberse lavado las manos ante lo cual la parasitosis se está adquiriendo de otra forma por la capacidad de tolerancia del parásito a factores ambientales como lo demuestra el estudio de Londoño et al publicado en el 2014 donde hallaron el parásito en superficies como el piso, uñas, losa, manos, agua de panela y el consumo de alimentos infectados¹⁶.

De acuerdo al análisis bivariado se observó que 63 niños consumían agua hervida y estaban infectados con el parásito, lo que indica que aunque la comunidad tome medidas de precaución es notable que no lo hacen de una manera adecuada. La literatura menciona que uno de los mecanismos más importantes de la transmisión de *Blastocystis* sp. es la vía oral-fecal, en la cual las manos sucias es un factor relevante⁹⁸.

Para el consumo de agua se observó que hay una relación estadística con el parásito 0,049% siendo una de las formas de transmisión hacia las personas así

como lo reportan otras investigaciones del nivel nacional y mundial^{14,51,99,80}. De acuerdo a este estudio una medida de control y eliminación de *Blastocystis* sp sería que se mejorara el método para consumir agua apta para el ser humano como es hervirla o comprarla envasada.

Blastocystis sp también fue encontrado en la materia fecal de los caninos, por montaje de heces fue de 10% (1/10) y por PCR del 50% (5/10), demostrando la mayor sensibilidad de la técnica a nivel molecular para el diagnóstico de esta parasitosis, situación que ha venido demostrándose con diferentes publicaciones que anotan que las técnicas moleculares son más útiles que las metodologías convencionales como el coprológico^{10,66,69,100}.

En un estudio realizado en el departamento del Quindío donde analizaron las muestras fecales de mascotas, encontraron un 66.3% de blastocistosis para los perros evaluados; en Popayán en el 2005 también se demostró *Blastocystis* sp en un 14.8% de 372 caninos evaluados^{9,16,49,56}.

Con este estudio de blastocistosis por medio de PCR en muestras de materia fecal de caninos se evidenció un 50% (aclaró que solo se examinaron 10 heces), estos resultados podrían indicar que estos animales pueden ser una fuente importante en la cadena de transmisión debido a que están en contacto directo con su dueño, por ello es importante resaltar que estas mascotas deben tener un adecuado control veterinario para disminuir el riesgo de infección hacia sus dueños^{9,16,49,61}.

En los análisis se observó otros parásitos encontrándose *Entamoeba coli* 14.3%, *Chilomastix mesnili* 1.2%, *Endolimax nana* 8.5%, *E. hartmanni* 0.4% en menor frecuencia lo que nos indica que estos parásitos son no patógenos para la población⁴³.

La prevalencia del complejo *E. histolytica*/*E. dispar*/*E. moshkovsky* fue de 1.6%, pero sería bien importante que se mejorará la epidemiología de estas especies ya

que para Colombia se ha registrado la presencia de *E. dispar* y *E. moshkovsky* en muy altas frecuencias diferente a la amibiasis^{101,102,103,104,105}.

En el país se han realizado tres encuestas para determinar la morbilidad del parasitismo intestinal. La primera encuesta (1965-1966) reportó una prevalencia nacional de 88%, mientras en la segunda (1977-1980) fue de 81.8%, el 63% por parásitos patógenos¹⁰⁶. La tercera encuesta nacional se realizó 2012-2014 y se llevó a cabo sólo en población infantil de 7 a 10 años y registró a partir de 6045 muestras analizadas, una positividad de 81% y las siguientes prevalencias por especies: *E. histolytica* 17%, *G. lamblia* 15.4%, *Trichuris trichiura* 18.4%, *Ascaris lumbricoides* 11.3% y uncinarias 6.4%. Cabe resaltar que los porcentajes son mayores en las zonas rurales en comparación con la urbana, salvo en los casos de giardiasis³⁶

Con relación al Cauca, esta última encuesta únicamente evaluó un pequeño grupo de niños de los municipios de El Tambo y Rosas, lo que no permite hacer una inferencia hacia la situación del parasitismo intestinal de toda la población infantil del departamento, considerando que éste se conforma por 42 municipios que comprenden zonas de diferente altitud, con otros costumbres y hábitos dependiendo de la zona geográfica y de la urbanización¹⁰⁷.

El presente estudio reporta ausencia de helmintos en los niños menores a 60 meses, la presencia de estos parásitos se debe específicamente a factores ambientales para su ciclo de vida, es decir tener unas condiciones óptimas para el desarrollo del parásito. Los datos estadísticos indicaron que la población en estudio se encontraba en zona urbana y el piso de sus viviendas son de cemento, lo que reduce el riesgo de infección por estos gusanos¹⁰⁸

Un estudio de meta-análisis, que estableció la relación entre el acceso a agua potable, medidas de saneamiento e higiene, WASH (por sus iniciales en inglés water, sanitation, and hygiene), y la infección por geohelmintos, indicó que el uso de agua tratada, medidas de higiene básicas como el lavado de manos antes de

comer y después de defecar, el uso de jabón, y el uso de zapatos, se asoció con menor probabilidad de infección por estos gusanos, situación que pudo haber ocurrido en esta investigación de acuerdo a la tabla 1 y 3.⁹⁹

En Colombia la política institucional para la desparasitación a través del documento, Lineamiento de Desparasitación Antihelmíntica Masiva que recomienda utilizar tratamiento antiparasitario contra helmintos intestinales en todos los niños a intervalos regulares no aplicaría en esta investigación ya que no se reportó el hallazgo de gusanos pero se está de acuerdo en la necesidad de realizar estudios de prevalencia del parasitismo intestinal de forma periódica como lo indica también este documento del gobierno nacional¹⁰⁹.

La giardiasis es una parasitosis causada por *G. lamblia*, es una infección zoonótica pues presenta diferentes hospederos animales además de infectar al ser humano. De acuerdo a la OMS esta parasitosis es catalogada como una infección parasitaria desatendida u olvidada. A nivel mundial se estima que 200 millones de personas son sintomáticas presentando diarrea con moco, dolor abdominal, mala absorción de nutrientes o pueden ser asintomáticos^{110,111}.

En las encuestas sobre la morbilidad del parasitismo intestinal en Colombia de 1965-1966 y 1977-1980 se encontraron prevalencias generales de *G. lamblia* de 12.2% y 13.7% respectivamente y para comunidad infantil hasta los cuatro años fue de 23,7% en la primera encuesta y de 27.7% para la segunda. En esta investigación realizada en comunidad infantil del ICBF hasta los cinco años se encontró una prevalencia de 9,3% (24/258) que está en el rango notificado de acuerdo a las encuestas anteriores. No se compara con el estudio nacional realizado del 2012 al 2014 ya que éste se llevó a cabo en infantes de 7 a 10 años¹⁰⁶.

En Colombia se han realizado diferentes estudios sobre giardiasis en población infantil del ICBF y los resultados varían entre 10,5% a 37.3%, el estudio realizado en Popayán arrojó una prevalencia del 9,3%, resultado que no es preocupante

pero que está indicando el contacto de los niños con el agua o alimentos que se consuman crudos que se encuentren contaminados con heces que presentan quistes de *G. lamblia*^{58,102,112}.

Sería muy relevante que para mejorar la epidemiología de la giardiasis se realizaran estudios a nivel molecular y con base en estos resultados se optaran por actividades de vigilancia y control de esta parasitosis.

Limitaciones

En este estudio se realizó una encuesta estructurada que fue desarrollada a los cuidadores o representantes legales de la población infantil vinculada al estudio y a pesar que se realizó de forma directa, las respuestas pudieran tener un sesgo de memoria que incidiría en el análisis estadístico.

La baja participación de las mascotas que para este caso eran perros, no se obtuvieron la totalidad de las muestras fecales esperadas, sin embargo los análisis moleculares indicaron que las mascotas estaban parasitadas por *Blastocystis* sp

CONCLUSIONES

- La comunidad infantil se caracterizó por encontrarse en un 80,6% en estrato 1, con un 95,3% del régimen subsidiado sin embargo el 67,8% tienen casa propia y sus viviendas tienen una buena calidad en su infraestructura. El agua para consumo humano viene del acueducto municipal. Participaron tan solo 10 mascotas caninas en buen estado general de salud.
- La prevalencia del parasitismo intestinal fue 48% (134/258) en la población infantil y de *Blastocystis* sp de 30,6% por coprología y 40,7% por PCR, para *G. lamblia* fue 9,3% y el complejo *Entamoeba* de 1,5%. No se encontró helmintos intestinales.
- La prevalencia de *Blastocystis* sp por PCR fue de 42% y 30,6% cuando se estudiaron las heces, lo que evidencia una mayor sensibilidad para diagnosticar la blastocistosis por técnicas moleculares.
- Se observó una relación estadísticamente significativa con *Blastocystis* sp con el consumo de agua y afiliación SGSS lo cual debe llamar la atención para mejorar la calidad de este líquido y realizar campañas educativas.

RECOMENDACIONES

- ✓ Los análisis moleculares son de gran aporte para la ciencia y permite actualizar la epidemiología regional, debería de utilizarse para las actividades de vigilancia y control de las parasitosis en el contexto regional.
- ✓ Sería de gran importancia que las técnicas moleculares se aplicaran a otras parasitosis y así actualizar la epidemiología en las regiones.
- ✓ Las actividades de vigilancia y control deberían diseñarse para toda la población con especial énfasis en la infantil para mejorar el diagnóstico y así suministrar el tratamiento farmacológico adecuado para cada parásito.
- ✓ Las mascotas que presente la población deben tener su adecuado cuidado y control veterinario para disminuir el riesgo de infección hacia la comunidad humana.

Anexo1

METODO DE CONCENTRACIÓN

Esta técnica consiste en tomar 2g de materia fecal y se agrega 10ml de solución salina, se agita vigorosamente y se lleva a centrifugar durante 3 minutos a 3500 r.p.m. se descarta el sobrante; se agrega 10ml de formol al 10% se agita y se deja reposar por 5min, se agrega 3ml de nafta (gasolina) se agita y se lleva a centrifugar durante 3 minutos a 3500 r.p.m. se descarta el sobrenadante y se procede hacer el montaje colocando en un portaobjetos una gota de solución salina y lugol previamente separadas, en donde se deposita en cada una de las ya mencionada una gota de sedimento. Se observa la preparación al microscopio a 10x y 40x.

Las muestras de materia fecal deben estar guardadas a una temperatura de -27°C para ello se utilizó: Tubos falcon fondo redondo tapa presión 5ml (poliestireno), Solución salina, Centrifuga, Tubos falcon cónico 15ml, Alcohol al 90%.

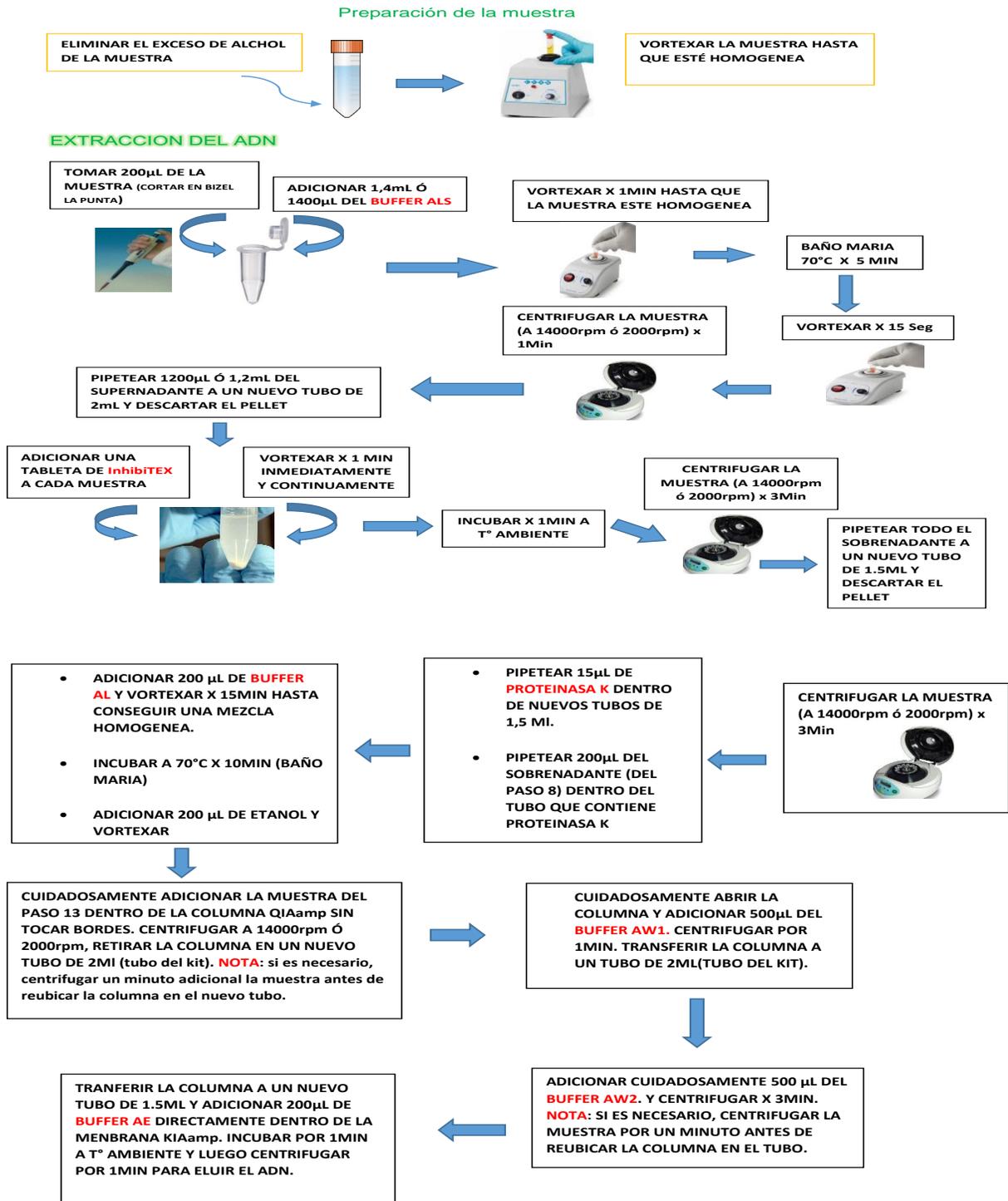
Procedimiento:

1. Añadir 2gramos de materia fecal en 10ml de solución salina en tubo cónico.
2. Agitar fuertemente por 30 segundos.
3. Llevar a centrifuga a 1500rpm por dos minutos.
4. Descartar la solución salina.

Luego de este proceso guardar la materia fecal en tubos falcon fondo redondo 5ml el cual previamente contiene 4ml de alcohol al 90% y se añade 1gramo de materia fecal ésta será incubada a -27°C para su conservación.

Anexo 2.

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ADN DE MATERIA FECAL PARA DETECCION DE PATOGENOS



LITERATURA CITADA

1. Alfellani, M. a. *et al.* Variable geographic distribution of Blastocystis subtypes and its potential implications. *Acta Trop.* **126**, 11–18 (2013).
2. Tan, K. S. W. New insights on classification, identification, and clinical relevance of Blastocystis spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 639–665 (2008).
3. Stensvold, C. R. & Clark, C. G. Parasitology International Current status of Blastocystis : A personal view. *Parasitol. Int.* **65**, 763–771 (2017).
4. Pérez Córdón, G. *et al.* Intestinal parasitism in the animals of the zoological garden 'Peña Escrita' (Almuñecar, Spain). *Vet. Parasitol.* **156**, 302–309 (2008).
5. Lim, Y. a L., Ngui, R., Shukri, J., Rohela, M. & Mat Naim, H. R. Intestinal parasites in various animals at a zoo in Malaysia. *Vet. Parasitol.* **157**, 154–159 (2008).
6. Valdez, R. a & Cordova, O. Detección De Parásitos Intestinales En Agua Y Detection of Water-Borne and Food-Borne Intestinal. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* **25**, 144–148 (2008).
7. Abdulsalam, A. M. *et al.* Drinking water is a significant predictor of Blastocystis infection among rural Malaysian primary schoolchildren. *Parasitology* **139**, 1014–1020 (2012).
8. Cian, A. *et al.* Molecular Epidemiology of Blastocystis sp . in Various Animal Groups from Two French Zoos and Evaluation of Potential Zoonotic Risk. *Plos One.* 1–29 (2017).
9. Mendez Bustelo M.A., Muñoz Joba M.do., Garabal Sánchez S., Ben López E., L. T. J. Blastocystis Hominis, un gran desconocido. 39–44 (2015).
10. Ramírez, J. D. *et al.* Blastocystis subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infect. Genet. Evol.* **22**, 223–228 (2014).
11. Salinas, J. L. & Gonzales, H. V. Infección por Blastocystis. 264–274
12. Forsell, J., Granlund, M., Stensvold, C. R., Clark, G. C. & Evengard, B. Subtype analysis of Blastocystis isolates in Swedish patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 1689–1696 (2012).
13. Stensvold, C. R., Alfellani, M. & Clark, C. G. Levels of genetic diversity vary dramatically between Blastocystis subtypes. *Infect. Genet. Evol.* **12**, 263–273 (2012).
14. Barona Rondón L, Maguiña Vargas C, Náquira Velarde C, Terashima I.A., and T. R. Blastocistosis humana: Estudio prospectivo, sintomatología y factores epidemiológicos asociados. *Adv. Parasitol.* 29–35 (2003).
15. Kozubsky Leonora Eugenia & Susana Archelli. Algunas consideraciones acerca de *Blastocystis* sp ., un parásito controversial. **44**, (2010).
16. Londoño-Franco, A. L., Loaiza-Herrera, J., Lora-Suarez, F. M. & Gómez-

- Marín, J. E. Frecuencia y fuentes de *Blastocystis* sp. en niños urbanos de 0 a 5 años de hogares infantiles del estado del municipio de Calarcá, Colombia. *Biomédica. Biomedica* **34**, 4–9 (2014).
17. Döbrönte, Z., Lakner, L. & Sarang, K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Orv. Hetil.* **147**, 2077–2080 (2006).
 18. Boorom, K. F. Is this recently characterized gastrointestinal pathogen responsible for rising rates of inflammatory bowel disease (IBD) and IBD associated autism in Europe and the United States in the 1990s *Med. Hypotheses* **69**, 652–659 (2007).
 19. Andiran, N., Acikgoz, Z. C., Turkay, S. & Andiran, F. *Blastocystis hominis*-an emerging and imitating cause of acute abdomen in children. *J. Pediatr. Surg.* **41**, 1489–1491 (2006).
 20. Boeke, C. E., 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.* **56**, 299–306 (2010).
 21. Drossman, D. a., Camilleri, M., Mayer, E. a. & Whitehead, W. E. AGA technical review on irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **123**, 2108–2131 (2002).
 22. Barahona, L., Maguiña, C., Náquira, C., Terashima, A. & Tello, R. Sintomatología y factores epidemiológicos asociados al parasitismo por *Blastocystis hominis*. *Parasitol. Latinoam.* **57**, 96–102 (2002).
 23. Stensvold C Rune *et al.* Terminology for *Blastocystis* subtypes - a consensus. *Trends Parasitol.* **23**, 93–96 (2007).
 24. Coyle, C. M., Varughese, J., Weiss, L. M. & Tanowitz, H. B. *Blastocystis*: To Treat or Not to Treat... *Clin. Infect. Dis.* **54**, 105–110 (2012).
 25. Leelayoova Saovane *et al.* Evidence of waterborne transmission of *Blastocystis hominis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**, 658–662 (2004).
 26. Yoshikawa, H. *et al.* Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitol. Res.* **94**, 391–396 (2004).
 27. Yoshikawa, H. *et al.* Parasitology International Molecular survey of *Blastocystis* sp . from humans and associated animals in an Indonesian community with poor hygiene. *Parasitol. Int.* **65**, 780–784 (2017).
 28. Ruaux, C. G. & Stang, B. V. Prevalence of *Blastocystis* in Shelter-Resident and Client- Owned Companion Animals in the US Pacific Northwest. **9**, (2014).
 29. Arbabi, M. & Hooshyar, H. Gastrointestinal parasites of stray cats in Kashan , Iran. **26**, 16–22 (2009).
 30. Salinas, J. L. Current status of *Blastocystis* terminology. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **51**, 117–118 (2009).
 31. Dogruman-Al, F., Yoshikawa, H., Kustimur, S. & Balaban, N. PCR-based subtyping of *Blastocystis* isolates from symptomatic and asymptomatic

- individuals in a major hospital in Ankara, Turkey. *Parasitol. Res.* **106**, 263–268 (2009).
32. Domínguez-Márquez, M. V., Guna, R., Muñoz, C., Gómez-Muñoz, M. T. & Borrás, R. High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitol. Res.* **105**, 949–955 (2009).
 33. Eroglu, F. & Koltas, I. S. Evaluation of the transmission mode of *B. hominis* by using PCR method. *Parasitol. Res.* **107**, 841–845 (2010).
 34. Espinal, P. A., López, M. C., De Durán, G., Moncada, L. I. & Delgado, P. Parasitismo intestinal en la población infantil menor de 15 años atendida en el Servicio de Consulta Externa del Hospital de La Misericordia y evaluación de metodos para su diagnostico. **46**, (1998).
 35. Mejia, R. *et al.* A Novel , Multi-Parallel , Real-Time Polymerase Chain Reaction Approach for Eight Gastrointestinal Parasites Provides Improved Diagnostic Capabilities to Resource-Limited At-Risk Populations. **88**, 1041–1047 (2013).
 36. Ministerio de Salud y Protección social, U. de A. *Encuesta Nacional de parasitismo intestinal en población escolar Colombia, 2012-2014.* (2015).
 37. Rojas Cruz C y Zapata Valencia JI. Una actualización sobre *Blastocystis sp.* *Rev. Gastrohnp* **14**, 94–100 (2012).
 38. Iannacone, J., Benites, M. J. & Chirinos, L. Prevalencia de infección por parásitos intestinales en escolares de primaria de Santiago de Surco , Lima , Perú. 54–62 (2006).
 39. del Rio Velarde, L. T. & Mendoza Romo, M. A. Prevalencia de *Blastocystis hominis* en menores de 12 años de una poblacion mexicana urbana. *Rev Cuba. Pediatr* 2006; **78(4)** **78**, (2006).
 40. Arias, J. ., Guzmán, G. ., Lora-Suarez, F. ., Torres, E. & Gómez, J. . Prevalencia de protozoos intestinales en 79 niños de 2 a 5 años de edad de un hogar infantil estatal en Circasia , Quindío. **14**, 31–38 (2010).
 41. Flores-Carrero, A. D., Peña-Contreras, Z., Dávila-Vera, D. & Colmenares-Sulbarán, Melisa Mendoza-Briceño, R. V. Investigación de *Blastocystis sp.* en agua de consumo humano en una población escolar de la zona rural del estado Mérida-Venezuela. *Kasmera* **38**, 123–129 (2011).
 42. Londoño-franco, Á. L., Loaiza-herrera, J. & Lora-suárez, F. M. Frecuencia y fuentes de *Blastocystis sp.* en niños de 0 a 5 años de edad atendidos en hogares infantiles públicos de la zona urbana de Calarcá , Colombia. (2014).
 43. Londoño, Á. L., Mejía, S. & Gómez-Marín, J. E. Prevalencia y Factores de Riesgo Asociados a Parasitismo Intestinal en Preescolares de Zona Urbana en Calarcá, Colombia. *Rev. Salud Pública* **11**, 72–81 (2009).
 44. Iván Jorge Zapata Valencia & Rojas., C. Una actualización sobre. 94–100 (2012).
 45. Salonen, A., De Vos, W. M. & Palva, A. Gastrointestinal microbiota in irritable

- bowel syndrome: Present state and perspectives. *Microbiology* **156**, 3205–3215 (2010).
46. Li, L.-H. *et al.* Molecular epidemiology of human *Blastocystis* in a village in Yunnan province, China. *Parasitol. Int.* **56**, 281–286 (2007).
 47. Sheehan, D. J., Raucher, B. G. & McKittrick, J. C. Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of human disease. *J. Clin. Microbiol.* **24**, 548–550 (1986).
 48. El Safadi, D. *et al.* Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. (2014).
 49. Amaya AM, Trejos J, M. E. *Blastocystis* spp.:revisión literaria de un parásito intestinal altamente prevalente. **47**, 199–208 (2015).
 50. Londoño, A., Sanchez, C., Polo, A. & Vergara, C. Parasitismo intestinal en hogares comunitarios.Municipio de Santo Tomas.Colombia,Atlantico. *Bol Mal Salud Amb.* 59–66 (2005).
 51. Londoño, A. ., Lora, F. ., Loaiza, J., Rivera, R. & Gómez, J. E. *Blastocystis* spp. en fuentes ambientales y relación con infección sintomática en población infantil, Calarcá, Quindío. *Infectio.* 2010; 14(S1): 57. (2010).
 52. Puerta, L., Salazar, L., Velásquez, L. & Vélez, I. . Estado actual de las parasitosis intestinales en cuatro comunidades indígenas de Colombia. *Biomédica.* 2011; 31(S3): 98-109. (2011).
 53. Domínguez, V., Montes, S., Mora, B., Racini, M. & Tovar, C. Detección microbiológica, parasitológica e inmunológica de agentes asociados a enfermedad diarreica aguda en niños menores de cinco años en cuatro instituciones prestadoras de salud de Montería. *Infectio.* 14(S1): 82. (2010).
 54. Salcedo-Cifuentes, M. *et al.* Intestinal parasitism prevalence amongst children from six indigenous communities residing in Cali, Colombia. *Infectio.* 14(1): 156-168 (2012).
 55. Alvarado, B. E. & Vásquez, L. R. Determinantes sociales, prácticas de alimentación y consecuencias nutricionales del parasitismo intestinal en niños de 7 a 18 meses de edad en Guapi, Cauca. *Biomédica* 26(1): 82-94. (2006).
 56. Ordóñez, L. E. & Angulo, E. S. Desnutrición y su relación con parasitismo intestinal en niños de una población de la Amazonia colombiana. (2002).
 57. Urbina, D., Arzuza, O. & Young, G. Rotavirus type A and other enteric pathogens in stool samples from children with acute diarrhea on the Colombian northern coast. 27–32 (2003).
 58. Giraldo, J. M., Lora, F., Henao, L., Mejía, S. & Gómez, J. . Prevalencia de Giardiasis y Parásitos Intestinales en Preescolares de Hogares atendidos en un programa estatal en Armenia, Colombia. **7**, 327–338 (2005).
 59. Suescún, S. H. Prevalencia de parásitos intestinales y factores de riesgo en escolares del colegio Chicamocha Kennedy I del municipio de Tuta, Boyacá - Colombia. 218–224 (2013).

60. Cardona-arias, J. A., Rivera-Palomino, Y. & Carmona-Fonseca, J. Salud indígena en el siglo XXI: parásitos intestinales, desnutrición, anemia y condiciones de vida en niños del resguardo indígena Cañamomo-Lomaprieta, Caldas-Colombia. **133**, (2014).
61. Vásquez-A LR, Campo VH, Rivera O, Cordero H, Dueñas J, Vergara D. Prevalencia de *Toxocara canis* y otros parásitos intestinales en caninos de la ciudad de Popayán. *Rev Fac Cienc Salud Univ Cauca*. 7(4):13-21,(2004)
62. Taylor-orozco, V., López-fajardo, A., Muñoz-marroquín, I., Hurtado-benítez, M. & Ríos-ramírez, K. *Blastocystis* sp: evidencias de su rol patógeno *Blastocystis* sp. **15**, 69–86 (2016).
63. Malheiros, A. F., Stensvold, C. ., Clark, C. K., Braga, G. B. & Shaw, J. J. Short Report: Molecular Characterization of *Blastocystis* Obtained from Members of the Indigenous Tapirapé Ethnic Group from the Brazilian Amazon Region, Brazil. **85**, 1050–1053 (2011).
64. Miller, S. a, Rosario, C. L., Rojas, E. & Scorza, J. V. Intestinal parasitic infection and associated symptoms in children attending day care centres in Trujillo, Venezuela. *Trop. Med. Int. Health* **8**, 342–347 (2003).
65. Lozano Socorras S.L. Presencia de *Blastocystis* sp como agente casual de enfermedades gastrointestinales en la comuna 7(Gaira)del distrito de Santa Marta. **2**, (2005).
66. Stensvold, C. R. (2013). *Blastocystis*: Genetic diversity and molecular methods for diagnosis and epidemiology.
67. Eroglu, F., Genc, A., Elgun, G. & Koltas, I. S. Identification of *Blastocystis hominis* isolates from asymptomatic and symptomatic patients by PCR. *Parasitol. Res.* **105**, 1589–1592 (2009).
68. Coyle, C. M., Varughese, J., Weiss, L. M. & Tanowitz, H. B. *Blastocystis*: To treat or not to treat.. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 105–110 (2012).
69. Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S. & Francis, C. M. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol.* **2**, (2004).
70. Jones, M. S. *et al.* Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. *Parasitol. Res.* **103**, 551–557 (2008).
71. Poirier Philippe *et al.* Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: Prospective study of patients with hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 975–983 (2011).
72. Motazedian, H., Ghasemi, H. & Sadjjadi, S. M. Genomic diversity of *Blastocystis hominis* from patients in southern Iran. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **102**, 85–88 (2008).
73. Noël, C. & Dufernez, F. Molecular phylogenies of *Blastocystis* isolates from different hosts: implications for genetic diversity, identification of species, and zoonosis. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 348 (2005).
74. Romero Caballero Raul, Botero David Restrepo y Pumarola Busquets, A.

blastocystis hominis.

75. Tan, K. S. W., Singh, M. & Yap, E. H. Recent advances in Blastocystis hominis research: Hot spots in terra incognita. *Int. J. Parasitol.* **32**, 789–804 (2002).
76. Adl, S. M. *et al.* The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **59**, 429–493 (2012).
77. 2011, W. H. O. Guidelines for Drinking-water Quality.
78. Plutzer, J., Karanis, P. Neglected waterborne parasitic protozoa and their detection in water. *Water Res.* (2016).
79. Gómez Marin, J. E. *Protozoología médica.* (2010).
80. Pérez-Cordón, G., Rosales, M. J., Valdez, R. A., Vargas-Vásquez, F. & Cordova, O. Detección de parásitos intestinales en agua y alimentos de Trujillo, Perú. *Detect. water-borne food-borne Intest. parasites Trujillo, Peru* **25**, 144–148 (2008).
81. Botero David y Restrepo Marcos. *Parasitosis Humana.* (2012).
82. Pasic, M., Hojilla, C. & Yousef, G. M. Molecular Testing in Colorectal Cancer. (2014).
83. Su, H.-F. *et al.* Blastocystis hominis infection in long-term care facilities in Taiwan: prevalence and associated clinical factors. *Parasitol. Res.* **105**, 1007–1013 (2009).
84. Z.P. Pikula. Blastocystis sp and human disease. *J. Microbiol.* **20**, 135–136 (2007).
85. Snowden, K., Logan, K., Blozinski, C., Hoever, J. & Holman, P. Restriction-fragment-length polymorphism analysis of small-subunit rRNA genes of Blastocystis isolates from animal hosts. *Parasitol. Res.* **86**, 62–66 (2000).
86. Cheng, H.-S., Haung, Z.-F., Lan, W.-H., Kuo, T.-C. & Shin, J.-W. Epidemiology of Blastocystis hominis and other intestinal parasites in a Vietnamese female immigrant population in southern Taiwan. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **22**, 166–170 (2006).
87. Safadi Dima *et al.* Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of Blastocystis sp. ever observed worldwide. *BMC Infect. Dis.* **14**, 164 (2014).
88. Devera, R. A. Blastocistosis en pre-escolares de Ciudad Bolívar , Venezuela Blastocystosis in preschool children from Bolivar City , Venezuela. **14**, 401–407
89. Jones, M. S., Whipps, C. M., Ganac, R. D., Hudson, N. R. & Boroom, K. Association of Blastocystis subtype 3 and 1 with patients from an Oregon community presenting with chronic gastrointestinal illness. *Parasitol. Res.* **104**, 341–345 (2009).
90. Pulido-Villamarín, A. *et al.* Potencial zoonotic parasites found in six swine farms of Cundinamarca, Colombia. **7**: 51-63.

91. Stensvold, C. R. Comparison of sequencing (Barcode Region) and sequence-tagged-site PCR for Blastocystis subtyping. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 190–194 (2013).
92. Stensvold, C. R., Ahmed, U. N., Andersen, L. O. B. & Nielsen, H. V. Development and Evaluation of a Genus-Specific, Probe-Based, Internal-Process-Controlled Real-Time PCR Assay for Sensitive and Specific Detection of Blastocystis spp. **50**, 1847–1851 (2012).
93. Ramírez, J. C. *et al.* Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of Trypanosoma cruzi DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J. Mol. Diagnostics* **17**, 605–615 (2015).
94. Souppart, L. *et al.* Molecular epidemiology of human Blastocystis isolates in France. *Parasitol. Res.* **105**, 413–421 (2009).
95. Yakoob, J. *et al.* Irritable bowel syndrome: In search of an etiology: Role of Blastocystis hominis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**, 383–385 (2004).
96. Asher, A. J., Waldron, L. S. & Power, M. L. Evaluation of a PCR protocol for sensitive detection of Giardia intestinalis in human faeces. 853–858 (2012).
97. Stensvold, C. R., Arendrup, M. C., Jespersgaard, C., Mølbak, K. & Nielsen, H. V. Detecting Blastocystis using parasitologic and DNA-based methods: a comparative study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **59**, 303–307 (2007).
98. del Coco, V. F., Molina, N. B., Basualdo, J. A. & Córdoba, M. A. Blastocystis spp. : avances , controversias y desafíos futuros. *Rev. Argent. Microbiol.* (2017).
99. Strunz, E. C., Addiss, D. G., Stocks, M. E., Ogden, S. & Freeman, M. C. Water, Sanitation, Hygiene, and soil-Transmitted Helminth Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. **11**, (2014).
100. Scicluna, S. M., Tawari, B. & Clark, C. G. DNA Barcoding of Blastocystis. **157**, 77–85 (2006).
101. López, O. Y., López, M. C., Corredor, V., Echeverri, C. & Pinilla, A. E. Diferenciación del complejo Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar mediante Gal/GalNAc-lectina y PCR en aislamientos colombianos. 476–483 (2012).
102. Sánchez, A. *et al.* Molecular Epidemiology of Giardia , Blastocystis and Cryptosporidium among Indigenous Children from the Colombian Amazon Basin. (2017).
103. López, M. C. *et al.* Molecular Epidemiology of Entamoeba : First Description of Entamoeba moshkovskii in a Rural Area from Central Colombia. 1–11 (2015). doi:10.1371/journal.pone.0140302
104. Ali, I. M. *et al.* Entamoeba moshkovskii Infections in Children in Bangladesh. **9**, (2003).
105. Heredia, R. D., Fonseca, J. . & López, M. C. Entamoeba moshkovskii perspectives of a new agent to be considered in the diagnosis of amebiasis. *Acta Trop.* **123**, 139–145 (2012).

106. Sánchez, C. L. Una mirada a las enfermedades parasitarias en el país. *Intituto Salud Publica, Univ. Nac. Colomb.* **4**, 100–103 (2006).
107. Cauca., G. del. Cauca, territorio de paz. (2016).
108. Botero, D. & Restrepo, M. *Parasitosis Humana. Incluye animales venenosos y ponzoñosos. Parasitosis intestinales por nematodos.* (2012).
109. Masiva, A. Lineamiento de Desparasitación ‘ Quimioterapia Preventiva Antihelmíntica de OMS ’. (2013).
110. Adam, R. Biology of Giardia lamblia. **14**, (2001).
111. Savioli, L., Smith, H. & Thompson, A. Giardia and Cryptosporidium join the ‘ Neglected Diseases Initiative ’. **22**, (2006).
112. Garzón, M. C., Vásquez, A., Villegas, J. & Obando, F. Infección de la frecuencia de infección por Giardia intestinalis en comunidades indígenas y afros de Colombia. 10–24 (2016).