



■ Artículo original

Síndrome de intestino irritable: frecuencia y relación filogenética de *Blastocystis sp.* de pacientes mexicanos

Ramírez-Miranda ME,¹ Jiménez-González DE,¹ Rodríguez-Campa ME,¹ González-Angulo A,¹ Hernández-Castellanos R,¹ Sara Arroyo-Escalante A,¹ Romero-Valdovinos M,¹ Martínez-Hernández F,¹ Flisser A,² Maravilla P.¹

1 Hospital General Dr. Manuel Gea González, México, D. F.
2 Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F.

Recibido el 20 de junio de 2011; aceptado el 1 de septiembre de 2011.

■ Resumen

Introducción: Estudios recientes basados en la frecuente presencia de *Blastocystis sp.* en pacientes con síndrome de intestino irritable (SII), han permitido proponer a este parásito como posible responsable del SII. El papel patógeno de *Blastocystis* aún es controversial, ya que se le identifica en personas asintomáticas y aparentemente saludables. La blastocistosis en México ha sido poco estudiada.

Objetivo: Identificar la presencia de *Blastocystis sp.* en pacientes con SII, utilizando técnicas de biología molecular y describir su relación filogenética con secuencias de otros países.

Métodos: Se reclutaron pacientes con SII con base en los criterios de Roma III. En todos los participantes se realizaron colonoscopias, análisis coproparasitoscópicos, coprocultivo y escrutinio

Palabras clave:
Síndrome de intestino irritable, parásitos, *Blastocystis sp.*, México.

■ Abstract

Introduction: Recent studies reported increased presence of *Blastocystis* in patients with Irritable Bowel Syndrome (IBS) and an etiologic role has been proposed. The pathogenic role of *Blastocystis* is controversial, because it is frequently found not only in individuals with enteric symptoms but also in healthy and asymptomatic subjects. Furthermore, there are few studies of blastocistosis in Mexico.

Objective: To assess the frequency of *Blastocystis sp.* in IBS patients using molecular techniques and to describe its phylogenetic relationship with sequences of other countries.

Methods: IBS patients according to Rome III criteria were enrolled. In all patients evaluations included: colonoscopies, coproparasitoscopic studies,

Keywords:
Irritable Bowel Syndrome (IBS), parasites, *Blastocystis sp.*, Mexico.

para la detección de Rotavirus/Adenovirus. La identificación *Blastocystis* sp se realizó por PCR y secuenciación.

Resultados: Se estudiaron 11 hombres y 51 mujeres con una media de edad de 45.6 ± 15.7 años. EL 86% de los pacientes tuvo una colonoscopia normal, 8% presentaron pólipos y 6% enfermedad diverticular. *Blastocystis* sp. fue identificado en 25% de los participantes (todos con colonoscopia normal) y solo dos pacientes tuvieron *Endolimax nana* y *Entamoeba histolytica/E. dispar* respectivamente. El análisis filogenético mostró que la mayoría de las secuencias mexicanas se agruparon en un clúster junto con secuencias de Japón y de Dinamarca. Asimismo, dos secuencias de nuestros pacientes con SII se ubicaron en otro clúster cercano.

Conclusiones: *Blastocystis* sp. fue identificado en 25% de los pacientes con SII. Nuestros datos apoyan la hipótesis de linajes clonales de este parásito en el mundo.

coproculture, fecal virus screening. PCR and sequencing for Blastocystis sp. were also performed.

Results: We recruited 11 men and 51 women with a mean age of $45.6 (SD \pm 15.7)$ years. Eighty-six percent of the IBS patients presented a normal colonoscopy, 8% showed polyps and 6% diverticular disease. *Blastocystis* sp. was identified in 25% patients (all of them with normal colonoscopy), while two patients had *Endolimax nana* and *Entamoeba histolytica/E. dispar*, respectively. Phylogenetic analysis showed that major sequences of Mexican carriers clustered together with sequences of parasites from Japan and Denmark; furthermore, two sequences from IBS patients were grouped in a single cluster.

Conclusions: *Blastocystis* sp. was identified in 25% of the IBS patients. Our data support the hypothesis of clonal lineages in distinct geographical areas in the world.

■ Introducción

El síndrome de intestino irritable (SII) es una enfermedad funcional gastrointestinal que se caracteriza clínicamente por la asociación de dolor, molestia abdominal o ambos, así como alteraciones en el hábito de las deposiciones fecales.^{1,2} El SII se presenta entre 10% y 20% de los adultos y adolescentes de todo el mundo.¹⁻³ En México, la prevalencia del SII varía de 16% a 35.5% con un intervalo de edad que va de los 15 a los 40 años.⁴⁻⁶

Aunque la fisiopatología del SII permanece incierta, algunas publicaciones consideran que la gastroenteritis infecciosa es un factor determinante para desarrollar esta enfermedad,⁷ al igual que el posible papel de los polimorfismos en los promotores de las citocinas proinflamatorias, ya que se encontraron ciertos polimorfismos genéticos de las interleucinas IL-4, IL-6, IL-10 y TNF- α asociados al desarrollo del SII.⁸⁻¹⁰ Otros estudios han asociado la presencia de algunos parásitos al

SII, entre los que destaca *Blastocystis* sp.^{11,12} que es un microorganismo de distribución mundial cuya prevalencia en países desarrollados de Europa o como Estados Unidos es de 10%, mientras que en países en vías de desarrollo puede ser mayor de 80%.¹³⁻¹⁶ En México, la información que se tiene sobre este parásito es limitada. Estudios coprológicos en niños residentes de zonas urbanas mostraron una prevalencia de *Blastocystis* de 3% a 7%,^{17,18} mientras que un estudio de factores de riesgo realizado en comerciantes de alimentos de mercados establecidos en la delegación de Xochimilco, México D. F., mostró una prevalencia de 42% y una asociación estadística con el sexo masculino, con hábitos deficientes en higiene personal, antecedentes de parasitosis previas y de tener un familiar que hubiese estado parasitado.¹⁹ Tres estudios desarrollados en niños de comunidades rurales y suburbanas del Estado de Guerrero (México) mostraron frecuencias de 61% a 81% para *Blastocystis*.^{20,21} Se ha documentado que los estudios

coproparasitoscópicos (CPS), tradicionalmente utilizados para el diagnóstico de *Blastocystis sp.*, poseen una sensibilidad del 50% a 82%.¹³ Recientemente se describió la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de *Blastocystis sp.*, la cual tiene una especificidad de 100% y fue capaz de detectar desde 32 parásitos en 200 mg de heces.²² Debido al polimorfismo genético de este parásito, continúa debatiéndose su estatus taxonómico, por lo que se recomienda que se le refiera solo por su género, como *Blastocystis sp.* o simplemente como *Blastocystis*.²³

■ Objetivo

Identificar la presencia de *Blastocystis sp.* en pacientes con SII, utilizando técnicas de biología molecular y describir su relación filogenética con secuencias de otros países.

■ Métodos

Pacientes: Previa autorización de las Comisiones de Ética y de Investigación del Hospital General Dr. Manuel Gea González, se llevó a cabo el estudio de febrero de 2008 a enero de 2010, en el servicio de Gastroenterología de la Consulta Externa, en el que se invitó a participar a hombres y mujeres, mayores de 18 años, que presentaran SII. El diagnóstico de SII se hizo con base en los criterios de Roma III, los cuales establecen la presencia de malestar o dolor abdominal al menos tres días por mes, en los últimos tres meses presentando dos de las siguientes características: A) alivio con la defecación; B) cambio en la frecuencia de las deposiciones; C) cambio en la consistencia o forma de las heces.² Los pacientes interesados en participar aceptaron firmar una carta de consentimiento informado y se sometieron a un estudio colonoscópico para eliminar la presencia de pólipos y otras alteraciones estructurales que pudieran ser responsables de la sintomatología referente. Se excluyeron a mujeres embarazadas, con historia clínica o con síntomas sugerentes de diabetes mellitus tipo I y II, colitis ulcerativa crónica inespecífica, enfermedad de Crohn, hemorroides, sangrado rectal y pacientes con alteraciones psiquiátricas evidentes. Se eliminaron aquellos pacientes cuyas muestras fecales no fueron adecuadas para el análisis molecular o aquellos participantes que no

hubieran aceptado realizarse los estudios colonoscópicos o manifestaran su deseo de ser dados de baja del presente estudio.

Análisis microbiológico y molecular: Durante el estudio colonoscópico, se tomó una muestra de aspirado de material colónico (heces líquidas) de aproximadamente 10 mL en una trampa de plástico estéril, la cual fue llevada al laboratorio clínico para su procesamiento inmediato. Las muestras del aspirado se procesaron para la identificación de bacterias patógenas usando el sistema MicroScan system (Siemens, Reino Unido) y la búsqueda rápida de Rotavirus/Adenovirus (VIKIA, Rota-Adeno, BioMérieux, France). También se llevaron a cabo estudios coproparasitoscópicos mediante la técnica de Faust para la búsqueda de otros parásitos. Una alícuota del aspirado de aproximadamente 1.5 mL se conservó en congelación a -20°C para su posterior análisis molecular e identificación de *Blastocystis sp.* por PCR.

La extracción de DNA fecal total se llevó a cabo en los primeros siete días después de la toma de cada aspirado de heces. Para ello, se utilizó el sistema comercial Puregene™ DNA purification system cell and tissue kit (Gentra Systems; Alemania). Las extracciones se realizaron de acuerdo a las especificaciones del proveedor. El diagnóstico molecular de *Blastocystis* se llevó a cabo por medio de un PCR utilizando los oligonucleótidos específicos diseñados por Stensvold y colaboradores,²² los cuales amplifican un fragmento de 310 pares de bases (pb) de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSUrDNA) de *Blastocystis sp.* Los productos amplificados fueron visualizados en electroforesis horizontal en geles de agarosa a 1.5% y purificados para ser analizados posteriormente mediante su secuenciación por un proveedor comercial.

Análisis estadístico: Se calculó un tamaño de muestra de 62 participantes, utilizando el programa *Primer of Biostatistics*,²⁴ considerando que es un estudio descriptivo para determinar la prevalencia de un evento en salud, con una frecuencia esperada de 80% de portadores de *Blastocystis*, 95% de potencia de prueba y un error de 10%. Se utilizó estadística descriptiva expresada en porcentaje, media y desviación estándar (DE). El análisis filogenético se construyó a partir de un algoritmo de *Neighbor-joining* (agrupamiento de secuencias más cercanas), realizado con el programa Mega versión 4.0.²⁵ Para este análisis, también se incluyeron secuencias de *Blastocystis sp.* de portadores

mexicanos sin SII (controles), así como de 43 secuencias de la SSUrDNA de *Blastocystis*, obtenidas del *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) de otras partes del mundo, cuyos números de acceso y origen se muestran en la **Tabla 1**. Como grupo externo se utilizó una secuencia de *Proteromonas*.

■ Resultados

Se incorporaron 62 pacientes con SII: 11 hombres y 51 mujeres cuya media de edad fue 45.6 ± 15.7 años. El estudio colonoscópico reveló que cinco (8%) presentaron pólipos, cuatro (6%) tuvieron enfermedad diverticular y los 56 restantes (86%) tuvieron resultados en parámetros normales. Respecto a los subtipos clínicos del SII,² se identificó que el más frecuente fue el asociado a estreñimiento (64%), seguido de diarrea (24%) y el mixto (12%).

Las muestras del aspirado para la identificación de bacterias mostraron que *Escherichia coli* fue la bacteria más frecuente, seguida de *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus sp.*; sin embargo, se identificó un caso con *Salmonella paratyphi A*. La búsqueda rápida de Rotavirus/Adenovirus no detectó ningún caso con estas infecciones. Los estudios coproparasitoscópicos mediante la técnica de Faust mostraron un portador con *Entamoeba histolytica/E. dispar* y a otro con *Endolimax nana*.

El análisis de PCR mostró que 16 (25%) fueron portadores de *Blastocystis*. Todos los portadores de *Blastocystis* presentaron colonoscopias normales. En la **Figura 1** se resumen los hallazgos microbiológicos de los 62 pacientes. En todas las muestras positivas por PCR para *Blastocystis sp.* se obtuvo una banda única de 310 pares de bases (**Figura 2**). El análisis filogenético mostró la formación de siete conglomerados o clústeres, en los que la mayoría de las secuencias mexicanas, se concentraron en un clúster, el cual también integró a parásitos de Japón, Dinamarca y algunas secuencias cuyo origen no fue documentado, con las cuales hubo una identidad $\sim 97\%$. Solo dos secuencias de pacientes con SII se congregaron en otro clúster cercano, el cual no agrupó secuencias de otros países. El resto de las secuencias se agruparon en los otros cinco clústeres (**Figura 3**).

■ Discusión

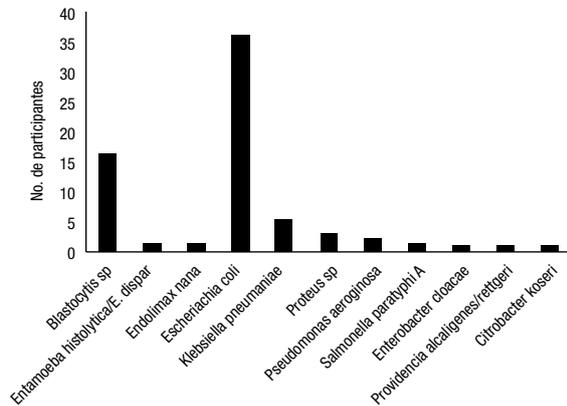
Nuestro trabajo demuestra que *Blastocystis sp.* fue identificado en 25% de los pacientes con SII estudiados y fue el parásito más frecuentemente encontrado en nuestra serie.

En el presente trabajo se incorporaron pacientes con SII en proporción de 5:1 a favor de las mujeres, con un predominio en el subtipo con

■ **Tabla 1.** Número de acceso del *GenBank* de 43 secuencias de la SSUrDNA de *Blastocystis* usadas en la reconstrucción filogenética y país de origen del aislamiento.

No. Acceso	País	No. Acceso	País	No. Acceso	País
AB023499.1	No documentado	AB091239.1	Japón	AY590106.1	No documentado
AB023578.1	No documentado	AB091240.1	Japón	AY590107.1	No documentado
AB070986.1	No documentado	AB091241.1	Japón	AY590108.1	No documentado
AB070987.1	No documentado	AF408425.2	Japón	AY590109.1	No documentado
AB070988.1	No documentado	AF408426.2	Japón	AY590110.1	No documentado
AB070989.1	No documentado	AF408427.1	Singapur	AY618265.1	Tailandia
AB070990.1	No documentado	AF439782.2	Tailandia	AY618266.1	Tailandia
AB070991.1	No documentado	AF538348.1	Tailandia	DQ366343.1	China
AB070992.1	No documentado	AM117938.1	Dinamarca	EF079872.1	China
AB091233.1	Japón	AM118078.1	Dinamarca	EF468654.1	China
AB091234.1	Japón	AM118079.1	Dinamarca	EU082109.1	China
AB091235.1	Japón	AY244619.1	Alemania	FJ809939.1	China
AB091236.1	Japón	AY244620.1	Alemania	U51151.1	No documentado
AB091237.1	Japón	AY244621.1	Japón		
AB091238.1	Japón	AY590105.1	No documentado		

■ **Figura 1.** Frecuencia de los microorganismos identificados en los pacientes con SII. De izquierda a derecha se muestran primero los parásitos identificados, seguidos de las bacterias.

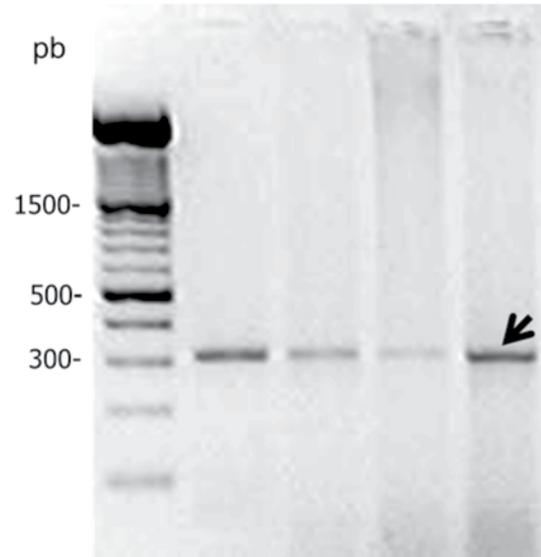


estreñimiento. Un estudio multicéntrico reciente realizado en México encontró una proporción de mujeres y hombres con SII de 3:1, con predominio del subtipo mixto seguido del estreñimiento.⁵ La mayoría de los estudios sobre la epidemiología del SII muestran que existe un predominio del género femenino.² Es probable que la alta frecuencia de mujeres en nuestro estudio se haya visto incrementada no sólo por factores intrínsecos de este síndrome, sino también a factores socioculturales, como lo han descrito otros trabajos, en los que muestran que los hombres pueden ser menos participativos, particularmente en estudios donde se lleven a cabo procedimientos colonoscópicos.²⁶

En nuestro estudio también se encontró que la mayoría de las colonoscopias fueron normales, lo cual está acorde a lo encontrado por Chen y colaboradores,²⁷ quienes estudiaron a 99 individuos sanos portadores de *Blastocystis*, cuya media de edad fue 57.2 ± 10.3 años y en los que encontraron que 17% tuvieron pólipos y 2% divertículos.

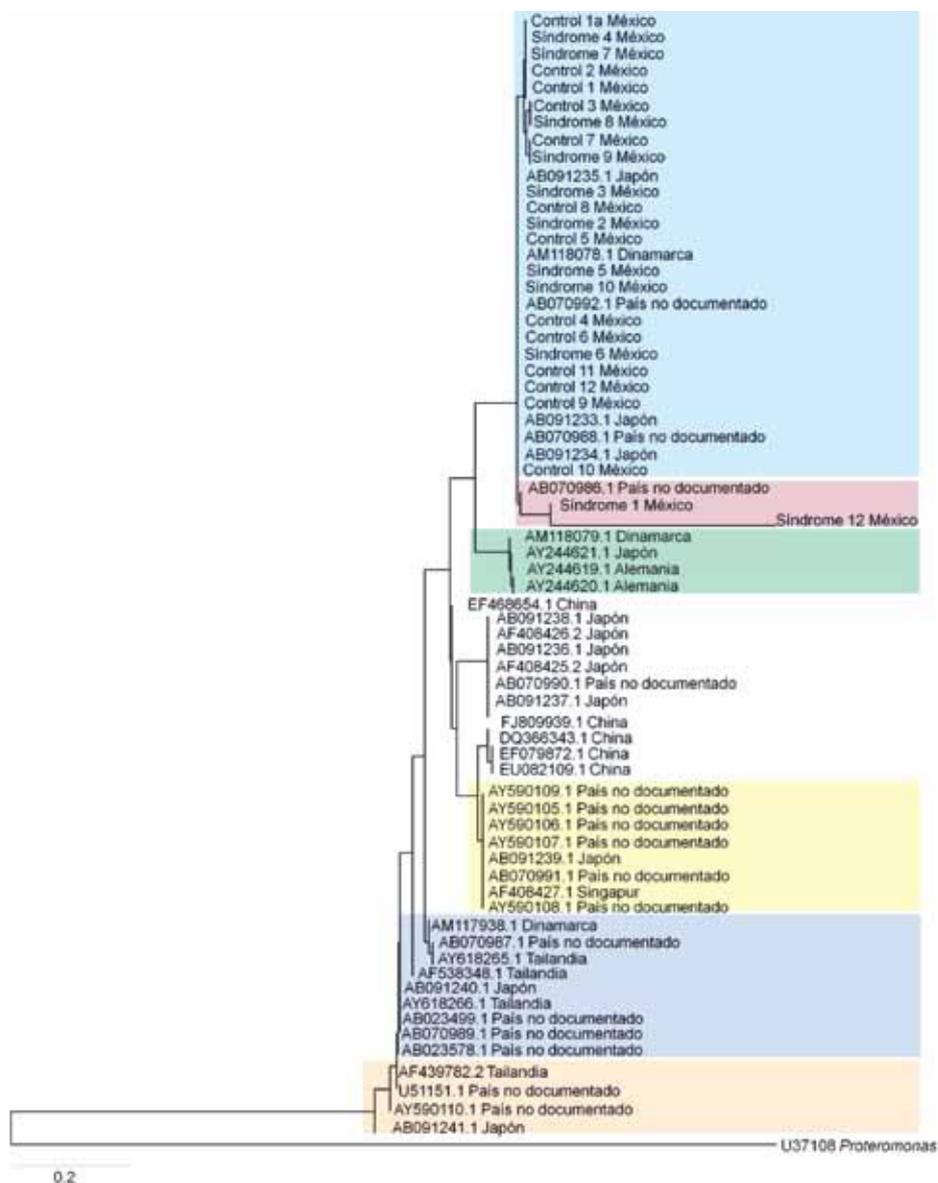
Aunque algunos artículos señalan a *Blastocystis* como responsable del SII,^{12,28,29} su papel patógeno aún continúa en debate.^{13,27,30} Un estudio de casos y controles desarrollado en pacientes paquistaníes con SII demostró una asociación significativa entre la presencia de *Blastocystis sp.* y el desarrollo de este síndrome ($p = 0.001$). Los investigadores, utilizando exámenes CPS, detectaron

■ **Figura 2.** Negativo de un gel de agarosa a 1.5%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV. En el primer carril se observan los pesos moleculares de 100 pares de bases (pb) cada uno. La flecha muestra los amplicones diagnósticos de *Blastocystis sp.* de 310 pb en los distintos carriles del gel.



Blastocystis en las heces de 32% de los pacientes con SII y sólo 7% de los controles.²⁸ Un estudio reciente de nuestro grupo, realizado en pacientes con SII, identificó mediante CPS al *Blastocystis sp.* como el parásito más frecuente, seguido por *Endolimax nana* y *Entamoeba histolytica/E. dispar* (16%, 9% y 3%, respectivamente); además, *Blastocystis* mostró una tendencia de asociación con diarrea ($p = 0.053$; razón de momios 2.73).³¹ En el presente trabajo, en el que utilizamos análisis de PCR, encontramos una mayor frecuencia de *Blastocystis sp.* que en nuestro estudio previo debido probablemente a la alta sensibilidad de la técnica. Todos los portadores de *Blastocystis sp.* recibieron tratamiento farmacológico con base en la premisa de que si existe un agente potencialmente patógeno contra el que hay fármacos eficientes y seguros debe ser tratado, y a que el tratamiento ha sido recomendado en aquellos portadores de este microorganismo que presenten síntomas;¹³ aunque el objetivo del presente trabajo no incluyó dar seguimiento a los enfermos, pues esto es parte de la rutina hospitalaria.

■ **Figura 3.** Árbol filogenético construido con un algoritmo de *Neighbor-joining*, con secuencias de *Blastocystis* sp. de pacientes mexicanos con SII (síndrome) y sin SII (controles) y de otras partes del mundo. Se identifican siete clústeres en colores: en azul se observa la mayoría de las secuencias mexicanas y en rosa dos secuencias de pacientes mexicanos con SII.



El análisis microbiológico mostró que todas las bacterias pertenecían a la flora intestinal, a excepción la un caso con *Salmonella paratyphi* A el cual recibió tratamiento farmacológico *ad hoc*. No se identificaron adenovirus o rotavirus.

Rodríguez y colaboradores²⁰ encontraron una prevalencia de *Blastocystis* mayor de 60% en niños de zonas rurales, y discutieron que al encontrarse las parasitosis en constante transición debido a la introducción de mejoras en los servicios

sanitarios, la movilización de individuos, los cambios en los hábitos higiénico-dietético y las relaciones zoonóticas, que ha favorecido la presencia de otros organismos como nuevos patógenos para el hombre desplazando a otros, como puede ser el caso de *Blastocystis*.

Un hallazgo relevante del presente trabajo fue que la mayoría de las secuencias de *Blastocystis* sp. de portadores mexicanos se agruparon en un solo clúster del árbol filogenético con algunas

secuencias de parásitos de Japón, Dinamarca y de un origen no documentado, fortaleciendo la hipótesis de que existen varios genotipos o un complejo de linajes clonales de *Blastocystis sp.* que explicaría las diferencias en la prevalencia y patogenicidad observadas en diferentes áreas geográficas.^{30,32} Además, la presencia de dos secuencias de parásitos exclusivamente en pacientes con SII, también sugiere la presencia de genotipos autóctonos potencialmente patógenos, los cuales por distintos procesos evolutivos cambiaron y se fijaron localmente.³²

Si bien en el presente artículo, se incluyó una serie de casos con SII que fueron estudiados con técnicas convencionales para identificar organismos patógenos cuyo desempeño cumple con las normas de calidad que exige la Secretaría de Salud de México, presenta algunas deficiencias como el no contar con un grupo control y no aplicar la técnica de PCR para la detección de otros parásitos. Por ello, consideramos importante que se lleven a cabo estudios de casos y controles, e idealmente de causalidad, en los que se incluyan aspectos clínicos soportados por técnicas moleculares para esclarecer el papel patógeno de *Blastocystis* en nuestro país. Rodríguez y colaboradores²⁰ proponen que si continúa incrementándose la frecuencia de este microorganismo y no se establecen mecanismos dirigidos hacia su control, se corre el riesgo de que la blastocistosis deje de ser un problema individual de salud para convertirse en un problema de salud pública.

■ Conclusión

Blastocystis sp. fue identificado en 25% de los pacientes con SII estudiados. Nuestros datos apoyan la hipótesis de linajes clonales en este parásito en distintas regiones del mundo; es decir, que hay muchos parásitos genéticamente idénticos en distintas partes del mundo, aunque por procesos evolutivos se podrían encontrar eventualmente poblaciones autóctonas.

■ Agradecimiento

Estudio realizado con el apoyo del proyecto CONACYT N° 69589.

Referencias

1. Camilleri M, Heading RC, Thompson WG. Consensus report: clinical perspectives, mechanisms, diagnosis, and management of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;6:1407-30.
2. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, et al. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1480-91.
3. Kang JY. Systematic review: the influence of geography and ethnicity in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:663-76.
4. Leyva-Jiménez R, Olvera-Torres P, Alvarez-Córdova MM, et al. Síndrome de intestino irritable en el adulto que acude a una unidad de medicina familiar. *Rev Med Inst Mex Seg Soc* 2006;44:473-9.
5. Schmulson M, Vargas JA, López-Colombo A, et al. Prevalencia y caracterización de los subtipos de SII según los criterios de Roma III, en un estudio clínico, multicéntrico. Reporte del grupo mexicano de estudio para el SII. *Rev Gastroenterol Mex* 2010;75:427-38.
6. Bautista-Cerecedo R, Ortiz-Espinosa RM, Muñoz-Juarez S. Síndrome de intestino irritable en estudiantes de medicina. *Rev Fac Med* 2011;54:4-11.
7. Gwee KA, Leong YI, Graham JC. The role of psychological and biological factors in post-infective gut dysfunction. *Gut* 1999;44:400-6.
8. van der Veek PP, van den Berg M, de Kroon YE, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2510-6.
9. Barkhordari E, Rezaei N, Ansari-pour B, et al. Proinflammatory cytokine gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *J Clin Immunol* 2010;30:74-9.
10. Barkhordari E, Rezaei N, Mahmoudi M, et al. T-helper 1, T-helper 2, and T-regulatory cytokines gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Inflammation* 2010;33:281-6.
11. Stark D, van Hal S, Marriott D, et al. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their diagnosis. *Int J Parasitol* 2007;37:11-20.
12. Yakoob J, Jafri W, Beg MA, et al. Irritable bowel syndrome: associated with genotypes of *Blastocystis sp. hominis*. *Parasitol Res* 2010;106:1033-8.
13. Tan KS. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis spp.* *Clin Microbiol Rev* 2008;21:639-65.
14. Soupart L, Sancier G, Cian A, et al. Molecular epidemiology of human *Blastocystis sp.* isolates in France. *Parasitol Res* 2009;105:413-21.
15. Church C, Neill A, Schotthoefer AM. Intestinal infections in humans in the Rocky Mountain region, United States. *J Parasitol* 2010;96:194-6.
16. Utzinger J, Botero-Kleiven S, Castelli F, et al. Microscopic diagnosis of sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed stool samples for helminths and intestinal protozoa: a comparison among European reference laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:267-73.
17. Larrosa-Haro A, Ruiz-Perez M, Aguilar-Benavides S. Utilidad de los estudios en heces para el diagnóstico y manejo de infantes y niños pre-escolares con diarrea aguda. *Salud Publica Mex* 2002;44:328-34.
18. Diaz E, Mondragon J, Ramirez E, et al. Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2003;68:384-5.
19. Cruz-Licea V, Plancarte-Crespo A, Morán-Alvarez C. *Blastocystis sp. hominis* among food vendors in Xochimilco markets. *Rev Latinoam Microbiol* 2003;45:12-9.
20. Rodríguez E, Mateos B, González JC, et al. Transición parasitaria a *Blastocystis sp. hominis* en niños de la zona centro del estado de Guerrero, México. *Parasitol Latinoam* 2008;63:20-8.
21. Martínez-Barbosa I, Gutiérrez-Quiroz M, Ruiz-González L, et al. *Blastocystis sp. hominis* y su relación con el estado nutricional de escolares en una comunidad de la sierra de Huayacocotla, Veracruz, México. *Rev Biomed* 2010;21:77-84.
22. Stensvold CR, Brillowska-Dabrowska RA, et al. Detection of *Blastocystis sp. hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. *J Parasitol* 2006;92:1081-7.
23. Stensvold CR, Suresh CK, Tan KSW, et al. Terminology for *Blastocystis* subtypes-a consensus. *Trends Parasitol* 2007;23:93-6.
24. Glantz SA. *Primer of Biostatistics*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill, Inc; 1992. pp.133.
25. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 4: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004;5:150-63.
26. Thompson L, Reeder T, Abel G. 'I can't get my husband to go and have a colonoscopy': Gender and screening for colorectal cancer. *Health (London)* 2011;in press.
27. Chen TL, Chan CC, Chen HP, et al. Clinical characteristics and endoscopic findings associated with *Blastocystis sp. hominis* in healthy adults. *Am J Trop Med Hyg* 2003;69:213-6.
28. Yakoob J, Jafri W, Jafri N, et al. Irritable bowel syndrome: in search of an etiology: role of *Blastocystis sp. hominis*. *Am J Trop Med Hyg* 2004;70:383-5.
29. Stensvold CR, Lewis HC, Hammerum AM, et al. *Blastocystis sp.*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiol Infect* 2009;137:1655-63.
30. Yoshikawa H, Morimoto K, Wu Z, et al. Problems in speciation in the genus *Blastocystis sp.* *Trends Parasitol* 2004;20:251-5.
31. Ramírez-Miranda ME, Hernández-Castellanos R, López-Escamilla E, et al. Parasites in Mexican patients with irritable bowel syndrome: a case-control study. *Parasit Vectors* 2010;3:96.
32. Jelínek T, Peyerl G, Loscher T, et al. The role of *Blastocystis sp. hominis* as a possible intestinal pathogen in travellers. *J Infect* 1997;35:63-6.