

Grado de Farmacia

## TRABAJO DE FIN DE GRADO

Curso 2023/2024

### **Evaluación *in vitro* de tratamientos frente a *Blastocystis*: revisión metodológica.**



**Haridian Pérez Ponce**

[alu0101352329@ull.edu.es](mailto:alu0101352329@ull.edu.es)

**Tutor: Jacob Lorenzo Morales**

**Co-tutor: Jose E. Piñero Barroso**

Departamento de Obstetricia, Ginecología, Pediatría, Medicina Preventiva y  
Salud Pública, Toxicología, Medicina Legal y Forense y Parasitología.

## Índice:

Abreviaturas .....	3
Datos referidos a la memoria .....	4
Resumen: .....	5
Abstract .....	5
Introducción: .....	6
Objetivos.....	10
Material y Métodos. ....	11
Resultados y discusión. ....	13
Antibióticos y antiparasitarios .....	13
Plantas Medicinales: .....	21
Conclusiones. ....	29
Bibliografía:.....	30

## Abreviaturas

*A. fragrantissima*: *Achillea fragrantissima*

*A. judaica*: *Artemisia judaica* L.

Ao: asafoetida en forma de aceite

Ap: asafoetida en forma de polvo

*B. hominis*: *Blastocystis hominis*

CIM: concentración mínima inhibitoria

CLM: concentración letal mínima.

DMSO: dimetilsulfóxido

IC50: concentración inhibidora media máxima

MTZ: metronidazol.

TMP/SMX: Trimetoprim/sulfametoxazol.

EU: eurycomanona

PFOR: piruvato ferredoxil oxidoreductasa

SMV: simeprevir

*S. pérsica*: *Salvadora pérsica*

ST1-17: Subtipos moleculares de *Blastocystis hominis*

TA: *Tongat Ali*

**Datos referidos a la memoria:**

Número de páginas de la memoria	32
Número de palabras totales de la memoria sin contar resumen, abstract, pie de tablas o figuras y referencias.	3670
Número de palabras del resumen	216
Número de palabras del abstract	203

## Resumen.

*Blastocystis hominis* es un protozoo intestinal, cuya patogenicidad sigue siendo tema de investigación. Aunque puede causar síntomas gastrointestinales, muchas infecciones son asintomáticas.

El tratamiento varía según la presentación clínica del paciente, aunque se indica el uso de metronidazol, un antibiótico con propiedades antiprotozoarias y del que ya se ha detectado la aparición de resistencias en algunos subtipos de *B. hominis*.

Por ello, actualmente existe la necesidad del establecimiento de nuevas alternativas terapéuticas. Algunas de ellas han sido evaluadas *in vitro*, destacando el uso de antibióticos como el simeprevir, ivermectina, paromicina o trimetoprim/sulfametoxazol. No solo han sido evaluados compuestos químicos, sino que también existen estudios realizados sobre diferentes extractos vegetales que presentan una prometedora actividad antiparasitaria. Entre ellos destacan los realizados con Tongrat Ali, *Achillea fragrantissima* y *Artemisia judaica* L, entre otras.

Uno de los problemas que se encuentran al revisar estos estudios es la dificultad en la comparación de dichas alternativas, ya que cada estudio utiliza variables diferentes: concentraciones, número de cepas o subtipo del protozoo.

Este trabajo pretende llevar a cabo un estudio de los resultados de actividad *in vitro* frente a *B. hominis* obtenidos por diferentes autores, recopilando la información tanto de la metodología (forma de detección, variable determinada, concentración evaluada, tiempo de incubación y subtipo de parásito evaluado) como de los resultados obtenidos.

## Abstract.

*Blastocystis hominis* is an intestinal protozoan, whose pathogenicity remains a research subject. Although it can cause gastrointestinal symptoms, many infections are asymptomatic.

Treatment varies depending on the patient's clinical presentation, although the use of metronidazole is indicated, it is an antibiotic with antiprotozoal properties and for which the emergence of resistance has already been detected in some subtypes of *B. hominis*. Therefore, there is currently a need to establish new therapeutic alternatives. Some of them have been evaluated *in vitro*, highlighting the use of antibiotics such as simeprevir, ivermectin, paromycin or trimethoprim/sulfamethoxazol.

Not only have chemical compounds been evaluated, but there are also studies carried out on different plant extracts that present promising antiparasitic activity. Among them, those made with *Tongrat Ali*, *Achillea fragrantissima* and *Artemisia judaica* L, among others, stand out.

One of the problems encountered when reviewing these studies is the difficulty in comparing these alternatives since each study uses different variables: concentrations, number of strains or subtype of the protozoan.

This work aims to study the results of *in vitro* activity against *B. hominis* obtained by different authors, compiling information on the methodology (techniques of detection, determined variable, evaluated concentration, incubation time and parasite subtype evaluated) and the results obtained.

## Introducción.

*Blastocystis hominis* es un protozoo unicelular anaerobio obligado, que se encuentra comúnmente en el tracto intestinal de los humanos y otros animales. Está extendido en todo el mundo, aunque tiene mayor prevalencia en las zonas tropicales y subtropicales de países en vías de desarrollo, debido a las malas condiciones higiénicas (Mehlhorn H, 2012; Alfellani *et al*, 2013b; Verma *et al*, 2013). Se estima que *Blastocystis* spp. infecta a más de 1.000 millones de personas en el mundo (Tan, 2008; Stensvold, 2012).

Tanto su morfología como su genética es diversa, existiendo diferencias asociadas a su distribución geográfica, ya que existen varias cepas del parásito (Stenzel *et al*, 1996).

Su morfología destaca por presentar un citoplasma con orgánulos típicos de eucariotas: ribosomas, retículo endoplasmático rugoso, aparato de Golgi, microtúbulos y vacuolas. Además, presenta un genoma constituido por una molécula de ADN circular.

Es un parásito pleomórfico, presentando seis formas morfológicas variables en tamaño, estructura y localización. Las principales son la vacuolar, granular, ameboide y quística (Tabla 1; Figura 1).

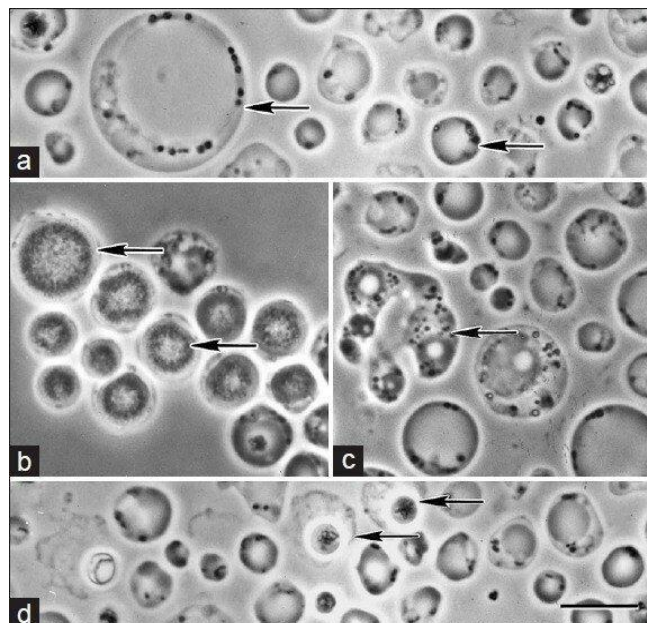


Figura 1.- Morfología de *Blastocystis* sp. en microscopio de contraste de fase (Modificado de Tan, 2008): (a) Formas vacuolares con una gran vacuola central; (b) Formas granulares con gránulos densos (flecha); (c) Forma ameboide (flecha) con sus pseudópodos; (d) Formas quísticas (flechas) caracterizado por un tamaño pequeño y la presencia de una pared quística. Barra escala = 10  $\mu$ m.

Forma parasitaria	Características
<b>Vacuolar</b>	Normalmente en heces. Forma esférica y tamaño de 5 a 15 $\mu\text{m}$ (puede alcanzar 200 $\mu\text{m}$ de diámetro). De 1 a 4 núcleos. Orgánulos dispuestos en periferia, en el centro encontramos una gran vacuola (función de reserva o multiplicación celular).
<b>Granular</b>	Presente cuando el protozoo es sometido a estímulos <i>in vitro</i> , como adición de antibióticos. Tamaño entre unos 6 y 8 $\mu\text{m}$ . De 1 a 4 núcleos. Numerosos gránulos en el citoplasma y en la vacuola con funciones metabólicas, reproductivas u lipídicas
<b>Ameboide</b>	En muestras fecales y cultivos tratados con antibióticos. Relacionada con nutrición parasitaria. Considerada forma patógena. Tamaño de 3 a 8 $\mu\text{m}$ y forma irregular. De 1 a 2 núcleos y también de 1 a 2 seudópodos.
<b>Quística</b>	Forma infectiva. Tamaño de 2 a 5 $\mu\text{m}$ , con forma ovoide De 1 a 4 núcleos. Múltiples vacuolas. Pared celular multilaminar. Formas más resistentes.
<b>Multivacuolar</b>	Predominantes en heces frescas. Tamaño de 5 a 8 $\mu\text{m}$ . De 1 a 2 núcleos. Forma de transición entre vacuolar y quística.
<b>Avacuolar</b>	Presente en heces frescas. Tamaño aproximado de 5 $\mu\text{m}$ . Sin cápsula y sin vacuolas.

Tabla 1.- Características morfológicas de *B. hominis*.

La infección ocurre por vía oral-fecal, ya sea por consumo de agua o alimentos contaminados, contacto con animales infectados o por manos sucias contaminadas. En el ciclo biológico de *B. hominis* (Figura 2), la forma quística se desenquista en el intestino grueso de los seres humanos, liberando así la forma vacuolar. Debido a la frecuencia en los episodios diarreicos de las formas ameboides, avacuolar y multivacuolar, se considera que estas pueden desempeñar un papel en la patogénesis. En humanos, las formas vacuolares liberadas se dividen por fisión binaria y pueden diferenciarse en formas ameboides o granulares. Las formas vacuolares se enquistan en el intestino del hospedador. No se conocen los detalles sobre la transición de la forma ameboide a la vacuolar y de la vacuolar a la quística.

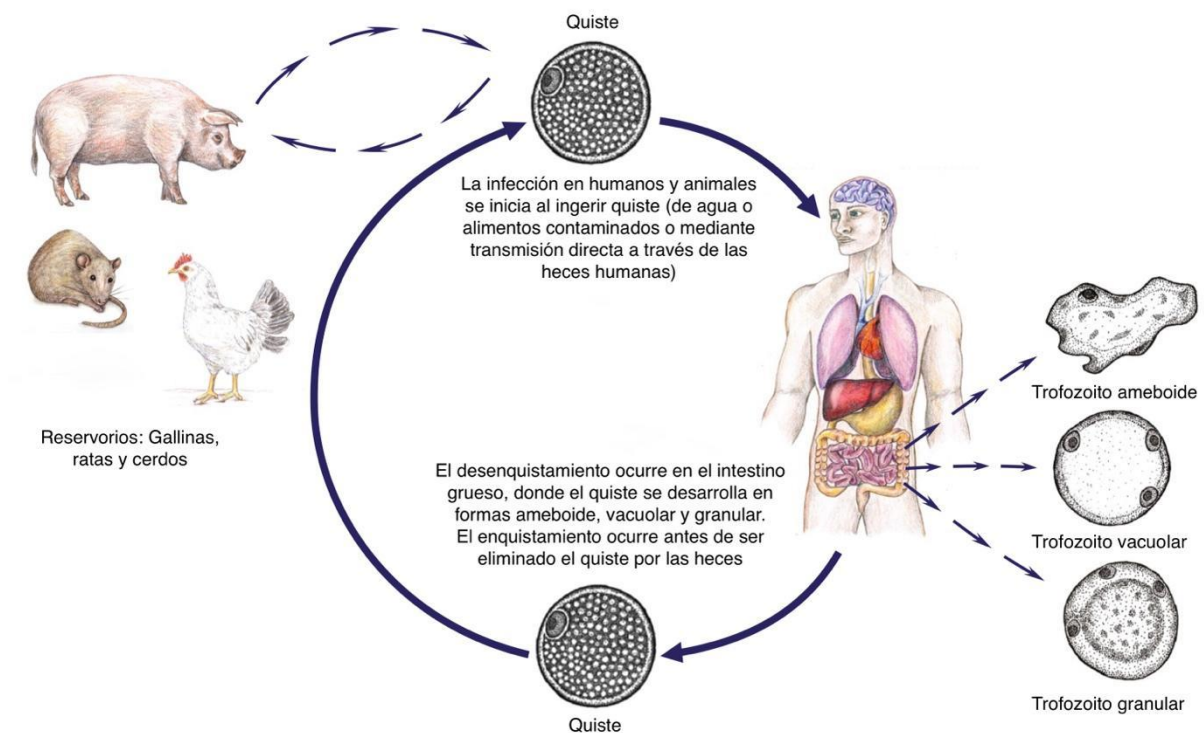


Figura 2.- Ciclo biológico de *Blastocystis hominis* (adaptado de Roberts *et al*, 2014)

*B. hominis* se puede clasificar en diferentes subtipos moleculares, desde ST1 a ST17, según el análisis genético del ARN ribosomal de la unidad pequeña. Estos subtipos presentan características morfológicas similares, encontrándose los subtipos entre ST1 y ST9 en humanos. (Skotarczak, B. 2018).

Tanto en individuos sanos como en inmunodeprimidos, los subtipos ST1, ST2, ST3 Y ST4 son los más comunes, aunque la presencia de ST1 parece tener relación con infecciones asintomáticas, mientras que ST4 se asocia con infecciones sintomáticas.

A pesar de numerosos estudios, el papel patogénico de *B. hominis* sigue siendo controvertido (Stark *et al*, 2007; Tan, 2008). No existen conceptos claros sobre la relevancia clínica, patogenicidad y necesidad de tratamiento. Los estudios publicados sugieren que *B. hominis*, está relacionado con síntomas gastrointestinales como diarrea, náuseas, distensión, dolor abdominal y vómitos. También se relaciona con alteraciones dermatológicas como eritema y urticaria (Verma *et al*, 2013).

Se ha evaluado la relación entre el ST de *Blastocystis* spp. y la presentación clínica de la infección en numerosos estudios, observándose que los subtipos ST1 y ST3 se detectan con mayor frecuencia en infecciones crónicas e individuos sintomáticos



monoparasitados, mientras que el ST2 se observa en pacientes asintomáticos (Alfellani *et al* 2013a; Alfellani *et al*, 2013b).

En cuanto al mecanismo de acción patogénico, se ha descrito que el *B. hominis* expresa proteasas de la cisteína, las cuales desempeñan un papel fundamental en la invasión de las células huésped, la respuesta inmune y la regulación del ciclo celular. Estudios *in vivo* muestran que estas proteasas inhiben la producción de la inmunoglobulina A en la mucosa intestinal, contribuyendo a la supervivencia del parásito (Amaya *et al*, 2015).

Aún con dudas sobre su significado clínico, existe indicación de erradicación si la sintomatología es persistente, después de descartar otros diagnósticos. Para la erradicación del *B. hominis* se han utilizado distintos fármacos incluyendo el metronidazol (MTZ), la nitazoxanida, el trimetropim-sulfametoxazol (TMP/SMX), la paramomicina, el iodoquinol, el ketoconazol y el secnidazol, así como probióticos (Sekar *et al*, 2013). Se considera que el MTZ es el tratamiento de primera línea, sin embargo, la tasa de erradicación es muy variable y en ciertas áreas geográficas claramente insuficiente (Stensvold *et al*, 2010). Se desconoce el mecanismo por el cual el MTZ elimina el *B. hominis*, pero induce la muerte celular por apoptosis del parásito (Haresh *et al*, 1999). Las dosis de MTZ utilizadas varían entre 250 y 750 mg/8h durante 10 días (Coyle *et al*, 2012). Se ha sugerido que la variabilidad en la respuesta al MTZ puede ser secundaria a propiedades farmacocinéticas, la inactivación del fármaco por parte de la flora bacteriana o el rol de los distintos subtipos de *B. hominis* en la patogenicidad y susceptibilidad antimicrobiana (Roberts *et al*, 2014).

El MTZ puede causar efectos secundarios indeseables y, con frecuencia, no se concluye con éxito el tratamiento del mismo. Se identifica también con posibles efectos cancerígenos, teratogénicos y embriogénicos, informándose también de la presencia de aislados resistentes a este fármaco.

Ante estos problemas, se plantea la búsqueda de otras alternativas farmacológicas, como diferentes antibióticos, antiparasitarios, plantas medicinales, etc.

## Objetivos.

El objetivo principal de este trabajo es comparar la información existente sobre estudios terapéuticos *in vitro* realizados frente a *Blastocystis hominis*, obteniendo información sobre la metodología empleada para evaluar la actividad antiparasitaria.

### Objetivos específicos:

1. Revisar la metodología presente en la bibliografía existente sobre el tratamiento de *Blastocystis hominis*.
2. Comparar tanto la metodología utilizada, como los resultados obtenidos por los diferentes autores de los estudios revisados.

## Material y Métodos.

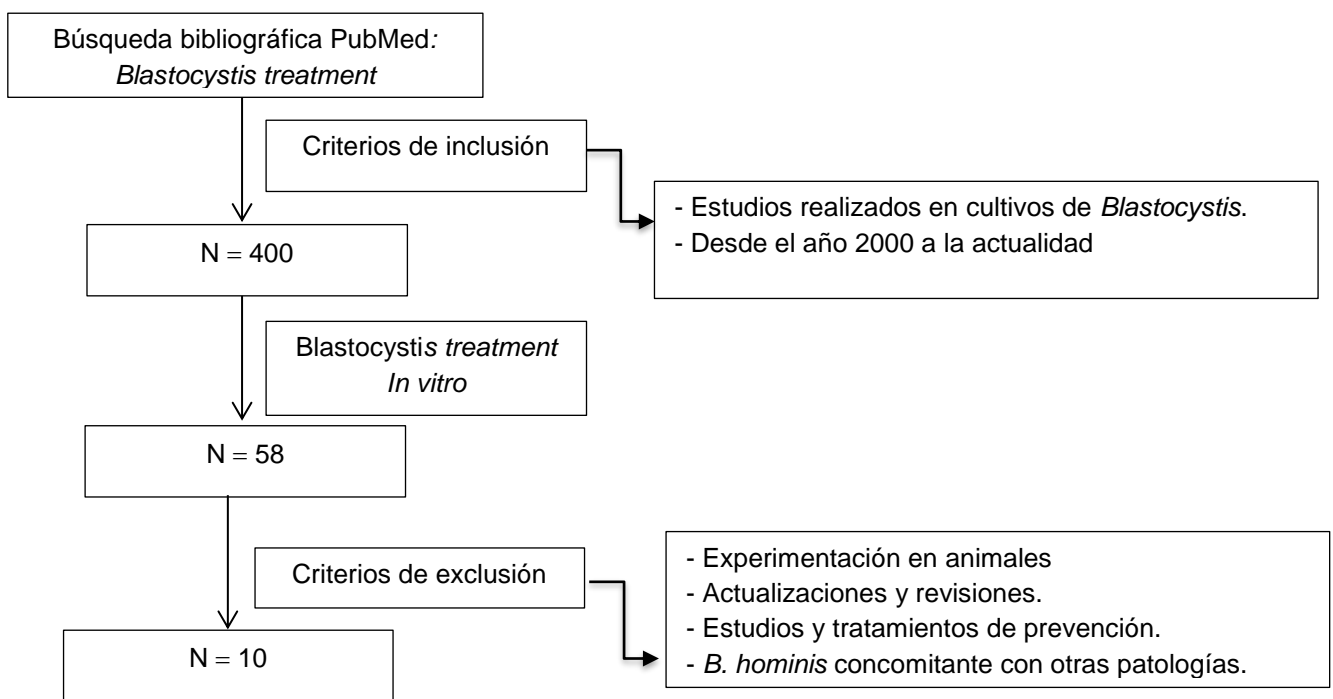
Se realizó una revisión de la literatura científica disponible hasta abril de 2024, sin restringir por idioma, fecha de publicación o impacto para evitar sesgos de selección.

Los términos de búsqueda fueron los siguientes:

“*Blastocystis*”

“Treatment”

“*In vitro*”



**Figura 3: Diagrama de flujo de la estrategia de búsqueda bibliográfica.** Se utilizó como base bibliográfica “PubMed”, donde al realizar la búsqueda de “*Blastocystis treatment*” se obtuvo un resultado de 493 artículos, computando desde el año 1975 a la actualidad, y 400 si acotamos la búsqueda desde el año 2000 hasta la actualidad. Se refinó la búsqueda añadiendo “*in vitro*” pasando a 54 artículos. La aplicación de características nos permitió acotar la búsqueda a 10 artículos.

Se analizó detalladamente el título y resumen de cada uno de los artículos, considerando en esta etapa los criterios de inclusión y exclusión que se exponen a continuación (Tabla 2).

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Estudios realizados en cultivos de <i>Blastoscystis</i> .	Experimentación en animales.
No presencia de otros agentes microbianos más allá de los necesarios para el crecimiento del protozoo.	Actualizaciones y revisiones.
	Estudios y tratamientos de prevención (no de tratamiento de la enfermedad).
	<i>Blastocystis hominis</i> concomitante con otras enfermedades.

Tabla 2.-Criterios de inclusión y exclusión de artículos sobre tratamiento de *B. hominis in vitro*.

Los datos presentes en esta bibliografía se extractaron para la elaboración de unas tablas, en la que se ordenaron los compuestos en función del tipo de principio activo, antibióticos y antiparasitarios por un lado y principios activos obtenidos de extractos de plantas por el otro.

Las tablas recopilan la siguiente información:

- Nombre del compuesto estudiado.
- Variable determinada.
- Resultados obtenidos por el estudio.
- Unidades de concentración utilizadas.
- Tipo de cepa estudiada.
- Número de cepas estudiadas.
- Bibliografía.

## Resultados y discusión.

### A. Antibióticos y antiparasitarios

Un tratamiento antiparasitario exitoso se determina por la resolución completa de los síntomas y la desaparición del parásito en las heces. Los fármacos de elección contra *B. hominis* deben cumplir con 2 requisitos: concentrarse en el colon y no ser degradados por la flora intestinal.

Como ya se ha indicado anteriormente, el MTZ es el tratamiento de primera línea, aunque la eficacia demostrada por el mismo es muy variable dependiendo de la zona geográfica (Stensvold *et al*, 2010). El MTZ es un antiinfeccioso del grupo de los imidazoles. Una vez que entra en la célula, es reducido por el metabolismo intracelular y los radicales libres formados interaccionan con el ADN, produciendo una alteración de su estructura que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y produce la muerte celular.

Batista *et al*, 2017, realizaron un estudio donde evaluaron la eficacia del MTZ en la erradicación de *Blastocystis hominis* en pacientes sintomáticos. Este trabajo puso de manifiesto que, en la bibliografía existente, la efectividad descrita varía desde un 0% a un 100%; considerando como una de las principales causas de esta variabilidad la presencia de diferencias en el grado de resistencia al fármaco. Se ha sugerido que la efectividad del MTZ depende del subtipo de *B. hominis* (Beyhan *et al*, 2015).

La descripción de fallos terapéuticos con MTZ ha motivado la búsqueda de fármacos alternativos. No existe consenso sobre qué tratamiento ofrecer a los pacientes con fracaso terapéutico con MTZ, aunque se proponen otros fármacos como tratamiento de primera línea que incluyen TMP/SMX y paramomicina, con tasas de erradicación entre 70-95%.

El TMP/SMX es una asociación de fármacos que interfiere en la síntesis bacteriana del ácido tetrahidrofólico, fundamental en la biosíntesis de purinas y, posteriormente, de ácidos nucleicos (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Ficha técnica SEPTRIN. España [Internet]. 2021). Su tasa de erradicación y disminución de los síntomas es menor que la del MTZ.

La nitazoxanida es un derivado sintético de la siliacilamida que inhibe a la enzima piruvato ferridoxin oxidoreductasa (PFOR), interrumpiendo el metabolismo del parásito, ya que la reacción de transferencia de electrones depende de esta enzima, siendo esencial para el metabolismo energético anaeróbico. Ha demostrado su eficacia en pacientes pediátricos y adultos con enteritis y diarreas, con una tasa de erradicación del parásito mayor que el MTZ.

Se han descrito varias pautas para cada fármaco, resumiéndose las mismas en la tabla 3:

Fármacos	En adultos	En niños
<b>METRONIDAZOL</b>	250-750 mg/8h por vía oral durante 10 días.  1500 mg/24h por vía oral durante 10 días.	15 mg/kg/día por vía oral, en 3 dosis (máx. 250 mg/dosis), durante 5-7 días.
<b>TRIMETOPRIM (TMP)/ SULFAMETOXAZOL (SMX)</b>	6 mg/kg TMP/30 mg/kg SMX una vez al día durante 7 días.  320mg TMP/1600 mg SMX una vez al día durante 7 días.  160 mg TMP/800 mg SMX dos veces al día durante 7 días.	No se ha evaluado sistemáticamente su seguridad.
<b>NITAZOXANIDA</b>	500 mg/12h por vía oral durante 3 días.	1-3 años ◊ 100 mg/12h por vía oral durante 3 días.  4-11 años ◊ 200 mg/12h por vía oral durante 3 días.  Lo ideal sería la suspensión oral en lugar de los comprimidos, pues la dosis es más acertada según los pediatras.

Tabla 3.- Pautas terapéuticas frente a *B. hominis*. Datos extraídos de: *Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Clinical Care of Blastocystosis* [consulta 31 de mayo de 2024]

En un reciente estudio, Roberts *et al*, 2015, analizaron la efectividad *in vitro* de varios tratamientos contra la infección por *B. hominis* (Tabla 8). Se evaluaron 12 antimicrobianos diferentes, encontrándose que muchos mostraban poca o ninguna eficacia. Los fármacos evaluados fueron: MTZ, paromomicina, ornidazol, albendazol, ivermectina, TMP-SMX, furazolidona, nitazoxanida, secnidazol, fluconazol, nistatina e

itraconazol, observándose diferencias en la respuesta a los tratamientos entre los distintos subtipos de *B. hominis* estudiados.

Dado que el número de células en los controles negativos disminuyó después de 92 horas, las pruebas de susceptibilidad se realizaron solo durante 4 días. Se evaluaron parámetros como la concentración inhibitoria mínima (CIM: concentración del fármaco que resultaba en menor crecimiento respecto al control) y la concentración letal mínima (CLM: concentración donde no se observaron células del parásito).

Los valores de CIM variaron para los compuestos como se muestra en la siguiente tabla 4:

Compuestos	CIM
Metronidazol	250-64 µg/ml
Ornidazol	125 y 32 µg/ml
Secnidazol	64 y 16 µg/ml
Paromicina	1 µg/ml
Albendazol	64 y 16 µg/ml
Furazolidona	250 y 125 µg/ml
Nitazoxanidina	500 y 250 µg/ml
Fluconazol	500 y 250 µg/ml
Itroconazol	500 y 250 µg/ml
Nistatina	250 µg/ml

Tabla 4.-Comparación de los valores de CIM para cada compuesto estudiado (Roberts *et al*, 2015).

A pesar de su uso extendido, el MTZ mostró una eficacia limitada en este estudio, en línea con investigaciones previas. Este estudio mostró como el MTZ ejercía un efecto inhibitorio hasta una concentración de 125 µg/ml, observándose un aumento en el número de células viables en los cultivos tratados con menor concentración de MTZ, lo que sugiere la presencia de un mecanismo que promueve la supervivencia celular en respuesta al tratamiento.

Otros tratamientos, como la terapia triple combinando furazolidona, nitazoxanida y secnidazol, tampoco arrojaron resultados prometedores. La paromomicina, a pesar de ser recomendada en algunas guías clínicas, resultó ineficaz en este estudio.

El secnidazol fue el único fármaco que impidió el crecimiento, en una concentración de 64 µg/ml, para la mayoría de los aislados. Sin embargo, al igual que con el metronidazol, se observó un aumento en el número de células en comparación con el control.

El ornidazol demostró efecto inhibitorio hasta una concentración de 125 µg/ml, lo que sugiere que no es ideal para el tratamiento de *B. hominis*. De los tres medicamentos de la terapia triple, solo el secnidazol mostró efectividad, hasta una concentración de 64 µg/ml, aunque luego mostró un aumento en el número de células en comparación con el control.

El TMP-SMX e ivermectina emergieron como opciones prometedoras, siendo los únicos fármacos que no mostraron crecimiento de células en las concentraciones más altas probadas en los demás aislados. Esto refuerza el uso de TMP-SMX como alternativa viable al metronidazol como tratamiento de primera línea.

Además, se observaron variaciones en la respuesta a los tratamientos entre los diferentes subtipos de *B. hominis*, por ejemplo, el TMP-SMX fue más efectivo contra el subtipo ST3 que contra otros subtipos.

Por su parte, la ivermectina tuvo una CLM que osciló entre 64 y 32  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que en el caso del TMP-SMX variaba entre 100/500 y 12/64  $\mu\text{g/ml}$ . Estos dos fueron los únicos fármacos en los que no se observó crecimiento en las concentraciones más altas para todos los aislados.

Por otro lado, un antimicrobiano evaluado para el tratamiento de la infección por *B. hominis* es el simeprevir (SMV) (Mossallam *et al*, 2020). El estudio de Mossallam, 2020 se centró en los subtipos ST1, ST2 y ST3 de *B. hominis* (Tabla 8).

Se emplearon cápsulas de SMV, disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO), ajustando las concentraciones finales a 10, 100 y 250  $\mu\text{g/ml}$ . Como control terapéutico, se utilizó MTZ (*Flagyl*), disuelto en una solución tamponada con fosfato, ajustando las concentraciones de manera similar al antibiótico.

Cada muestra aislada del parásito se cultivó a una concentración de  $1 \times 10^4$  células/ml durante 72 horas, dividiéndose en cuatro subgrupos: control infectado no tratado; control con DMSO al 1%; tratado con MTZ, subdividido según las diferentes concentraciones de estudio; y tratado experimentalmente con SMV, subdividido según las concentraciones analizadas.

La actividad del antibiótico se evaluó tras 24, 48 y 72 horas, comparándola con el control. La viabilidad del parásito se determinó utilizando colorante azul de cresilo brillante con eosina.

Los resultados del grupo de control con DMSO no mostraron ningún impacto significativo en el protozoo. En cuanto al MTZ, se observó una inhibición del crecimiento del 89,78% a las 72 horas utilizando la dosis intermedia. Sin embargo, ninguna de las dosis logró la eliminación total de *B. hominis*. La variabilidad en la respuesta al antiprotozoario puede explicarse por las diferencias en los subtipos.

El efecto *in vitro* de SMV sobre la multiplicación y la viabilidad mostró que los efectos inhibidores eran progresivos, dependiendo de la dosis y la duración del tratamiento.



Tiempo	%Inhibición de multiplicación
48 h	92.94%
72 h	98.38%

Tabla 5.-Se muestra el rango de mayor inhibición de la multiplicación.

Dosis	Tiempo	%Viabilidad
Medias	72 h	98.30%
Altas	48 h	97.57%
Altas	72 h	98.30%

Tabla 6.-En cuanto a la viabilidad de *B.hominis*, se logró un porcentaje de inhibición del 98,30% a dosis medias en 72 horas, y del 97,57% y 99,77% a dosis más altas a 48 y 72 horas, respectivamente

Al correlacionar los efectos inhibidores de SMV sobre el crecimiento, la viabilidad y el recultivo de *B.hominis*, la dosis y duración más eficaz resultó ser 150 µg/ml durante 72 horas.

Subtipo	%Inhibición de la viabilidad
ST1	98.09%
ST2	97.06%
ST3	98.30%
Subtipo	%Inhibición del crecimiento
ST1	94.93%
ST2	94.72%
ST3	95.19%

Tabla 7.-Resumen de la diferencia de inhibición de la viabilidad y del crecimiento en los subtipos evaluados

Compuesto	Forma de detección	Variable determinada	Concentración evaluada	Rango resultado	Tiempo incubación	Subtipo	Referencia
MTZ	Microscopía	Recuento de células	1-500µg/ml	5400-1200	24h	ST1	Roberts <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Recuento de células	1-500µg/ml	5900-800	24h	ST3	Roberts <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Recuento de células	1-500µg/ml	3500-200	24h	ST4	Roberts <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Recuento de células	1-500µg/ml	7700-1850	24h	ST8	Roberts <i>et al</i> , 2015
Ivermectina	Microscopía	Recuento de células	1-500µg/ml	1500-1000	24h	ST1	Roberts <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Recuento de células	1-500µg/ml	2670-1500	24h	ST3	Roberts <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Recuento de células	1-500µg/ml	4000-170	24h	ST4	Roberts <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Recuento de células	1-500µg/ml	2770-870	24h	ST8	Roberts <i>et al</i> , 2015

Paromicina	Microscopía	Recuento células	de	1-500µg/ml	680-200	24h	ST1	Roberts <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Recuento células	de	1-500µg/ml	290-120	24h	ST3	Roberts <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Recuento células	de	1-500µg/ml	365-165	24h	ST4	Roberts <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Recuento células	de	1-500µg/ml	840-610	24h	ST8	Roberts <i>et al</i> , 2015
TMP-SMX	Microscopía	Recuento células	de	8/1.5-4000/800µg/ml	1670-0	24h	ST1	Roberts <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Recuento células	de	8/1.5-4000/800µg/ml	1230-0	24h	ST3	Roberts <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Recuento células	de	8/1.5-4000/800µg/ml	1500-0	24h	ST4	Roberts <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Recuento células	de	8/1.5-4000/800µg/ml	2900-0	24h	ST8	Roberts <i>et al</i> , 2015
SMV	Microscopía	%Inhibición viabilidad		100µg/ml	29-79%	24-72h	ST3	Mossallam <i>et al</i> , 2020
	Microscopía	%Inhibición viabilidad		150µg/ml	44-97%	24-72h	ST3	Mossallam <i>et al</i> , 2020

	Microscopía	%Inhibición viabilidad	200µg/ml	54-99%	24-72h	ST3	Mossallam <i>et al</i> , 2020
	Microscopía	%Inhibición crecimiento	150µg/ml	94,83%	72h	ST1	Mossallam <i>et al</i> , 2020
	Microscopía	%Inhibición crecimiento	150µg/ml	94,74%	72h	ST2	Mossallam <i>et al</i> , 2020
	Microscopía	%Inhibición crecimiento	150µg/ml	95,19%	72h	ST3	Mossallam <i>et al</i> , 2020

Tabla 8.- Estudios de antibióticos y antiparasitarios *in vitro* frente a *B.hominis*

## B. Plantas Medicinales.

En la búsqueda de principios activos eficientes para el tratamiento de las infecciones por *B. hominis*, no sólo se han probado compuestos farmacológicos, también se han evaluado extractos de plantas. Algunas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que las protegen de patógenos, insectos y herbívoros mamíferos (Kluj *et al*, 2023). Estas son fuentes potenciales de nuevas sustancias bioactivas naturales con aplicación médica, siendo evaluados los extractos o esencias naturales de plantas por su actividad antimicrobiana y antineoplásica.

En un estudio realizado por El-Bali *et al* en 2020 (El-Bali, M. A., 2020) se evaluó como tratamiento frente a *B. hominis* diferentes extractos obtenidos de *Salvadora persica*, tanto tratados térmicamente como sin tratar (Tabla 9).

Para evaluar la actividad frente al parásito, se obtuvieron muestras de heces positivas recogidas de 15 pacientes con problemas gastrointestinales y 6 individuos asintomáticos diagnosticados por microscopía. Las muestras fueron sometidas a serotipificación identificando 5 aislados como subtipos ST1, 14 como ST3 y 2 como ST5.

Se empleó MTZ, a una concentración de 0,2 mg/ml, como control. Tanto los extractos acuosos no tratados como los tratados térmicamente fueron evaluados mediante diluciones en serie que iban desde 40 hasta 2,5 µl/ml de medio de cultivo. Cada ensayo se realizó por triplicado en 3 ml de medio de cultivo inoculado con 10<sup>5</sup> parásitos/ml, incubados a 37°C durante 48h en presencia de CO<sub>2</sub>.

Los resultados obtenidos mostraron como el extracto acuoso de *S. persica* presentaba una significativa actividad antiprotozoaria *in vitro* dependiente de la concentración contra *Blastocystis* sp. Se logró una media de inhibición del crecimiento de parásitos del 80% a una concentración de 40 µl/ml después de 48h de incubación (Tabla 9).

El tratamiento térmico a 100°C durante 10 minutos del extracto acuoso no afectó su efecto letal en los tres subtipos probados de *Blastocystis* sp., demostrando una media de inhibición del crecimiento de parásitos del 82% a 40 µl/ml después de 48h de incubación.

Por ello, se concluye que los extractos acuosos de las raíces de *S. persica* contienen componentes termoestables con una importante actividad antiprotozoaria contra *Blastocystis* sp. *in vitro*.

Este estudio mostró un efecto de inhibición del crecimiento similar en los tres subtipos estudiados: ST1, ST3 y ST5, concluyendo que se deberían llevar a cabo estudios que permitieran determinar y caracterizar los componentes antiprotozoarios activos de las raíces de *S. persica*.

Un estudio del año 2019, realizado en Egipto con diferentes plantas de la familia Asteraceae (Moktar *et al*, 2019) evaluó la actividad antiparasitaria de *Achillea fragrantissima* (Forssk.), *Echinops spinosus* L. (conocida como Shoak Elgamal) y *Artemisia judaica* L. (conocida como Shih Baladi), todas ellas empleadas en medicina tradicional (Tabla 9).

Se obtuvieron 11 muestras fecales de pacientes con sintomatología digestiva y, tras el serotipo de las mismas, se clasificaron en los subtipos ST1 y ST3. El estudio de actividad se llevó a cabo utilizando MTZ como fármaco de referencia. Los extractos etanólicos de las tres especies vegetales evaluadas revelaron actividad antiparasitaria.

*A. judaica* mostró la mayor actividad contra *B. hominis*, con un 99,3% de inhibición del crecimiento, seguida de *A. fragrantissima* con un 95,6%, con una CMI<sub>90</sub> de 2000 µg/ml. Por su parte *E. spinosus* no mostró actividad significativa contra *B. hominis*.

La inhibición del crecimiento de los extractos de frente a *B. hominis* alcanzó su punto máximo a dosis de 4000 µg/mL, donde se observó la muerte completa de los estadios cultivados del parásito durante 7 días. Los extractos de *A. judaica* fueron los más activos contra ambos subtipos (ST1 y ST3).

En el año 2012 se realizó un estudio con asafoetida, una resina gomo-oleosa obtenida de *Ferula asafoetida* L. (Umbelliferae) (El Deeb *et al*, 2012) comúnmente utilizada en la medicina tradicional y distribuida desde el Mediterráneo hasta Asia Central.

Este estudio se llevó a cabo sobre 12 aislados de *Blastocystis* sp. obtenidos de pacientes sin historial de administración de antibióticos. Las muestras positivas pertenecían al subtipo ST3.

El estudio se dividió en tres grupos: grupo con parásitos sin añadir ningún agente terapéutico; grupo con parásitos tratados con MTZ a diferentes concentraciones y; grupos donde fueron evaluadas diferentes concentraciones de asafoetida, en forma de polvo (Ap) o en forma de aceite (Ao).

Los extractos de asafoetida, en concentraciones de 2, 4, 8, 16 y 20 mg/ml (Ap) y 5, 10, 25, 40 y 50 mg/ml (Ao) se incubaron con *Blastocystis* sp. durante 24, 72 y 144 horas, comparándolos con MTZ a concentraciones de 10, 100 y 500 µg/ml.

Tanto las muestras en forma de polvo como las evaluadas como aceite redujeron los recuentos y la viabilidad de *Blastocystis* sp., confirmándose este hecho mediante microscopía. El efecto inhibitor varió según la concentración, la forma y el tiempo de incubación. Las concentraciones más bajas de asafoetida Ap y Ao que causaron una inhibición completa del crecimiento y un mayor porcentaje de inhibición de la multiplicación fueron 16 mg/ml y 40 mg/ml, respectivamente (Tabla 9).

Por otro lado, los parásitos no recuperaron su crecimiento después del recultivo en medio libre de asafoetida, tras 48, 72 y 144 horas de cultivo.

Los extractos utilizados tuvieron un efecto adverso sobre la morfología de *Blastocystis* sp., especialmente evidente a las concentraciones más altas evaluadas. Las formas vacuolares viables observadas antes de la incubación con asafoetida Ap o Ao, fueron reemplazadas por formas más granulares que perdieron viabilidad con el tiempo y mostraron una apariencia arrugada.

Por otro lado, un reciente estudio realizado por Girish *et al*, 2021, pone en evidencia la existencia de mecanismos de muerte celular programada mediante procesos apoptóticos en *B. hominis*. (Girish, S. 2021)

La apoptosis en protozoos parásitos se caracteriza por una serie de alteraciones morfológicas en el citoplasma y el núcleo, describiendo varias de estas características en *Blastocystis* sp. tratados con MTZ (Nasirudeen *et al*, 2001; Nasirudeen *et al*, 2004).

Girish había determinado previamente (Girish *et al*, 2015) que un extracto herbal popular de Malasia, Tongkat Ali extraído de *Eurycoma longifolia*, presentaba efecto frente a *Blastocystis* sp. Por ello llevaron a cabo un nuevo estudio (Girish *et al*, 2021) para investigar y comparar la respuesta apoptótica del compuesto antiprotozoario que se encuentra en el extracto de Tongkat Ali contra diferentes subtipos de *Blastocystis* sp. y comparar el efecto producido frente al MTZ, como fármaco de referencia (Tabla 9).

El estudio se realizó sobre 9 muestras de *Blastocystis* sp. de origen humano, las cuales fueron aisladas y genotipadas, demostrando pertenecer a los subtipos ST1, ST2 y ST3. Sobre estos cultivos se llevó a cabo la detección de células apoptóticas, en apoptosis tardía y necróticas, con un kit especializado.

Este trabajo puso de manifiesto que el principio activo presente en Tongkat Ali extraído de *Eurycoma longifolia* era eurycomanona.

La evaluación de la actividad del MTZ, Tongkat Ali y eurycomanona mostró que todos ellos inducían apoptosis en todos los subtipos de *Blastocystis* sp. aislados. La tasa de apoptosis se correlacionó con el aumento en la concentración, observándose que las concentraciones más altas producían una mayor cantidad de células apoptóticas.

En cuanto al porcentaje de reducción del recuento de células viables entre 24 y 96h, se observó que no todos los tratamientos actúan igual sobre los diferentes subtipos estudiados. En el caso del MTZ, fue más efectivo en ST1 y menos en ST3, mientras que en el caso de Tongkat Ali existe una mayor reducción en el subtipo ST3. En el caso de eurycomanona el mayor porcentaje de reducción se produce sobre ST2.

La tasa de apoptosis fue mayor en las células tratadas con eurycomanona, por lo que se deduce que esta desencadena la inhibición del crecimiento celular.

Aunque los datos recopilados permiten observar la inducción de una alta tasa de apoptosis en respuesta a todos los tratamientos, también se observó variación entre las células viables y las células apoptóticas en los diferentes tratamientos. En el caso del MTZ, el recuento de células viables aumentó al aumentar la tasa de apoptosis, por otro lado, el tratamiento con Tongkat Ali y eurycomanona mostraba una reducción en el recuento de células viables cuando aumentaba la tasa de apoptosis.

Nasirudeen *et al*, 2004 sostenían que el MTZ induce apoptosis en *Blastocystis* sp. y que el parásito utiliza esto como mecanismo defensivo, para asegurar que alguna de las células sobreviva.

Al comparar las respuestas al tratamiento con MTZ, en el estudio de Girish *et al*, 2021, demostraba como el tratamiento con Tongkat Ali y eurycomanona produce una reacción apoptótica, al tiempo que inhibieron el crecimiento de *Blastocystis* sp.

Por otro lado, un estudio realizado para evaluar la susceptibilidad *in vitro* de *B. hominis* frente a extractos de ajo, jengibre, cebolla y cúrcuma (Ekhlás *et al*, 2015), mostró que 0,1 mg/ml de los extractos incubados durante 24 y 48 horas afectaban al crecimiento de los parásitos. El tratamiento con jengibre y ajo mostraba una reducción significativa del número de parásitos a las 48 horas. Sin embargo, en el caso de la cebolla y la cúrcuma mostró una reducción menos significativa (Tabla 9).

De manera similar, un reciente estudio (Kot K *et al*, 2024) evaluó el efecto del ajo, la cúrcuma, el rábano picante y el jengibre sobre *B. hominis*. En este caso, los extractos de ajo y cúrcuma mostraron actividad antiparasitaria contra los subtipos ST3 y ST7.



Compuesto	Forma detección	Variable determinada	Concentración evaluada	Rango resultado	Tiempo de incubación	Subtipo	Referencia
<i>Salvadora persica</i> sin tratar	Microscopía	%Inhibición	2,5-40 µl/ml	13-79%	48 h	ST1	EI-Bali, M. A., 2020
	Microscopía	%Inhibición	2,5-40 µl/ml	18-82%	48 h	ST3	EI-Bali, M. A., 2020
	Microscopía	%Inhibición	2,5-40 µl/ml	19-76%	48 h	ST5	EI-Bali, M. A., 2020
<i>Salvadora persica</i> 100°C	Microscopía	%Inhibición	2,5-40 µl/ml	11-81%	48 h	ST1	EI-Bali, M. A., 2020
	Microscopía	%Inhibición	2,5-40 µl/ml	5-84%	48 h	ST3	EI-Bali, M. A., 2020
	Microscopía	%Inhibición	2,5-40 µl/ml	12-80%	48 h	ST5	EI-Bali, M. A., 2020
<i>Achillea fragrantissima</i>	Microscopía	%Inhibición	250-4000µg/mL	15.8-100%	72 h	ST1	Moktar <i>et al</i> , 2019
	Microscopía	%Inhibición	250-4000µg/mL	85.8-100%	72h	ST3	Moktar <i>et al</i> , 2019

<i>Echinops spinosus L.</i>	Microscopía	%Inhibición	250-4000µg/mL	5.7-100%	72h	ST1	Moktar <i>et al</i> , 2019
	Microscopía	%Inhibición	250-4000µg/mL	94.4-100%	72h	ST3	Moktar <i>et al</i> , 2019
<i>Artemisia judaica L</i>	Microscopía	%Inhibición	250-4000µg/mL	44.7-100%	72h	ST1	Moktar <i>et al</i> , 2019
	Microscopía	%Inhibición	250-4000µg/mL	74-100%	72h	ST3	Moktar <i>et al</i> , 2019
<i>Ferula asafoetida L</i> polvo	Microscopía	%Inhibición	2-20 mg/ml	6-100%	24h	ST3	El Deeb <i>et al</i> , 2012.
	Microscopía	%Inhibición	2-20 mg/ml	5-100%	72h	ST3	El Deeb <i>et al</i> , 2012.
	Microscopía	%Inhibición	2-20 mg/ml	1-100%	144h	ST3	El Deeb <i>et al</i> , 2012.
<i>Ferula asafoetida L</i> aceite	Microscopía	%Inhibición	2-20 mg/ml	1-100%	24 h	ST3	El Deeb <i>et al</i> , 2012.
	Microscopía	%Inhibición	2-20 mg/ml	4-100%	72h	ST3	El Deeb <i>et al</i> , 2012.
	Microscopía	%Inhibición	2-20 mg/ml	2-100%	144h	ST3	El Deeb <i>et al</i> , 2012.

<i>Eurycoma longifolia</i>	Microscopía	Nº células viables	0,1-0,01 mg/ml	17-23 x 10 <sup>4</sup> células	24 -96 h	ST1	Girish <i>et al</i> , 2015
(Tongkat Ali), extracto	Microscopía	Nº células viables	0,1-0,01 mg/ml	19-25 x 10 <sup>4</sup> células	24-96 h	ST2	Girish <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Nº células viables	0,1-0,01 mg/ml	15-26 x 10 <sup>4</sup> células	24-96 h	ST3	Girish <i>et al</i> , 2015
Metronidazol	Microscopía	Nº células viables	0,1-0,01 mg/ml	12-25 x 10 <sup>4</sup> células	24-96 h	ST1	Girish <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Nº células viables	0,1-0,01 mg/ml	13-25 x 10 <sup>4</sup> células	24-96 h	ST2	Girish <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Nº células viables	0,1-0,01 mg/ml	13-25 x 10 <sup>4</sup> células	24-96 h	ST3	Girish <i>et al</i> , 2015
Eurycomanone	Microscopía	Nº células viables	0,1-0,01 mg/ml	12-25 x 10 <sup>4</sup> células	24-96 h	ST1	Girish <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Nº células viables	0,1-0,01 mg/ml	13-25 x 10 <sup>4</sup> células	24-96 h	ST2	Girish <i>et al</i> , 2015
	Microscopía	Nº células viables	0,1-0,01 mg/ml	13-25 x 10 <sup>4</sup> células	24-96 h	ST3	Girish <i>et al</i> , 2015
Ajo	Microscopía	%Inhibición	0.1 mg/ml	92.44%	24-h8h	-	Abdel-Hafeez <i>et al</i> , 2015

Jengibre	Microscopía	%Inhibición	0,1 mg/ml	92,98%	24-48h	-	Abdel-Hafeez <i>et al</i> , 2015
Cebolla	Microscopía	%Inhibición	0,1 mg/ml	No tuvo efecto	24-48h	-	Abdel-Hafeez <i>et al</i> , 2015
Cúrcuma	Microscopía	%Inhibición	0,1 mg/ml	No tuvo efecto	24-48h	-	Abdel-Hafeez <i>et al</i> , 2015

Tabla 9.- Estudios de extractos vegetales *in vitro* frente a *B. hominis*

## Conclusiones.

- 1.- La bibliografía existente al respecto de los estudios de actividad *in vitro* frente a *B. hominis*, es limitada.
- 2.- La evaluación de actividad antiparasitaria se detecta, principalmente, mediante observación microscópica.
- 3.- La variable empleada en la determinación de la actividad antiparasitaria es el recuento celular o la determinación del porcentaje de inhibición de la viabilidad/crecimiento en los cultivos celulares empleados.
- 4.- Los estudios que utilizan extractos de productos naturales no siempre especifican la forma en que se han preparado los mismos, lo que hace complicado su repetición o la comparación con otros estudios de los mismos extractos o compuestos.
- 5.- Es necesaria la estandarización de un protocolo común para la realización de este tipo de estudios.

## Bibliografía.

Abdel-Hafeez EH, Ahmad AK, Andelgelil NH, Abdellatif MZ, Kamal AM, Mohamed RM. In vitro effect of some Egyptian herbal extracts against *Blastocystis hominis*. J Egypt Soc Parasitol. 2015 Apr;45(1):93-100. <https://doi.org/10.12816/0010854>.

Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Ficha técnica SEPTRIN. España [Internet]. 2016 [consulta 31 de mayo de 2024]. Disponible en: [https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/48671/48671\\_ft.pdf](https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/48671/48671_ft.pdf)

Alfellani MA, Stensvold CR, Vidal-Lapiedra A, Onuoha ESU, Fagbenro-Beyioku AF, Clark CG. Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. Acta Trop 2013; 126: 11–8. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.12.011>.

Alfellani MA, Taner-Mulla D, Jacob AS, Imeede CA, Yoshikawa H, Stensvold CR, et al. Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. Protist 2013; 164: 497–509. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.05.003>.

A.M. Amaya, J. Trejos, E. Morales. *Blastocystis* spp.: revisión literaria de un parásito intestinal altamente prevalente. Rev Univ Ind Santander Salud, 47 (2015), pp. 199-208

Beyhan YE, Yilmaz H, Cengiz ZT, Ekici A. Clinical significance and prevalence of *Blastocystis hominis* in Van, Turkey. Saudi Med J 2015; 36: 1118–21. <https://doi.org/10.15537/smj.2015.9.12444>.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Clinical Care of Blastocystosis [Internet]. 2024 [consulta 31 de mayo de 2024]. Disponible en: [https://www.cdc.gov/blastocystis/hcp/clinicalcare/?CDC\\_Aaref\\_Val=https://www.cdc.gov/parasites/blastocystis/health\\_professionals/index.html](https://www.cdc.gov/blastocystis/hcp/clinicalcare/?CDC_Aaref_Val=https://www.cdc.gov/parasites/blastocystis/health_professionals/index.html)

Coyle CM, Varughese J, Weiss LM, Tanowitz HB. *Blastocystis*: To treat or not to treat. Clin Infect Dis 2012; 54: 105–10. <https://doi.org/10.1093/cid/cir810>.

El-Bali MA, Abdulhakim A, Mohamed RT, EL-Malky MA, Bakri RA, Al-Harathi SA. Antiprotozoal potential of *Salvadora persica* against three virulent subtypes of *Blastocystis* sp. J Parasit Dis 2020; 44: 694–701. <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01247-z>.

Girish S, Kumar S, Aminudin N, Hashim NM. Comparison of apoptotic responses in *Blastocystis* sp. Upon treatment with Tongkat Ali and Metronidazole. Sci Rep 2021; 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81418-x>.

Girish S, Kumar S, Aminudin N. Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia*): a possible therapeutic candidate against *Blastocystis* sp. *Parasit Vectors* 2015; 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0942-y>.

Haresh K, Suresh K, Khairul Anus A, Saminathan S. Isolate resistance of *jBlastocystis hominis* to metronidazole. *Trop Med Int Health* 1999; 4: 274–7. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00398.x>.

Kluj A, Kosiada M, Mularczyk P, Robakowski F, Splawski J, Tylkowska K, et al. The use of phytotherapy in the fight against parasitic diseases. *Ann Parasitol* 2023; 69: 91–102. <https://doi.org/10.17420/ap6903/4.513>

Kot K, Michaliszyn A, Kalisińska E, Lepczyńska M. The influence of plant extracts on viability of ST3 and ST7 subtypes of *Blastocystis* sp. *Gut Pathog* 2024;16. <https://doi.org/10.1186/s13099-024-00613-z>.

Mokhtar AB, Ahmed SA, Eltamany EE, Karanis P. Anti-*Blastocystis* activity *in vitro* of Egyptian herbal extracts (family: Asteraceae) with emphasis on *Artemisia judaica*. *Int J Environ Res Public Health* 2019; 16: 1555. <https://doi.org/10.3390/ijerph16091555>.

Mossallam SF, El- Mansoury SAT, Tolba MM, Kohla AA, Khedr SI. *In vitro* susceptibility of human *Blastocystis* subtypes to simeprevir. *Saudi J Biol Sci* 2021; 28: 2491–501. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.01.050>

Nasirudeen AMA, Hian YE, Singh M, Tan KSW. Metronidazole induces programmed cell death in the protozoan parasite *Blastocystis hominis*. *Microbiology* 2004; 150: 33–43. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26496-0>

Nasirudeen AMA, Tan KSW, Singh M, Yap EH. Programmed cell death in a human intestinal parasite, *Blastocystis hominis*. *Parasitology* 2001; 123: 235–46. <https://doi.org/10.1017/s0031182001008332>.

Parija SC, Padukone S. *Blastocystis*: Pathogen or passenger? An evaluation of 101 years of research. *Trop Parasitol.* 2016; 6 (2): 163–4. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.190838>.

Roberts T, Bush S, Ellis J, Harkness J, Stark D. *In vitro* antimicrobial susceptibility patterns of *Blastocystis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 4417–23. <https://doi.org/10.1128/aac.04832-14>.

Roberts T, Stark D, Harkness J, Ellis J. Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathog* 2014; 6: 17.

Sekar U, Shanthi M. *Blastocystis*: Consensus of treatment and controversies. *Trop Parasitol* 2013; 3: 35–9. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.113901>.

Skotarczak B. Genetic diversity and pathogenicity of *Blastocystis*. *Ann Agric Environ Med* 2018; 25: 411–6. <https://doi.org/10.26444/aaem/81315>.

Stark D, van Hal S, Marriott D, Ellis J, Harkness J. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *Int J Parasitol* 2007; 37: 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.09.009>

Stensvold CR, Smith HV, Nagel R, Olsen KEP, Traub RJ. Eradication of *Blastocystis* carriage with antimicrobials: reality or delusion? *J Clin Gastroenterol* 2010;44:85–90. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3181bb86ba>.

Stensvold CR. Thinking *Blastocystis* out of the box. *Trends Parasitol* 2012; 28: 305. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.004>.

Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 563–84. <https://doi.org/10.1128/CMR.9.4.563>.

Tan KSW. New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 639–65. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-08>.

Verma R, Delfanian K. *Blastocystis hominis* associated acute urticaria. *Am J Med Sci* 2013; 346: 80–1. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3182801478>.