

Informe de termino de servicio social

Detección de *Blastocystis spp.* en muestras de agua, heces humanas y ostiones de Chahalacas, Veracruz.

QUE PRESENTA EL ALUMNO:

Martin Castillo Hernández. Matricula:2142033021



ASESORES

DR. JAIME AMADEO BUSTOS MARTÍNEZ No.Ec.8758



DR. JOSÉ MIJAÍL CAMPOS COMPEAN Cd. Pr.922389A



Laboratorio de Microbiología Y Biología Molecular.

Departamento de Atención a la Salud

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por enfermedades parasitarias son una de las principales problemáticas en la población mexicana de acuerdo con el sector salud, estas suelen transmitirse por el consumo de agua y alimentos contaminados o por vía fecal-oral (Hernández et al, 2011). Se tiene conocimiento de que los ecosistemas acuáticos que se encuentran contaminados por diferentes agentes, como lo son: las aguas residuales, el ganado y la industria, tienden a ser factores que favorecen la presencia de parásitos gastrointestinales en agua, así como los alimentos recolectados en estos sitios. Por lo que es indispensable la realización de estudios que ayuden a identificar la presencia de protozoarios en el agua y en los alimentos con la finalidad de conocer los cuadros epidemiológicos de las enfermedades que se presentan en las poblaciones humanas en las distintas áreas geográficas (Walter y Querales 2008).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, un 24% de las enfermedades que se presentan en el mundo, se encuentran asociadas a factores ambientales como lo son la mala calidad del agua y las precarias condiciones higiénicas (WHO, 2007).

Por lo que es importante señalar la relevancia del estudio de las enfermedades parasitarias, debido a que tienden a presentar una elevada resistencia a los distintos factores ambientales y se les asocia a los altos índices de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo, especialmente en la proporción de la población infantil (Menocal y Caraballo, 2014).

Los protozoarios intestinales más reportados son: *Blastocystis* spp., *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp. y *Giardia lamblia*, estos agentes patógenos se transmiten de forma indirecta a las poblaciones susceptibles a través de aguas tratadas inadecuadamente o por aguas recreacionales que se encuentren contaminadas por residuos y desechos fecales de animales domésticos y ganado (Walter y Querales, 2008).

Además de que se ha identificado la presencia *Blastocystis* spp., en *Crassostrea virginica* (Campos et al, 2019) lo cual hace factible la presencia de otros parásitos como lo son *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp. y *Giardia lamblia*, en *Crassostrea virginica* y este sea un reservorio de estos protozoarios.

Por este motivo el objetivo de este trabajo es identificar la presencia de *Blastocystis* spp. en muestras de agua, tubo digestivo de *Crassostrea virginica* y heces humanas recolectados en Chachalacas, Veracruz.

Marco referencial

El trabajo realizado por Dacal, Köster & Carmena (2020) menciona que el incremento de la realización de pruebas para la identificación de protozoarios en los países desarrollados ha propiciado un constante cambio de las pruebas microscópicas convencionales para la identificación de estos patógenos, considerando a la técnica PCR como una prueba simultánea de varios agentes que causan la misma etiología además de que ayuda en la automatización de los procesos de diagnóstico. Por lo que llevan a cabo un listado de las técnicas PCR más utilizadas por los centros clínicos y las instituciones de investigación para la identificación de ciertos protozoarios. Por ejemplo, han identificado que en el caso de *Blastocystis* spp. las técnicas más usuales para su detección son: PCR, dPCR, qPCR, qPCRm utilizando marcadores ITS, ssu rDNA, y para la identificación de sus genotipos se utilizará: dPCR y el marcador ITS, ssu rDNA.

Otro de los trabajos de los que se puede hacer mención es el realizado por Campos JM *et al.*, 2022 en el cual se hizo una recopilación de información científica en distintas bases de datos (PubMed, Medline, Scopus, Google Scholar, DBLP, JSTOR y LILACS) seleccionando artículos enfocados en la identificación y diagnóstico de *Blastocystis* spp, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium* spp. Elaborando un compendio sobre la epidemiología, modos de transmisión y su prevalencia de estos patógenos, además de establecer las técnicas para su rápida identificación sustentadas en los métodos microscópicos y PCR.

El trabajo realizado por Campos *et al.*, 2019 en el cual se realizó tres colectas de *Crassostrea virginica* obteniéndose 100 organismos durante junio de 2016, en julio de 2017 se obtuvo el mismo volumen de organismos y en octubre del mismo año se colectaron 50 organismos. Posteriormente se diseccionó a los organismos ya mencionados con la finalidad de extraer su sistema intestinal para la identificación de *Blastocystis* spp. Para lo cual se preparó un medio de cultivo y se incubó durante 7 días para realizar el reconocimiento por técnica microscópica, más adelante aquellas muestras que presentaron crecimiento del protozoario en cuestión se les extrajo el DNA para la realización de PCR y una vez amplificados los resultados se secuenciaron y se analizaron por bioinformática quedando demostrado la prevalencia de (revisar en todo el documento que género y especie estén en cursiva) *Blastocystis* spp. en *Crassostrea virginica* al tener 67% de muestras positivas, además de encontrarse al subtipo ST1 en las ostras.

Otro de los trabajos que contiene similitud en su contenido, es el realizado por Rudzińska *et al.*, (2020) en el cual se realizó un análisis de 149 muestras de heces de cerdos de 10 granjas; haciendo uso de la técnica de PCR, el porcentaje en que se identificó *Blastocystis* spp. fue de 38.25%, además de obtener que los cerdos son huéspedes naturales del subtipo ST5 al identificarse en 94.28% de los grupos por edad y los subtipos ST3 y ST1 son adquiridos por los cerdos a través de aguas contaminadas por desechos fecales humanos.

En tanto que la investigación realizada por Perea *et al.*, 2020 en la cual se analizaron 66 muestras fecales de niños con edades de 1 -12 años, conforme al estudio microscópico de las muestras se determinó que un 33.3% presentaban parásitos, siendo *Blastocystis* spp. el de mayor porcentaje con un 21.2%, seguido por *E. histolytica* con 4.5% y *Giardia lamblia* y *Strongyloides stercoralis* con la menor proporción de 1.5% respectivamente. Aunque posteriormente al análisis por técnica de PCR se constató que la tasa de infección era de 72.2% además de encontrarse la presencia de 2 subtipos de *Blastocystis* spp. Los cuales fueron ST1 con un porcentaje de infección de 42.2% y ST3 con un 31.8%.

Por otra parte, el trabajo realizado por Acuña Durand *et al.* (2020) en el cual se analizaron 116 muestras de heces de varias comunidades y poblaciones humanas, las cuales dieron positivo a *Blastocystis* spp. mediante la técnica PCR convencional además de utilizar cebadores específicos para este protozooario. Se identificaron infecciones por subtipo 1 con un porcentaje de 10.3%, subtipo 2 con un 7.8%, subtipo 3 con un 25% y subtipo mixto con un 8.7% sin embargo no se logró identificar el subtipo de un 48.3% de las muestras. Se asoció el síndrome de intestino irritable al subtipo 2 y se identificó que el subtipo 1 se encuentra en mayor presencia dentro de las poblaciones rurales en tanto que las comunidades urbanas y periurbanas se encuentran presentes los subtipos 1, 2 y 3.

Del mismo modo la investigación llevada a cabo por Guilavogui *et al.*, 2022 en la que se recolectaron muestras de heces fecales de 500 individuos humanos de una población guineana, de las cuales un total de 390 participantes un 78% fue positivo para *Blastocystis* spp., identificándose cinco subtipos: ST1, ST2, ST3, ST4 y ST14. Predominando ST3 con 117 casos en tanto que por el contrario ST4 con solo 2 casos, mientras que ST14 se considera que son casos por zoonosis de tipo bovino, además de dejar en claro el hecho de que este patógeno se encuentra muy activo en Guinea y otras regiones de africanas de bajos recursos.

Objetivo General

Identificación molecular de *Blastocystis* spp. en muestras de agua, heces humanas y ostiones (*Crassostrea virginica*) de Chachalacas, Veracruz.

Objetivos específicos

- 1) Determinar la presencia de *Blastocystis spp.* en la población de Chachalacas, Veracruz.
- 2) Determinar la presencia de *Blastocystis spp.* muestras de agua del río Actopan en Chachalacas, Veracruz.
- 3) Determinar la presencia de *Blastocystis spp.* en muestras de *Crassostrea virginica* recolectado en el río Actopan, Chachalacas, Veracruz.
- 4) Tipificar molecularmente a *Blastocystis spp.* en muestras de *Crassostrea virginica*, muestras de agua de la del río Actopan y en muestras de heces de la población.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Las muestras fueron colectadas en la Playa de Chachalacas y los márgenes de Río Actopan en el estado de Veracruz, estas fueron almacenadas y refrigeradas en El Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. Este trabajo se realizó durante el periodo del 25 de julio de 2022 al 25 de enero de 2023.

Clasificación de las Muestras

Las muestras obtenidas en los márgenes del Río Actopan se clasificaron de acuerdo al hospedero o medio en el que se encontraron, además de que estas se les implemento el pool testing con la finalidad de establecer la prevaecía del agente patógeno en el sitio. Por lo que se catalogaron del siguiente modo: PDHPH. - Pools DNA de Heces de las Poblaciones Humanas presentes en los márgenes del cuerpo de agua (Muestras 1-8), PDA. – Pools DNA de muestras de Agua (Muestras 9-13), PDCv. – Pools DNA extraídos del tracto intestinal de especímenes de *Crassostrea virginica* presentes en el afluente (Muestras 14-22) y las muestras obtenidas en las costas de la Playa de Chachalacas se clasificaron así: DA. - muestras de DNA del Agua de la costa (Muestras 1-36).

Identificación de *Blastocystis* spp por PCR

El DNA de las muestras se extrajo utilizando el kit Zymo Biomics DNA Miniprep de Zymo Research.

Para llevar a cabo la identificación del parásito, se utilizara el método descrito por Villalobos *et al.*, 2016, el cual consiste en amplificar la región ITS1–5.8S–ITS2 del gen 18S rDNA mediante PCR con los siguientes primers: ITS_Blas_F (5'-GGA AGG TGA AGT CGT AAC AAG-3') e ITS_Blas_R (5'-CAG CAG GTC TTC TTR CTT GA-3') los cuales amplificarán un fragmento de ~550pb para el subtipo 1, ~530pb para subtipo 2, ~620pb para subtipo 3 y ~590pb para el subtipo 7. El volumen de mezcla de PCR será de 20 μ L y contendrá: dNTPs 1 mM, cloruro de magnesio 2 mM, 5X colorless GoTaq flexi buffer, albumina de suero bovino 1.5×10^{-4} mM, primer ITS_Blas_F 0.5 mM, primer ITS_Blas_R 0.5 mM, 1 U de GoTaq DNA polimerasa y 50 μ g de DNA muestra. Con en el termociclador Mycycler de BioRad, se utilizarán las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 94° C por 30 segundos, 35 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 30 segundos, alineamiento 60° C durante 45 segundos, extensión a 72° C durante 30 segundos y una extensión final a 72° C durante 10 min. En seguida los amplicones se someterán a electroforesis en geles de agarosa al 1.2%.

Electroforesis

Se realizara una disolución de 0.570(0.5%) gr. de agarosa + 25ml. de buffer TBE al 0.5% siendo calentada a temperatura de ebullición, y posteriormente se vertira en la placa acrílica del sistema gel caster previamente ensamblando y calibrado, además de colocarse un peine con el número de dientes correspondiente al número de muestras a amplificar; una vez solidificada la placa de agarosa, esta se transferira a la cámara de electroforesis (Mini sub cell GT) siendo recubierta por la solución buffer TBE al 0.5%. A continuación, se procedera a la colocación de las muestras en los pozos de la placa de la siguiente forma: Marcador de distancias pozo 1.- 1 μ L buffer 100Bp + 1 μ L buffer Blue-Orange y enseguida las muestras previamente procesadas con 2.5 μ L de una de las muestras + 1 μ L buffer Blue-Orange por cada muestra en cada uno de los pozos en su orden respectivo, finalizando con C+ y C-. una vez terminado el llenado pozos, se cerrara la cámara para ser corrida a un voltaje de 90 Voltios durante 44 minutos utilizando una fuente de poder (Bio Rad). Para finalizar con la inmersión de la placa por un periodo de 15 minutos en una solución de bromuro de etidio y enseguida siendo develada utilizando un transiluminador (SYNGENE).

RESULTADOS

Se amplificaron un total de 57 muestras de las cuales:

Ocho de las muestras (1-8) correspondientes a los Pools DNA de Heces de las Poblaciones Humanas (PDHPH) presentes en los márgenes del Rio Actopan, amplificaron negativamente. Tal y como se muestra en la tabla 1 y en la figura 1 y 2

Pools DNA heces población <i>Blastocystis</i> spp.	Amplificación	Pools DNA heces población <i>Blastocystis</i> spp.	Amplificación
PDHPH 1	Negativa	PDHPH 5	Negativa
PDHPH 2	Negativa	PDHPH 6	Negativa
PDHPH 3	Negativa	PDHPH 7	Negativa
PDHPH 4	Negativa	PDHPH 8	Negativa

Tabla 1. Muestras amplificadas del DNA de las heces de la población humana presente en los márgenes del Rio Actopan. Veracruz.

Por otra parte 9 de las muestras (14-22) correspondientes a los Pools DNA extraídos del tracto intestinal de especímenes de *Crassostrea virginica* presentes en el Rio Actopan (PDCv) amplificaron negativamente. Tal y como se muestra en la tabla 2. Y las figuras 3 y 4.

Pools DNA <i>Crassostrea virginica. Blastocystis</i> spp.	Amplificación	Pools DNA <i>Crassostrea virginica. Blastocystis</i> spp.	Amplificación	Pools DNA <i>Crassostrea virginica. Blastocystis</i> spp.	Amplificación
PDCv 14	Negativa	PDCv 17	Negativa	PDCv 20	Negativa
PDCv 15	Negativa	PDCv 18	Negativa	PDCv 21	Negativa
PDCv 16	Negativa	PDCv 19	Negativa	PDCv 22	Negativa

Tabla 2. Muestras amplificadas del DNA del sistema intestinal de las ostras (*Crassostrea virginica*) presentes en los márgenes del Rio Actopan. Veracruz.

Mientras que 5 de las muestras (9-12) correspondientes a los Pools DNA de muestras de Agua del Rio Actopan amplificaron negativamente. Tal y como se muestra en la tabla 3 y las figuras 2y 3.

Pools DNA agua <i>Blastocystis</i> <i>spp.</i>	Amplificación
PDA 9	Negativa
PDA 10	Negativa
PDA 11	Negativa
PDA 12	Negativa
PDA 13	Negativa

Tabla 3. Muestras amplificadas del DNA de las aguas de los márgenes del Rio Actopan. Veracruz.

Finalmente 36 de las muestras (1-35) correspondientes a las obtenidas de las aguas de la Playa de Chachalacas (DA) amplificaron negativamente. Tal y como se muestra en la tabla 4 y las figuras 4 a la 7.

DNA agua <i>Blastocystis</i> <i>spp.</i>	Amplificación	DNA agua <i>Blastocystis</i> <i>spp.</i>	Amplificación	DNA agua <i>Blastocystis</i> <i>spp.</i>	Amplificación
DA1	Negativa	DA 13	Negativa	DA 25	Negativa
DA 2	Negativa	DA 14	Negativa	DA 26	Negativa
DA 3	Negativa	DA 15	Negativa	DA 27	Negativa
DA 4	Negativa	DA 16	Negativa	DA 28	Negativa
DA 5	Negativa	DA 17	Negativa	DA 29	Negativa
DA 6	Negativa	DA 18	Negativa	DA 30	Negativa
DA 7	Negativa	DA 19	Negativa	DA 31	Negativa
DA 8	Negativa	DA 20	Negativa	DA 32	Negativa
DA 9	Negativa	DA 21	Negativa	DA 33	Negativa
DA 10	Negativa	DA 22	Negativa	DA 34	Negativa
DA 11	Negativa	DA 23	Negativa	DA 35	Negativa
DA 12	Negativa	DA 24	Negativa		

Tabla 4. Muestras de DNA amplificadas de las aguas en las Playas de Chachalacas, Veracruz.

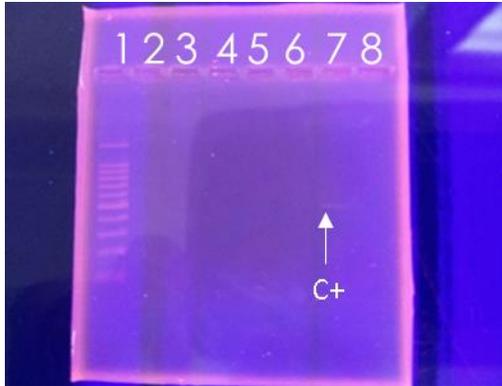


Figura 1. Amplificación de DNA Pools *Blastocistys spp.* Electroforesis gel agarosa al 0.5%. Carril 1. marcador de peso molecular. Carril 2 muestra 1 PDHPH, Carril 3 muestra 2 PDHPH, Carril 4 muestra 3 PDHPH, Carril 5 muestra 4 PDHPH, Carril 6 muestra 5 PDHPH, Carril 7 control positivo CT2 amplificación 60 Bp, Carril 8 control de reactivos.

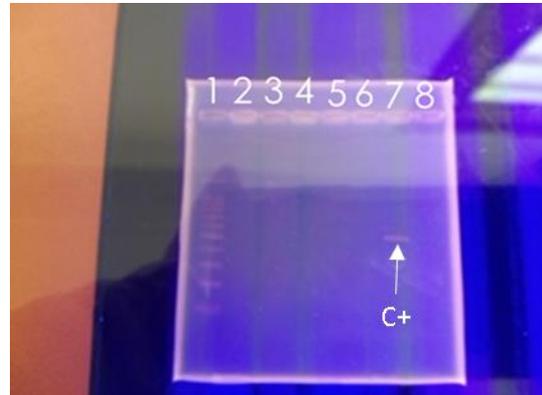


Figura 2. Amplificación de DNA Pools *Blastocistys spp.* Electroforesis gel agarosa al 0.5%. Carril 1. marcador de peso molecular. Carril 2 muestra 6 PDHPH, Carril 3 muestra 7 PDHPH, Carril 4 muestra 8 PDHPH, Carril 5 muestra 9 PDA, Carril 6 muestra 10 PDA, Carril 7 control positivo CT2 amplificación 60 Bp, Carril 8 control de reactivos.

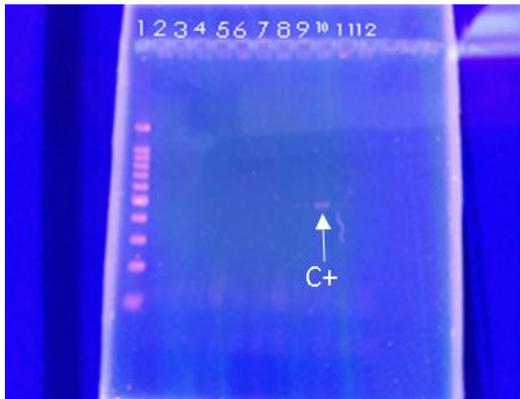


Figura 3. Amplificación de DNA Pools y agua *Blastocistys spp.* Electroforesis gel agarosa al 0.5%. Carril 1. marcador de peso molecular. Carril 2 muestra 11 PDA, Carril 3 muestra 12 PDA, Carril 4 muestra 13 PDA, Carril 5 muestra 14 PDCv, Carril 6 muestra 15 PDCv, Carril 7 muestra 16 PDCv, Carril 8 muestra 17 PDCv, Carril 9 muestra 18 PDCv, Carril 10 control positivo 75 amplificación 60 Bp, Carril 11 control positivo CT2 amplifico, Carril 12 control de reactivos.

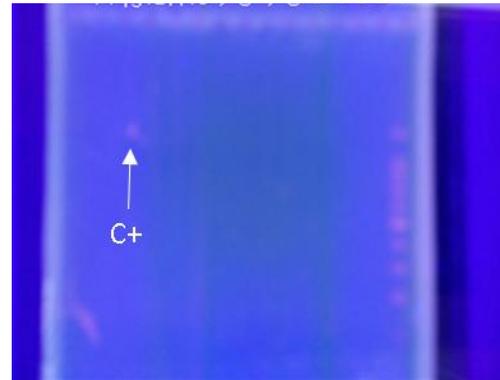


Figura 4. Amplificación de DNA Pools *Blastocistys spp.* Electroforesis gel agarosa al 0.5%. Carril 1. marcador de peso molecular. Carril 2 muestra 19 PDCv, Carril 3 muestra 20 PDCv, Carril 4 muestra 21 PDCv, Carril 5 muestra 22 PDCv, Carril 6 muestra 1 DA, Carril 7 muestra 2 DA, Carril 8 muestra 3 DA, Carril 9 muestra 4 DA, Carril 10 muestra 5 DA, Carril 11 muestra 6 DA, Carril 12 muestra 7 DA, Carril 13 control positivo CT2 amplificación 60 Bp, Carril 8 control de reactivos.

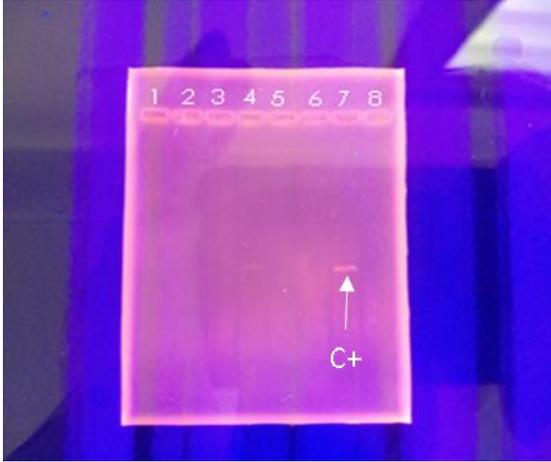


Figura 5. Amplificación de DNA agua *Blastocystis* spp. Electroforesis gel agarosa al 0.5%. Carril 1 muestra 8 DA. Carril 2 muestra 9 DA. Carril 3 muestra 10 DA. Carril 4 DNA control positivo 75(1:10) amplifico. Carril 5 control positivo 1 (B.h.). Carril 6 control positivo 15. Carril 7 control positivo 86 amplifico. Carril 8 control de reactivos.

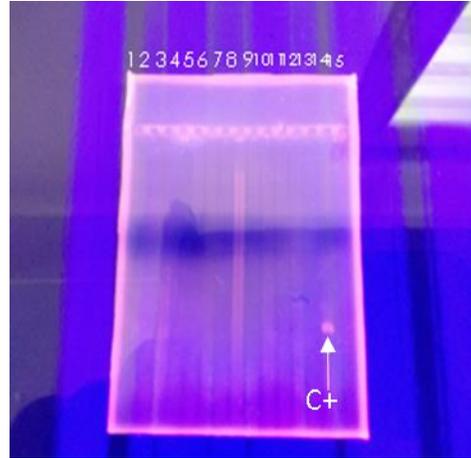


Figura 6. Amplificación de DNA agua *Blastocystis* spp. Electroforesis gel agarosa al 0.5%. Carril 1 muestra 11 DA. Carril 2 muestra 12 DA, Carril 3 muestra 13 DA, Carril 4 muestra 14 DA, Carril 5 muestra 15 DA, Carril 6 muestra 16 DA, Carril 7 muestra 17 DA, Carril 8 muestra 18 DA, Carril 9 muestra 19 DA, Carril 10 muestra 20 DA, Carril 11 muestra 21 DA, Carril 12 muestra 22 DA, Carril 13 muestra 23 DA, Carril 14 control positivo 86 amplifico, Carril 15 control de reactivos.

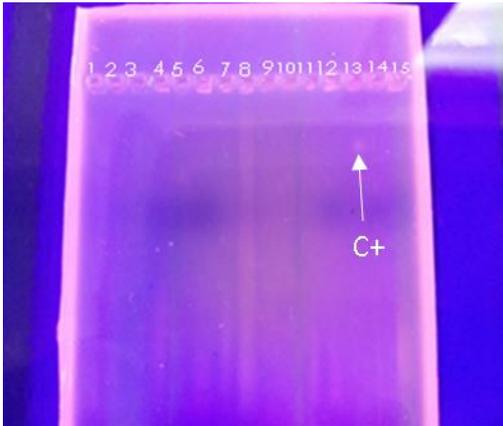


Figura 6. Amplificación de DNA agua *Blastocystis* spp. Electroforesis gel agarosa al 0.5%. Carril 1 muestra 24 DA. Carril 2 muestra 25 DA, Carril 3 muestra 26 DA, Carril 4 muestra 27 DA, Carril 5 muestra 28 DA, Carril 6 muestra 29 DA, Carril 7 muestra 30 DA, Carril 8 muestra 31 DA, Carril 9 muestra 32 DA, Carril 10 muestra 33 DA, Carril 11 muestra 34 DA, Carril 12 muestra 35 DA, Carril 14 control positivo 86 amplifico, Carril 15 control de reactivos.

Discusión

Los resultados muestran que no se encontró la presencia de *Blastocystis spp.*, en ninguna de las muestras analizadas, esto podría indicar que en las muestras colectadas no se tenía la presencia de este parásito, ya que como se menciona en otros estudios su prevalencia en algunas áreas veracruzanas es elevada, tal es el caso del trabajo realizado por Martínez Barbabosa I. *et al.* (2010) en donde el 80% de la población humana estudiada se encontraba infectada por este patógeno. Siendo que, en el presente estudio, en todas las pruebas el control positivo amplifico, por lo que la técnica estaba funcionando adecuadamente y los resultados negativos son correctos.

Otro factor es su presencia en los ostiones, al respecto se tienen pocas publicaciones recientes, como la realizada por Martínez Barbabosa I. *et al.* (2021), en la cual se considera a *Crassostrea virginica* como un posible vector de transferencia de este protozoario a los seres humanos más sin embargo esto debe ser corroborado por expertos en el tema, lo que indica que estos ostiones no son un hospedero habitual de este microorganismo, por lo que habría que hacer una búsqueda más extensa.

La presencia de *Blastocystis spp.*, en el agua depende en gran medida de la contaminación humana o animal y si los humanos no son portadores difícilmente se va a tener presencia de este protozoario en el agua. Además, también hay que tomar en cuenta la temporada del año del muestreo ya que se sabe que en épocas de secas y calor es más fácil la contaminación de los ríos por parte de los humanos o animales tal como refiere Campos JM, *et al.* (2022).

Habría que realizar un muestreo más amplio y en varias estaciones climáticas, como época de secas, de lluvia, de calor. Para poder ampliar el estudio.

Conclusiones

Se puede concluir que, en este muestreo en Chachalacas, Veracruz, no se tuvo la presencia de *Blastocystis spp.* ni en las heces de humanos, el agua y los ostiones. Por lo que se sugiere, como ya se ha hecho mención, realizar más estudios periódicos que permitan corroborar la presencia o la nula prevaencia de este protozoario en la zona, con la finalidad de generar información y hacer de la misma del conocimiento público, que ayude a mejorar la salud de las comunidades presentes en los márgenes de estos afluentes.

Bibliografía

- Campos JM, Fernández-Presas AM, Moroy-Dosta MC, Hamdan-Partida A. Bustos-Martínez Métodos para la detección de *Blastocystis* spp., *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, y *Cryptosporidium* spp. En muestras de agua y material fecal. 2022. Sociedades rurales, producción y medio ambiente. 22, 43. Pp. 161-177.
- Campos JM, Bustos-Martínez J, Martínez I, Monroy MC, Hamdan-Partida A. Detection antyping of *Blastocystis* spp. In oysters (*Crassostrea virginica*) collected in Actopan River, Chachalacas, Veracruz. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 2018, 6(2): 511-514.
- Dacal E. Köster Pamela C. & Carmena D. Diagnóstico molecular de parásitos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2020 ELSELVIER, 38,24-31.
- Hemmati A, Hooshmand E, Hosseini MJ. Identification of *Entamoeba histolytica* by Molecular Method in Surface Wate of Rasht City, Iran. *Iran Journal of Public Health* 2015; 44(2): 238-243.
- Hernández C, Aguilera MG, Castro G. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2011; 31 (4):137-151.
- Kasandra Ascuña Durand, Renzo S. Salazar Sánchez, Ricardo Castillo Neyra & Jorge Ballón Echegaray (2020). Relative Frequency of *Blastocystis* Subtypes 1, 2, and 3 in Urban and Periurban Human Populations of Arequipa, Perú. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 5. 1-12.
- Martínez Barbabosa I., Gutiérrez Quiroz M., Ruiz González L., Ruiz Hernández A L., Gutiérrez Cárdenas y Gaona E. (2010). *Blastocystis hominis* y su relación con el estado nutricional de escolares en una comunidad de la sierra de Huayacocotla, Veracruz, México. *Rev Biomed*, 21, 77-84.
- Martínez Barbabosa I., Gutiérrez Quiroz M., Ruiz González L., Fernández Presas A M., Campos Compean M., Hamdan Partida A., Aguirre Garrido J F. y Bustos Martínez J. (2021). Identification of *Blastocystis* ST1 in oysters (*Crassostrea virginica*) collected in self-service markets in Mexico City. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente* vol.21 núm. 41, 17-26.
- Meno cal LT, Caraballo YI. Importancia de la vigilancia sanitaria de los parásitos en la calidad del agua, según su uso. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 2014;52(2):196-209.
- Monika Rudzińska, Beata Kowalewska, Beata Szostakowska, Maciej Grzybek, Katarzyna Sikorska & Agnieszka Świątalska. (2020). First Report on the Occurrence and Subtypes of *Blastocystis* in Pigs in Poland Using Sequence-Tagged-Site PCR and Barcode Region Sequencing *Pathogens*, 9, 1-12

M. Perea, V. Vásquez, V. Pineda, F. Samudio, J.E. Calzada & A. Saldaña (2020). Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis sp.* Infecting children from a rural community in Panamá. ELSEVIER. 9. 1-8

Pestechian N, Rasekh H, Rostami-Nejad M, Yousofi HA, Hosseini-Safa A. Molecular identification of *Giardia lamblia*; ¿is there any correlation between diarrhea and genotyping in Iranian population? Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench 2014; 7(3): 168-172.

Timothé Guilavogui, Nausicaa Gantois, Gaël Even, Jeremy Desramaut, Ellena Dautel, Constance Denoyelle, Fode Ibrahima Cissé, Salif Cherif Touré, Bakary Luther Kourouma, Manasi Sawant, Magali Chabé, Gabriela Certad & Eric Viscogliosi (2022). Detection, Molecular Identification and Transmission of the Intestinal Protozoa *Blastocystis sp.* in Guinea from a Large-Scale Epidemiological Study Conducted in the Conakry Area. Microorganisms. 10. 1-19.

Usluca S, Aksoy Ü. Detection and genotyping of *Cryptosporidium spp.* In diarrheic stools by PCR/RFLP analyses. Turkish Journal of Medical Sciences 2011; 41 (6): 1029-1036.

Villalobos G, Mosqueda GE, Perez M, Escamilla E, Maravilla P, Hernandez F. Suitability of internal transcribed spacer (its) as maker for the population genetic structure of *Blastocystis spp.* Parasites & Vectors 2014; (7): 461

Walter QB, Querales LJ. Parásitos protozoarios entéricos en ambientes acuáticos: Métodos de concentración y detección. Interciencia. 2008; 33 (6): 418-423.

World Health Organization. Guidelines for drinking water quality. Addendum: Microbial agents in drinking water (2nd ed.). Geneva, Switzerland: WHO 2007.