

***Blastocystis hominis*: CRITERIOS DE PATOGENIDAD**

RODOLFO A. DEVERA, VIRMA J. VELÁSQUEZ A., MARITZA VÁSQUEZ, BIRMANIA AZACÓN Y MARLENE JIMÉNEZ.

*Departamento de Parasitología y Microbiología. UDO. Escuela de Medicina,
Núcleo Bolívar. Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela.*

RESUMEN

Blastocystis hominis es un protozoo de patogenicidad discutida, sin embargo, es señalado como el agente etiológico de la blastocistosis, una de las parasitosis intestinales más prevalentes en diversas regiones del mundo. El parásito debe señalarse como responsable de las manifestaciones clínicas en todo paciente que cumpla con los siguientes criterios: 1) *B. hominis* numerosos en muestra fecal. 2) Presencia de formas vacuolares grandes en las heces del paciente. 3) Ausencia de otras causas que expliquen la sintomatología. 4) Desaparición de los síntomas después del tratamiento antiparasitario específico. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar, en nuestro medio, la validez de estos criterios de patogenicidad para *B. hominis* utilizando dos grupos de personas parasitadas por el protozoo. Estos individuos fueron evaluados clínicamente y coparásitológicamente. Se aplicó las técnicas de examen directo y los métodos de concentración de Faust y Willis. En base a los resultados se discute la validez, aplicabilidad y limitaciones de cada uno de los criterios. Se concluye que la exclusión de otras causas, utilizando los métodos disponibles, y la cura clínica y parasitológica del paciente luego del tratamiento, son los criterios básicos a considerar.

PALABRA CLAVE: *Blastocystis hominis*, patogenicidad, manifestaciones clínicas.

ABSTRACT

Blastocystis hominis is a protozoon of controversial pathogenicity although it is recognized as the etiologic agent of blastocystosis, one of the most prevalent intestinal parasitoses in various parts of the world. The parasite should be considered to be responsible for the clinical manifestations of patients fulfilling the following criteria: 1) numerous *B. hominis* in the fecal sample, 2) presence of large vacuolar forms in the patient's feces, 3) absence of other causes that would explain the symptoms, and 4) disappearance of symptoms after antiparasitic treatment. The objective of the present study was to determine, in our environment, the validity of these criteria in two groups of individuals parasited by the protozoon who were evaluated clinically and by fecal parasitology examination. Techniques of direct examination and concentration methods (Faust and Willis) were applied. On the basis of the results, we discuss the validity, applicability and limitations of each criterion. We conclude that the basic criteria to be considered in the pathogenicity of *B. hominis* are the exclusion of other causes based on available methods, and the clinical and parasitological cure of the patient after treatment.

KEY WORD: *Blastocystis hominis*, pathogenicity, clinical manifestations.

INTRODUCCION

Blastocystis hominis (Brump, 1912) es un protozoo complejo, confundido por mucho tiempo con artefactos y quistes de otros protozoarios (Zierdt *et al.*, 1967; Boreham & Stenzel, 1993). A partir de 1985 Zierdt lo clasifica junto con los sarcodinos y crea un nuevo suborden: Blastocistina (Zierdt, 1988). Sin embargo, los estudios de biología molecular no demuestran una relación estrecha con los sarcodinos por lo que su posición taxonómica exacta permanece incierta (Nakamura *et al.*, 1996). Mas recientemente estudios mediante análisis filogenético de RNA

ribosomal, han permitido incluirlo dentro de los Stramenopiles, un complejo grupo de protozoarios que incluye a las algas marrones, diatomeas y otros protistas uni y multicelulares (Silberman *et al.*, 1996).

A pesar de su polimorfismo se describen cuatro formas principales: forma de cuerpo central o vacuolar, granular, ameboide y el estadio quístico. La primera es la más frecuentemente observada en heces, siendo por tanto la utilizada para realizar el diagnóstico (Zierdt *et al.*, 1967; Zierdt, 1991; Boreham & Stenzel, 1993; Singh *et al.*, 1995).

La infección por *B. hominis*, denominada blastocistosis, es reconocida actualmente como una de las parasitosis intestinales más prevalentes en diversas regiones del mundo. Sin embargo, aun quedan aspectos controversiales no resueltos. Uno de ellos es la patogenicidad de *B. hominis*. Existen informes, tanto en personas inmunocompetentes como en inmunosuprimidos, que sustentan el rol patogénico del protozoario (García *et al.*, 1984; Sheehan *et al.*, 1986; Kain *et al.*, 1987; Russo *et al.*, 1988; Hussain- Qadri *et al.*, 1989; Garavelli & Libanore, 1990; Carrascosa *et al.*, 1996; Devera *et al.*, 1997). Otros autores sostienen que las pruebas de patogenicidad no son convincentes (Udkow & Markell, 1993; Doyle *et al.*, 1990; Anónimo, 1991; Nagler *et al.*, 1993; Junod, 1995; Markell, 1995; Jones, 1997).

Las manifestaciones clínicas observadas se clasifican en dos tipos: gastrointestinales y generales, todas inespecíficas. Dentro de las primeras se han descrito diarrea, dolor abdominal, disconfort abdominal y náuseas (Garavelli *et al.*, 1991; Zierdt, 1991; Boreham & Stenzel, 1993). Diarreas generalmente profusas han sido señaladas en casos agudos (Zaki *et al.*, 1991; Logar *et al.*, 1994;). Los síntomas de índole general más frecuentes son anorexia y fatiga. Puede haber fiebre y eosinofilia (Sheehan *et al.*, 1986; Garavelli *et al.*, 1991). *B. hominis* ha sido asociado como causa de enteritis, colitis, ileítis y otras manifestaciones extraintestinales que requieren ser más ampliamente estudiadas (Russo *et al.*, 1988; Lakhanpal *et al.*, 1991; Boreham & Stenzel, 1993; Carrascosa *et al.*, 1996).

B. hominis debe señalarse como el responsable de las manifestaciones clínicas en todo paciente que cumpla con los siguientes criterios: 1) *B. hominis* numerosos en la muestra fecal. Inicialmente se consideró la presencia de 5 o más microorganismos por campos de alto poder húmedo (Zierdt, 1983). Posteriormente los estudios de Sheehan *et al.* (1986) sugieren que más de 5 células por campos de 400X se asocia con síntomas en muchos pacientes. 2) Presencia de formas vacuolares grandes en las heces del paciente. 3) Ausencia de otras causas (funcionales, otros parásitos, bacterianas, virales, micóticas) que expliquen la sintomatología. 4) Desaparición de los síntomas después del tratamiento antiparasitario específico.

El objetivo del presente estudio consistió en evaluar la validez de estos criterios de patogenicidad para *B. hominis* utilizando dos grupos de personas (niños y adultos) parasitados por el protozoario.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en Ciudad Bolívar, capital del estado Bolívar ubicado al sur de Venezuela. Dos grupos de personas fueron evaluadas: Grupo I. Treinta y dos niños, aparentemente sanos, en edad pre-escolar (3-6 años). Grupo II. Cuarenta y dos adultos hospitalizados por diversas causas en los servicios de Ginecología y Medicina I, II y III del Hospital Universitario "Ruíz y Páez". Todos los individuos incluidos en el estudio fueron diagnosticados con infección parasitaria por *B. hominis* (única y mixta) a través de exámenes directos de heces, los cuales fueron realizados en el Laboratorio de Diagnóstico Coproparasitológico del Departamento de Parasitología y Microbiología de la Escuela de Medicina, Universidad de Oriente en Ciudad Bolívar. Además, ambos grupos fueron evaluados clínicamente.

La metodología utilizada para estudiar cada uno de los criterios fue la siguiente:

Criterio 1. En aquellas muestras donde se identificó *B. hominis* se realizó su cuantificación, determinándose el promedio de células del microorganismo por cada 10 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente y observados con objetivo de 40X (Sheehan *et al.*, 1986).

Criterio 2. Se ha señalado la existencia de dos grupos de *B. hominis* en su forma vacuolar: uno de células pequeñas de aproximadamente 10 µm y otro de células grandes de 15 a 20 µm (Boreham & Stenzel, 1993; Pérez *et al.*, 1996). Por lo tanto para un observador experimentado separar ambas formas no representa mayor dificultad. En el presente estudio la separación entre formas vacuolares grandes y pequeñas de *B. hominis* se realizó mediante observación microscópica con objetivo de 40X basado en la experiencia de uno de los autores que realizó el estudio microscópico de las muestras fecales.

Criterio 3. A las muestras fecales de cada uno de esos individuos se les aplicó los métodos de concentración de Faust y Willis para excluir otros parásitos (Melvin & Brooke, 1971).

Criterio 4. En los individuos del grupo I se realizó un ensayo terapéutico con metronidazol a la dosis de 15 mg/Kg peso/día, cada 8 horas durante 7 días, con control de cura clínica y parasitológica un mes después de finalizado el tratamiento. Se consideró respuesta clínica favorable la desaparición o mejoría de la sintomatología, y cura parasitológica la ausencia de *B. hominis* en las heces de los individuos un mes después del tratamiento. El grupo II no fue tratado.

Los resultados se analizaron mediante porcentajes (%).

RESULTADOS

En el grupo I, 19 niños (59,4%) presentaban infección única por *B. hominis*, estando 13 (68,4%) sintomáticos. De estos 19 niños, 17 (89,5%) presentaban menos (<) de 5 células del protozoo por campos de 400X y 2 (10,5%) más (>) de 5 células. De esos 17, 57,9% tenía síntomas y todos los que tenían > 5 células presentaban manifestaciones clínicas (Tabla 1). La forma vacuolar pequeña se identificó en 73,7% de los casos (14/19), estando 47,3% sintomáticos (9/19). Las células de cuerpo central grandes se evidenciaron sólo en el 26,3% (5/19) estando el 21,1% (4/19) de los niños con sintomatología (Tabla 1).

Tabla 1. Relación entre el número de células presentes y la morfología de *Blastocystis hominis* con la sintomatología de los niños utilizados en el estudio. Muestras de heces con menos o más de 5 células, y formas vacuolares grandes o pequeñas de *Blastocystis hominis*.

<i>Blastocystis hominis</i>	Síntomas				Total	
	Sintomáticos		Asintomáticos			
	n	%	n	%	n	%
< 5 células	11	57,9	6	31,6	17	89,5
> 5 células	2	10,5	0	0,0	2	10,5
Grandes	4	21,1	1	5,2	5	26,3
Pequeños	9	47,3	5	26,4	14	73,7
Total	13	68,4	6	31,6	19	100,0

En el grupo II, el 88,1% (37/42) tenía infección única. De ellos, 64,3% (27/42) con < 5 células y 23,8% (10/42) con > 5 células (Tabla 2). Diez pacientes presentaban diarrea, de ellos el 70% (7/10) tenía < 5 células por campo y sólo 30% (3/10) > 5 células. En el grupo con diarrea, 8 (80%) tenían formas de cuerpo central pequeñas y 2 (20%) formas grandes.

Tabla 2. Prevalencia de *Blastocystis hominis*, sólo y asociado, según número de células presentes en heces, de pacientes adultos del Hospital Universitario "Ruíz y Páez".

Número de células *	<i>Blastocystis hominis</i>				Total	
	Sólo		Asociado			
	n	%	n	%	n	%
< 5 células	27	64,3	4	5,5	31	73,8
> 5 células	10	23,8	1	2,4	11	26,2
Total	37	88,1	5	11,9	42	100,0

* Promedio de células de cuerpo central por cada 10 campos de 400X.

En el Grupo I, 10 niños sintomáticos con infección única por *B. hominis* fueron tratados con metronidazol, obteniéndose respuesta clínica favorable en el 80% (8/10) de los casos y parasitológica en el 90% (9/10).

DISCUSIÓN

Hasta el presente la patogenicidad de *B. hominis* no ha sido bien documentada por falta de estudios controlados, aunque existe abundante evidencia de patogenicidad en la literatura (García *et al.*, 1984; Sheehan *et al.*, 1986; Kain *et al.*, 1987; Russo *et al.*, 1988; Hussain-Qadri *et al.*, 1989; Garevalli & Libanore, 1990; Anónimo, 1991; Chacín Bonilla, 1991; Carrascosa *et al.*, 1996; Devera *et al.*, 1997). A nivel experimental, desde hace muchos años se ha señalado el potencial patogénico en animales (Phillips & Zierdt, 1976; McClure *et al.*, 1980).

Criterio 1. Según los resultados, un número elevado de *B. hominis* a nivel intestinal no es necesario para desencadenar sintomatología en el paciente. Observaciones similares han realizado Kain *et al.* (1987), Doyle *et al.* (1990) y Carbajal *et al.* (1997). Sin embargo, sostienen que las manifestaciones clínicas son más frecuentes y severas cuando el parásito está presente en gran cantidad. Entonces, este primer criterio sigue siendo válido, pero no debe ser el único a considerar.

Criterio 2. Pérez *et al.* (1996) señalan que la forma vacuolar grande se asocia más con manifestaciones clínicas, sin embargo, Doyle *et al.* (1990) consideran que el tamaño de *B. hominis* no tiene relación con la patogenicidad y sintomatología de los pacientes. En el presente estudio, la presencia de formas vacuolares grandes constituyó un buen indicador de patogenicidad, pues todos los individuos que las presentaban tenían síntomas, pero con la desventaja que esta forma fue infrecuentemente observada, predominando en las heces la forma vacuolar pequeña.

Criterio 3. Sólo fueron excluidas algunas otras causas parasitarias, ya que en ninguno de los dos grupos evaluados fueron realizados estudios bacteriológicos, virológicos, micológicos o parasitológicos especiales. Tampoco estudios para excluir causas funcionales. Este criterio presenta la limitante de la factibilidad en nuestro medio, ya que ni para fines de investigación ni en la práctica clínica a un paciente le son realizados de rutina todos esos exámenes. Además, se debe considerar el hecho de que en las regiones tropicales existen patógenos intestinales de detección difícil y algunos todavía no conocidos que pueden causar sintomatología similar a la producida por *B. hominis* (Markell & Udkow, 1986; Chacín Bonilla, 1991; Anónimo, 1991). Las manifestaciones pueden ser similares al

síndrome de colon irritable (Nagler *et al.*, 1993), por lo que éste debe ser excluido. Es de resaltar que recientemente, se ha señalado que la presencia de *B. hominis* puede ser un desencadenante de los episodios de colon irritable (Hussain *et al.*, 1997).

Por todo lo anterior y aunado a la escasez de recursos económicos y materiales de nuestros laboratorios y el bajo nivel socioeconómico de la mayoría de los individuos estudiados, este criterio es poco aplicable en nuestro medio. Lo mismo no sucede en otros lugares donde se disponga de recursos que permitan excluir todas esas otras posibles causas que expliquen la sintomatología en los individuos parasitados.

Otro aspecto a ser considerado es que *B. hominis*, al igual que otros protozoarios intestinales, puede presentar una eliminación intermitente con las heces, por lo tanto, es necesario recurrir al uso de examen de muestras seriadas. Sin embargo, esto es útil en casos individuales, pues esta metodología no es recomendable cuando se estudia un grupo significativo de personas.

Criterio 4. En el grupo donde se realizó el ensayo terapéutico se obtuvo respuesta clínica y parasitológica favorable en el 80% y 90% de los casos, respectivamente. Sin embargo, en un niño no fue observada mejoría clínica aun erradicando a *B. hominis*. Ello indica que posiblemente el no era la causa de la sintomatología, posibilidad que ya se había comentado previamente. Esta circunstancia le resta valor a este tercer criterio; además, muchos pacientes mejoran pero presentan persistencia de *B. hominis* en las heces, no pudiéndose establecer una relación causal. Finalmente, la falta de grupo control con placebo perjudicó los resultados.

Por otro lado Junod (1995) y Markell (1995) sostienen que *B. hominis* causa una infección autolimitada que no requiere tratamiento. La falta de grupo control en nuestro diseño metodológico no permitió verificar esta aseveración. Pero aun así, O'Gorman *et al.*, (1993) opinan que la eliminación "per se" puede ocurrir, pero es más frecuente y significativa en el grupo que recibe drogas antiparasitarias. Se requieren futuros estudios utilizando grupos controles y seguimiento de los pacientes para verificar estas observaciones. Considerando las limitaciones metodológicas del estudio y compartiendo las opiniones de los autores que consideran que la infección por el protozoario debe tratarse, este tercer criterio es bastante útil para atribuirle un papel patogénico a *B. hominis*.

En conclusión, en nuestro medio, es difícil cumplir con todos estos criterios, siendo algunos no tan válidos, debiéndose adecuar a la realidad de cada región. Consideramos que los criterios básicos son la exclusión de otras causas (utilizando los métodos disponibles) y la cura clínica y parasitológica del paciente luego del tratamiento.

Todavía la responsabilidad etiológica de *B. hominis* se realiza por exclusión de otros agentes de reconocida patogenicidad. Sin embargo, la blastocistosis es una parasitosis intestinal de prevalencia creciente que debe ser incluida en el diagnóstico diferencial de todo paciente con manifestaciones gastrointestinales, especialmente diarrea.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANÓNIMO. 1991. *Blastocystis hominis* commensal or pathogen?. Lancet 337: 521-522.
- BOREHAM, P.L.F. & STENZEL, D.J. 1993. *Blastocystis* in humans and animals: Morphology, Biology, and Epizootology. Adv. Parasitol. 32: 1-70.
- CARBAJAL, J.A., VILLA, J., LANUZA, M.D., ESTEBAN, J.G., MUÑOZ, C. & BORRAS, R. 1997. Significancia Clínica de la infección por *Blastocystis hominis*. Med. Clin. 108: 608-612.
- CARRASCOSA, M., MARTÍNEZ, J. & PÉREZ-CASTRILLÓN, J.L. 1996. Hemorrhagic proctosigmoiditis and *Blastocystis hominis* infection. Ann. Inter. Med. 124:278-279.
- CHACÍN BONILLA, L. 1991. Aspectos controversiales de *Blastocystis hominis*: taxonomía y concepto emergente de patogenicidad. Invest. Clin. 32:147-148.
- DEVERA, R.A., NIEBLA P., G., VELÍQUEZ, V.J., NASTASI C., J.A. Y GONZÁLEZ M., R. 1997. Prevalencia de infección por *Blastocystis hominis* en escolares de Ciudad Bolívar, Venezuela. Bol. Chil. Parasitol. 52: 77-81.
- DOYLE, P.W., HELGASON, M.M. MATHIAS, R.G. & PROCTOR, E.M. 1990. Epidemiology and Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. J. Clin. Microbiol. 28:116-121.
- GARAVELLI, P.L., SCAGLIONE, L., BICCOCHI, R. & LIBANORE, M. 1991. Pathogenesis of blastocystosis. Lancet. 338: 57.
- GARAVELLI, P.L. & LIBANORE, M.L. 1990. *Blastocystis* in immunodeficiency diseases. Rev. Infect. Dis. 12: 158.

- GARCÍA, L.S., BBRUCKNER, D.A. & GLANCY, M.N. 1984. Clinical relevance of *Blastocystis hominis*. Lancet i:1233-1234.
- HUSSAIN QADRI, S.M., GHADER, A., AL-OKALI, A. & AL-DAYEL, F. 1989. Clinical significance of *Blastocystis hominis*. J. Clin. Microbiol. 27: 2407-2409.
- HUSSAIN, R., JAFERI, W., ZUBERI, S., BAQAI, R., ABRAR, N., AHMED, A. & ZAMAN, V. 1997. Significantly increased IgG₂ subclass antibody levels to *Blastocystis hominis* in patient with irritable bowel Syndrom. Am. J. Trop. Med. Hyg. 56: 301-306.
- JONES, T.C. 1997. *Blastocystis hominis* More than 70 years of debate regarding pathogenicity! BJID. 1: 102-104.
- JUNOD, C. 1995. *Blastocystis hominis*: commensal habituel do colon. Presse. Med. 24: 1684-1688.
- KAIN, K.C., NOBLE, M.A., FREEMAN, H.J. & BARTALUCK. 1987. Epidemiology and clinical features associated with *Blastocystis hominis* infection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 8: 235-244.
- LAKHANPAL, S., COHEN, S.B. & FLEISCHMAN, R.M. 1991. Reactive arthritis from *Blastocystis hominis*. Arthritis Rheum. 34: 251-253.
- LOGAR, J., ANDLOVIC, A., POLISAK-PRIJATELJ, M. 1994. Incidence of *Blastocystis hominis* in patients with diarrhoea. J. Infect. 28: 151-154.
- MARKELL, E.K. & UDKOW, M.P. 1986. *Blastocystis hominis*: pathogen or fellow traveller? Am. J. Trop. Med. Hyg. 35:1023-1026.
- MARKELL, E.K. 1995. Is there any reason to continue treating *Blastocystis hominis* infections? Clin. Infect. Dis. 21: 104-105.
- MCCLURE, H. M., STROBERT, E.A. & HEALY, G.R. 1980. *Blastocystis hominis* in a pig tailed macaque: a potential enteric pathogen for nonhuman primates. Lab. Anim. Sci. 30: 890-894.
- MELVIN, D.M. & BROOKE, M.M. 1972. Métodos de laboratorio para diagnóstico de parasitosis intestinales. Nueva editorial Interamericana, S.A. México. 1a. ed. pp. 198.
- NAGLER, J., BROWN, M. & SOAVE, R. 1993. *Blastocystis hominis* in inflammatory bowel disease. J. Clin. Gastroenterol. 16: 109-112.
- NAKAMURA, Y., HASHIMOTO, T., YOSHIKAWA, H., KAMAISHI, T., NAKAMURA, F., OKAMOTO, K. & HASEGAWA, M. 1996. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* that contains cytochrome-free mitochondria inferred from the protein phylogeny of elongation factor 1 alfa. Mol. Biochem. Parasitol. 77: 241-245.
- O'GORMAN, M.A., ORENSTEIN, S.R., PROUJANSKY, R., WADOWSKY, R., PUTNAM, P.E. & KOCOSHS, S.A. 1993. Prevalence and characteristics of *Blastocystis hominis* infection in children. Clin. Pediat. 32:91-96.
- PÉREZ, C.J., RICHANY, J.L.M., SEARA, E.J. & SERJEANT, S.M. 1996. *Blastocystis hominis*: su clasificacion relacionada con la morfología y la cantidad de parásitos en las heces. Acta Cient. Venezol. 47(sup 1): 225.
- PHILLIPS, B.P. & ZIERDT, C. H. 1976. *Blastocystis hominis*: pathogenic potential in human patient and in gnotobiotics. Exp. Parasitol. 39: 358-364.
- RUSSO, A.R., STONE, S.L., TAPLIN, M.E., SNAPPER, H.J. & DOERN, G.V. 1988. Presuntive evidence for *Blastocystis hominis* as a cause of colitis. Arch. Inter. Med. 148: 1064.
- SHEEAN, D.J., RAUCHER, B.G. & MCKITRICK, J.C. 1986. Association of *Blastocystis hominis* with signs and symptoms of human disease. J. Clin. Microbiol. 24:548-550.
- SILBERMAN, J.D., SOGIN, M.L., LEIPE, D.D. & GRAAM CLARK, C. 1996. HUMAN PARASITE FINDS TAXONOMIC HOME. Nature. 380:398.
- SINGH, M., SURESH, K. HO, L.C., NG, G.C. & YAP, E.H. 1995. Elucidation of the life cycle of the intestinal protozoan *Blastocystis hominis*. Parasitol. Res. 81:446-450.
- UDKOW, M.P. & MARKELL, E.K. 1993. *Blastocystis hominis*: Prevalence in Asymptomatic versus Symptomatic hosts. J. Infec. Dis. 168:242-244.
- ZAKI, M., DAOUD, A.S., PUGH, R.N.H., AL-ALI, F., AL-MUTARI, G & AL-SALEH, Q. 1991. Clinical report of *Blastocystis hominis* infection in children. J. Trop. Med. Hyg. 94: 118-122.
- ZIERDT, C.H., RUDE, W.S. & BULL, B.S. 1967. Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. Am J. Clin. Pathol. 48:495-501.

- ZIERDT, C. H. 1991. *Blastocystis hominis*-Past and future. Clin. Microbiol. Rev. 4:61-79.
- ZIERDT, C. H. 1988. *Blastocystis hominis*, a long-misunderstood intestinal parasite. Parasitol. Today. 4:15-17.
- ZIERDT, C.H. 1983. *Blastocystis hominis* a protozoan parasite and intestinal pathogen of human beings. Clin Microbiol. Newsl. 5: 57-59