



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA [Q\*]

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia

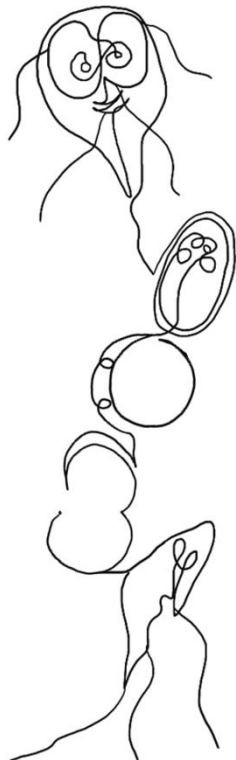
## TESIS DOCTORAL

---

Programa de Doctorado en Parasitología Humana y Animal (3145)

Epidemiología molecular de enfermedades parasitarias

# Genotipado de aislamientos de *Giardia intestinalis* y *Blastocystis* sp. de pacientes pertenecientes al departamento de salud del H.U.P. La Fe y su relación con la clínica y la distribución geográfica



Autora:

**Marta García Hita**

---

Directoras:

**Dra. María Trelis Villanueva**

**Dra. Araceli Natividad Molina De Diego**

Valencia, julio de 2025



## INFORME DIRECTORAS Y TUTORA PARA DEPÓSITO DE TESIS

Las abajo firmantes, Dra. **María Trelis Villanueva**, Profesora Titular del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia de la Universitat de València y Dra. **Araceli Natividad Molina de Diego**, Facultativo Especialista de Área en Microbiología y Parasitología en el Hospital Arnau de Vilanova de Valencia,

CERTIFICAN:

Que Doña **Marta García Hita**, N.I.F 48847996K, estudiante del Programa de Doctorado en Parasitología Humana y Animal (código 3145) y graduada en Farmacia por la Universidad de Murcia, ha realizado íntegramente la Tesis Doctoral "**Genotipado de aislamientos de *Giardia intestinalis* y *Blastocystis* sp. de pacientes pertenecientes al departamento de salud del H.U.P. La Fe y su relación con la clínica y la distribución geográfica**", con el fin de optar al grado de Doctora por la Universitat de València.

Y para que así conste, a los efectos legales oportunos, se expide el presente certificado e informe FAVORABLE para la realización del depósito y defensa de la tesis doctoral, en Valencia a 25 de junio de dos mil veinticinco.

Fdo.: **María Trelis Villanueva**

Fdo.: **Araceli Natividad Molina de Diego**

22574002P  
MARIA  
TRELIS  
Firmado digitalmente  
por 22574002P MARIA  
TRELIS  
Fecha: 2025.06.25  
14:05:53 +02'00'

Firmado por ARACELI NATIVIDAD MOLINA DE DIEGO,  
el día 26/06//2025, con un certificado emitido por,  
DNI ELECTRÓNICO, 25408255V.

Directora y tutora

Co-Directora



**A mis padres y mi hermano,**

**A mi abuela Mame,**

**A Jorge.**



## RESUMEN

*Giardia intestinalis* y *Blastocystis* sp. son dos de los protistas intestinales más prevalentes en heces humanas de nuestro entorno. Ambos presentan una elevada diversidad genética, con diferentes variantes capaces de colonizar o infectar al ser humano, expresadas como subtipos y alelos para *Blastocystis* sp., y como genotipos y subgenotipos para *G. intestinalis*. La implicación de estas variantes genéticas en el desarrollo de la clínica en humanos sigue siendo foco de discrepancias, especialmente en el caso de *Blastocystis* sp. Ambos protistas se aíslan en una gran proporción de individuos asintomáticos que actúan como portadores, además, los factores de virulencia de *Blastocystis* sp. se encuentran por definir, por lo que su rol patogénico sigue en estudio, con la necesidad de establecer qué factores son los implicados en el desarrollo de sintomatología.

En el presente estudio, se ha llevado a cabo un análisis de prevalencia y la caracterización molecular de *G. intestinalis* y *Blastocystis* sp. en pacientes, tanto sintomáticos como asintomáticos, del departamento de salud del H.U.P. La Fe, con el fin de esclarecer la frecuencia de aparición de estos protistas y sus variantes genéticas en nuestro medio, además de ayudar a entender su transmisión y virulencia. Para ello, se emplearon muestras fecales recibidas en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del hospital para estudio parasitológico entre el 1 de junio de 2017 y el 30 de agosto de 2019, con la identificación mediante microscopía óptica y los consiguientes métodos moleculares, basados en técnicas de PCR a tiempo real (qPCR) y PCR convencionales según el protista a estudio, y de secuenciación mediante método Sanger, para realizar la caracterización molecular.

Se analizaron un total de 8437 muestras de heces correspondientes a 6987 pacientes y 7361 episodios clínicos, documentándose una prevalencia de 6,4% (470/7361) para *Blastocystis* sp. y de 2,8% (203/7361) para *G. intestinalis*. En cuanto a la diversidad genética, se reportaron hasta 7 subtipos diferentes de *Blastocystis* sp. (ST1 [34,2%], ST2, ST4 [ambos 18,4%], ST3 [16,4%], ST6 [10,5%], ST7 [1,3%] y ST8 [0,7%]) y diferentes alelos dentro de cada subtipo, algunos aislados por primera vez en nuestro país en humanos (Alelo 92 de ST4). En cuanto a *G. intestinalis*, se obtuvieron hasta 5 subgenotipos distintos (BIV [44,0%], AII [20,0%], BIII [10,0%], B sin subgenotipo asociado [16,0%], BIII/BIV [6,0%], AI [2,0%] y AII/AIII [2,0%]) con una elevada hipervariabilidad genética en las secuencias del genotipo B. Además, se encontraron diferentes mutaciones no sinónimas que podrían afectar a la estructura proteica final derivada de la traducción de los genes a estudio.

Se consiguieron establecer asociaciones clínico-epidemiológicas con el subtipo o subgenotipo, según el caso. La edad parece jugar un papel importante en la incidencia de ambos protistas, siendo más frecuente *Blastocystis* sp. en adultos y *G. intestinalis* en niños/as; además, se observaron diferencias estadísticas entre la presencia de determinados subtipos y subgenotipos según la edad, lo que sugiere diferencias de factores ambientales y del propio paciente (como la microbiota o respuesta inmunitaria) que favorecen la adquisición o proliferación de un determinado subtipo o subgenotipo. La migración y movilidad internacional podría ser clave en la introducción y transmisión de nuevas variantes genéticas en nuestro entorno, identificándose el subtipo ST3 de *Blastocystis* sp. y el subgenotipo BIII de *G. intestinalis* como posiblemente importados a nuestro Área de Salud, mientras que el subtipo ST4 y los subgenotipos AII y BIV parecen estar fuertemente arraigados y establecidos en la población local.

En cuanto a la clínica, la diarrea y el dolor abdominal fueron los síntomas principalmente reportados, tanto en los pacientes con *Blastocystis* sp., como con *G. intestinalis*. No se encontró relación entre el subtipo o subgenotipo y la presencia de sintomatología, observándose una proporción similar de pacientes sintomáticos y asintomáticos con cada uno de ellos. Este resultado refuerza las hipótesis recientes que sustentan que el desarrollo de síntomas tras la colonización se debe a un proceso multifactorial, en el que intervienen características del protista, del hospedador y del entorno intestinal, con interacciones complejas entre ellos. Por otro lado, se observó un elevado número de pacientes inmunodeprimidos y asintomáticos colonizados por *Blastocystis* sp., con una elevada frecuencia del subtipo ST6 en estos pacientes, lo que muestra el carácter comensal de *Blastocystis* sp. reportado por otros autores, con estudios que señalan su capacidad de permanecer como parte de la microbiota durante largos periodos de tiempo, sin causar enfermedad. Estos datos no se obtuvieron en el estudio de *G. intestinalis*, donde se observó una proporción ligeramente superior de pacientes sintomáticos en la población inmunodeprimida con respecto a la inmunocompetente, aunque sin diferencias significativas entre ambos grupos.

Nuestros resultados aportan un avance en la comprensión de la distribución de ambos protistas intestinales y sus variantes genéticas en población clínica de Valencia, además de determinar la relevancia de diferentes factores epidemiológicos en su prevalencia y la repercusión de la diversidad genética en la clínica en humanos. Sería de especial relevancia realizar nuevos estudios con un mayor tamaño muestral, más representativo de la población general, incluyendo grupos control, y con la incorporación de nuevas técnicas diagnósticas y de caracterización

molecular, para conseguir conclusiones más firmes sobre factores de riesgo, diversidad genética y patogenicidad de *Blastocystis* sp. y *G. intestinalis*.

**PALABRAS CLAVE:** *Blastocystis* sp.; *Giardia intestinalis*; protistas intestinales; caracterización molecular; sintomatología; Valencia.

# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a mi tutora y directora de tesis **María Trellis**, quien, además de guiarme en este proceso, me ha dado total libertad para aportar, experimentar y aprender a mi manera de esta etapa, ayudándome y animándome en cada paso con una sonrisa constante. Junto a ella, **Araceli Molina** como codirectora, ha hecho posible que se pueda llevar a cabo este proyecto, enseñándome desde 0 cómo identificar los parásitos en el microscopio.

Agradezco infinitamente la ayuda que me han dado todos los compañeros del laboratorio de Microbiología y Parasitología del Hospital La Fe, facultativos que me han enseñado absolutamente todo lo que sé de microbiología, y técnicos y auxiliares de laboratorio que han tratado con mimo todas las muestras como si fueran oro, para que no perdiera pacientes. En especial a **José Miguel Sahuquillo**, porque es quien me enseñó a *investigar*, a *pensar*, a enamorarme de la microbiología. A mis *resis* **Mario y Sergio**, amigos que me llevo de Valencia, a **Noelia**, quien ha compartido conmigo cada paso, ayudándonos y animándonos mutuamente, a **Alicia y Patri**, quienes han estado hasta el final de este *camino*, escuchando mis audios eternos cuando nada me salía como quería y cuando me emocionaba porque empezaba a ver resultados. Y, por supuesto, a mi *CoR* **Nacho**, quien me apoyó y me sigue apoyando en todo lo que decido, me anima, me ayuda y me cuida estando cerca o lejos; no pude tener más suerte que coincidir con él durante esta etapa de mi vida. Sin todos ellos hubiese sido imposible completar esta Tesis.

Agradecer al departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universidad de Valencia, por acogerme tan cálidamente cuando realicé mi estancia formativa allí.

Al equipo de investigación del laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III), en especial a **David Carmena**, por aceptar tutelarme durante mi estancia, tener la paciencia de enseñarme cada procedimiento, resolver todas mis dudas y permitirme colaborar en este proyecto.

Por supuesto a mi amiga **Susana**, quien me acompañó cada día en Madrid haciéndome llorar de la risa (también cada día) y demostrándome que se puede disfrutar trabajando si tienes personas como ella a tu lado. Gracias, gracias y gracias.

A **mis tío/as y primo/as, y a mis amigas de siempre y las que siempre están**, por interesarse durante todo este proceso, no puedo estar más agradecida de la familia y las amigas que tengo.

A **mis padres, mi hermano y mi abuela Mame**, porque escuchan sin descanso todo lo que digo, aun no sabiendo muchas veces lo que hablo y aunque siempre hablo demasiado; se involucran, me animan, me abrazan, no dejan que me olvide de las metas que me marco y me ayudan a conseguirlas, siempre, como con esta Tesis Doctoral. Sin ellos no podría tener lo que tengo, ni estar donde estoy.

Y, por último, a **Jorge**, que me ha acompañado en cada paso de este proyecto, me ha visto llorar, reír, ilusionarme, agobiarme y pasar por mil estados de ánimo; y él ha llorado, se ha reído, ilusionado y agobiado conmigo. Me ha ayudado en cada etapa, estando siempre cerca, implicándose y preocupándose porque todo saliese bien. Por todo eso, siento que esta Tesis también es suya.

**GRACIAS A TODOS/AS DE CORAZÓN.**



# ABREVIATURAS

<b>6-PGDH</b>	6-fosfogluconato Deshidrogenasa
<b>ADI</b>	Arginina Deiminasa
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ARNr</b>	Ácido Ribonucleico Ribosómico
<b>AUC</b>	Área bajo la curva (Por sus siglas en inglés, <i>Area Under the Curve</i> )
<b>AVS</b>	Agencia Valenciana de Salud
<b>BG</b>	$\beta$ -giardina
<b>CAP</b>	Centros de Atención Primaria
<b>CDC</b>	Centros para el control y prevención de enfermedades (por sus siglas en inglés, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> )
<b>CID1</b>	Proteína de muerte inducida por cafeína 1
<b>CP</b>	Proteasa de cisteína
<b>CT</b>	Ciclo umbral (por sus siglas en inglés, <i>Cycle threshold</i> )
<b>ddNTP</b>	Didesoxinucleótidos
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DFA</b>	Inmunofluorescencia directa
<b>DNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>dUTP</b>	Desoxiuridina trifosfato
<b>ECDC</b>	Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (por sus siglas en inglés, <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> )
<b>EE.UU.</b>	Estados Unidos
<b>EGF</b>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
<b>elf1-<math>\alpha</math></b>	Factor de elongación 1-alfa
<b>ELISA</b>	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (por sus siglas en inglés, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )

<b>ETAP</b>	Estación de Tratamiento de Aguas para generar agua Potable
<b>FMN</b>	Flavin-mononucleótido
<b>FRET</b>	Transferencia de Energía de Resonancia de Förster
<b>GalNAc</b>	N-Acetilgalactosamina
<b>GDH</b>	NADP Glutamato deshidrogenasa
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
<b>H</b>	Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis
<b>HCMp</b>	Proteínas de membrana con alto contenido de cisteína
<b>H.U.P. La Fe</b>	Hospital Universitari i Politècnic La Fe
<b>ICT</b>	Inmunocromatografía
<b>IDR</b>	Región Intrínsecamente desordenada
<b>IFA</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IL-12</b>	Interleuquina 12
<b>IL-13</b>	Interleuquina 13
<b>IL-17</b>	Interleuquina 17
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleuquina 1 beta
<b>IL-22</b>	Interleuquina 22
<b>IL-4</b>	Interleuquina 4
<b>IL-6</b>	Interleuquina 6
<b>IL-8</b>	Interleuquina 8
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible

<b>ISCI</b>	Instituto de Salud Carlos III
<b>its</b>	Espaciador transcrito interno
<b>MLST</b>	Tipificación multilocus de secuencias
<b>MUC-2</b>	Mucina-2 humana
<b>NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NCBI</b>	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Por sus siglas en inglés, <i>National Center for Biotechnology Information</i> )
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor de transcripción nuclear kappa B
<b>NGS</b>	Secuenciación de nueva generación (por sus siglas en inglés, <i>Next Generation Sequencing</i> )
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>nPCR</b>	PCR convencionales anidadas/semianidadas (por sus siglas en inglés, <i>nested PCR</i> )
<b>OCT</b>	Ornitina carbamoil transferasa
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OR</b>	Razón de probabilidad (Por sus siglas en inglés, <i>Odds Ratio</i> )
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (Por sus siglas en inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PCR-RFLP</b>	PCR con fragmentos de restricción de longitud polimórfica (Por sus siglas en inglés, <i>PCR - Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
<b>PCR-SSCP</b>	PCR con polimorfismo de conformación de cadena simple (Por sus siglas en inglés, <i>PCR - Single-Strand Conformation Polymorphism</i> )
<b>PHK</b>	Fosforilasa quinasa B
<b>PNPO</b>	Proteína enriquecida piridoxamina 5'-fosfato oxidasa
<b>PRX1</b>	Peroxirredoxina 1
<b>PVA</b>	Acetato de polivinilo
<b>qPCR</b>	PCR a tiempo real

<b>qPCRm</b>	PCR múltiple a tiempo real
<b>RENAVE</b>	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (por sus siglas en inglés, <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
<b>Rho/ROCK</b>	Proteína quinasa asociada a Rho epitelial
<b>RIQ</b>	Rango intercuartílico
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RPL7A</b>	Proteína ribosomal L7a
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>SIA</b>	Sistema de Información Ambulatorio
<b>SII</b>	Síndrome del Intestino Irritable
<b>SIL</b>	Sistema de Información de Laboratorio
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido (por sus siglas en inglés, <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i> )
<b>ssu ADNr</b>	Gen de la subunidad pequeña del ARN ribosomal 18S
<b>ssu ARNr</b>	Subunidad menor del ARN ribosómico 18S 18S
<b>ST</b>	Subtipo
<b>STS</b>	Sitios Etiquetados por Secuencia (Por sus siglas en inglés, <i>Sequence-Tagged Sites</i> )
<b>TER</b>	Resistencia transepitelial
<b>TGC</b>	Trastorno gastrointestinal crónico
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TPI</b>	Triosa fosfato isomerasa
<b>TRX</b>	Tiorredoxina
<b>T-test/T</b>	Prueba t de Student
<b>U</b>	Unidades
<b>UE</b>	Unión Europea

<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VE</b>	Vesículas extracelulares
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VSP</b>	Proteínas variables de superficie
<b>ZO-1</b>	Zonula occludens-1
<b><math>\chi^2</math></b>	Chi-cuadrado de Pearson



# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol filogenético global de eucariotas (Burki, 2014). .....	34
<b>Figura 2.</b> Fases emitidas en heces y posibles formas infectantes propuestas entre las principales formas morfológicas descritas de <i>Blastocystis</i> sp. (CDC, 2019). .....	36
<b>Figura 3.</b> Detalles microscópicos de la forma vacuolar de <i>Blastocystis</i> sp.....	38
<b>Figura 4.</b> Detalles microscópicos de la forma granular de <i>Blastocystis</i> sp. ....	39
<b>Figura 5.</b> Detalles microscópicos de la forma ameboide de <i>Blastocystis</i> sp. ....	40
<b>Figura 6.</b> Detalles microscópicos de la forma quística de <i>Blastocystis</i> sp.....	41
<b>Figura 7.</b> Distribución de los subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. según sus principales hospedadores (elaboración propia). .....	46
<b>Figura 8.</b> Principales factores de virulencia de <i>Blastocystis</i> sp. (imagen propia).....	55
<b>Figura 9.</b> Primer dibujo de las características microscópicas de <i>Giardia intestinalis</i> realizado por Vilém Dušan Lambl en el año 1859 (Lambl, 1859; Lipoldová, 2014). .....	61
<b>Figura 10.</b> Vía de transmisión y formas morfológicas de <i>Giardia intestinalis</i> (CDC, 2024). .....	63
<b>Figura 11.</b> Morfología del trofozoíto de <i>G. intestinalis</i> . .....	65
<b>Figura 12.</b> Morfología del quiste de <i>G. intestinalis</i> . .....	67
<b>Figura 13.</b> Distribución de los genotipos y subgenotipos de <i>G. intestinalis</i> según sus principales hospedadores (elaboración propia). ....	69
<b>Figura 14.</b> Principales factores de virulencia de <i>G. intestinalis</i> (elaboración propia). .....	80
<b>Figura 15.</b> Flujo de trabajo empleado para lograr los objetivos del estudio.....	95
<b>Figura 16.</b> Localización del Hospital Universitario y Politécnico La Fe junto con los diferentes Centros de Atención Primaria y Consultorios Médicos que atiende. ....	97
<b>Figura 17.</b> Sistema de recolección, filtrado y concentración de heces <i>Kit REAL MiniSystem Easy Pick System</i> con <i>Total-Fix</i> ® (Durviz, Valencia, España) (Modificado de: Real life-science solutions, s.f.). .....	98

<b>Figura 18.</b> Sistema de concentración y filtrado de heces <i>MidiParasep</i> ® <i>Solvent Free</i> de 50 mL (Apacor, Wokingham, UK) (Modificado de: Apacor, s.f.).	100
<b>Figura 19.</b> Imagen de un gel de agarosa cargado con ADN amplificado obtenida a partir del equipo <i>DNR MiniBis Pro transilluminator</i> (312 nm) (DNR Bio-imaging, Jerusalén, Israel).	106
<b>Figura 20.</b> Cromatograma visualizado en <i>Chromas 2.6.6</i> (Technelysium, Brisbane, Australia).	112
<b>Figura 21.</b> Alineamiento de secuencias realizado con el algoritmo <i>ClustalW</i> del programa <i>MEGA-X 11 v11.0.13</i> ( <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> ).	113
<b>Figura 22.</b> (a.) Estructura terciaria de GDH obtenida de <i>AlphaFold</i> ( <a href="https://AlphaFold.com/">https://AlphaFold.com/</a> ) (b.) y remarcando la región diana a estudio (131 aminoácidos). Referencia: AF-A0A0F6PNH3-F1.	116
<b>Figura 23.</b> (a.) Estructura terciaria de BG obtenida de <i>AlphaFold</i> ( <a href="https://AlphaFold.com/">https://AlphaFold.com/</a> ) (b.) y remarcando la región diana a estudio (157 aminoácidos). Referencia: AF-P15518-F1.	118
<b>Figura 24.</b> Frecuencia de <i>Blastocystis</i> sp. según rangos de edad.	129
<b>Figura 25.</b> Evolución temporal de la frecuencia de <i>Blastocystis</i> sp.	131
<b>Figura 26.</b> Frecuencia de <i>G. intestinalis</i> según rangos de edad.	132
<b>Figura 27.</b> Evolución temporal de la frecuencia de <i>G. intestinalis</i> .	135
<b>Figura 28.</b> Frecuencia en porcentaje de los subtipos de <i>Blastocystis</i> sp.	136
<b>Figura 29.</b> Relaciones evolutivas obtenidas a partir del método <i>Neighbor-joining</i> (Saitou & Nei, 1987) sobre 350 pb de diferentes secuencias de <i>18S_rRNA_barcode</i> de <i>Blastocystis</i> sp.	138
<b>Figura 30.</b> Árbol condensado eliminando aquellas ramas con valores de <i>Bootstrap</i> inferiores al 80% en el árbol filogenético <i>Neighbor-joining</i> (Saitou & Nei, 1987) de <i>18S_rRNA_barcode</i> de <i>Blastocystis</i> sp.	139
<b>Figura 31.</b> Distribución de los diferentes subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. según la edad en años de los pacientes.	140
<b>Figura 32.</b> Distribución de los subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. según género.	142
<b>Figura 33.</b> Distribución de los subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. según los Centros de Atención Primaria y Consultorios Médicos que atiende el Hospital Universitario y Politécnico La Fe. ...	145
<b>Figura 34.</b> Curva ROC para determinar la tasa de éxito de secuenciación en función de valores de Ct obtenidos en la qPCR frente a <i>ssu</i> ADNr de <i>G. intestinalis</i> .	152

<b>Figura 35.</b> Frecuencia en porcentaje de los genotipos y subgenotipos de <i>G. intestinalis</i> .....	153
<b>Figura 36.</b> Relaciones evolutivas obtenidas a partir del método <i>Neighbor-joining</i> (Saitou & Nei, 1987) sobre 392 pb de diferentes secuencias del gen codificante para la enzima NADP Glutamato Deshidrogenasa ( <i>gdh</i> ) de <i>G. intestinalis</i> . .....	156
<b>Figura 37.</b> Árbol condensado eliminando aquellas ramas con valores de <i>Bootstrap</i> inferiores al 80% en el árbol filogenético <i>Neighbor-joining</i> (Saitou & Nei, 1987) de <i>gdh</i> . .....	157
<b>Figura 38.</b> Mutación C361T (Ref: L40508) en secuencias (a.) <i>forward</i> y (b.) <i>reverse</i> de un aislado de <i>G. intestinalis</i> BIV.....	159
<b>Figura 39.</b> Mediante <i>AlphaFold</i> se muestra transparente y con bordes verde la estructura tridimensional perdida derivada de la mutación C361T (Ref. L40508) en la proteína completa de referencia: AF-A0A0F6PNH3-F1.....	160
<b>Figura 40.</b> Relaciones evolutivas obtenidas a partir del método <i>Neighbor-joining</i> (Saitou & Nei, 1987) sobre 474 pb de diferentes secuencias del gen codificante para la proteína estructural $\beta$ -giardina ( <i>bg</i> ) de <i>G. intestinalis</i> . .....	163
<b>Figura 41.</b> Árbol condensado eliminando aquellas ramas con valores de <i>Bootstrap</i> inferiores al 80% en el árbol filogenético <i>Neighbor-joining</i> (Saitou & Nei, 1987) de <i>bg</i> de <i>G. intestinalis</i> . ...	164
<b>Figura 42.</b> Deleción de adenina en la posición 568 (Ref: AY072723) mostrada en la secuencia <i>forward</i> del aislado de <i>G. intestinalis</i> que acumula esta mutación. ....	165
<b>Figura 43.</b> Distribución de los diferentes subgenotipos de <i>G. intestinalis</i> según la edad en años de los pacientes.....	169
<b>Figura 44.</b> Localización del residuo aminoacídico 112 (marcada en rojo) en la estructura de la proteína de referencia AF-A0A0F6PNH3-F1 predicha por <i>AlphaFold</i> ( <a href="https://AlphaFold.com/">https://AlphaFold.com/</a> ). .....	212

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Nuevos subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. identificados entre los años 2021 y 2024.....	44
<b>Tabla 2.</b> Prevalencia de <i>Blastocystis</i> sp. en diferentes regiones y poblaciones de España. ....	48
<b>Tabla 3.</b> Prevalencia de <i>Giardia intestinalis</i> en diferentes regiones y poblaciones de España...	72
<b>Tabla 4.</b> Correcta recogida de heces para estudio parasitológico. ....	98
<b>Tabla 5.</b> Oligonucleótidos empleados en la identificación de <i>G. intestinalis</i> por qPCR. ....	102
<b>Tabla 6.</b> Perfil térmico y tiempos de la qPCR de <i>G. intestinalis</i> . ....	104
<b>Tabla 7.</b> Oligonucleótidos empleados en la detección de <i>gdh</i> de <i>G. intestinalis</i> . ....	107
<b>Tabla 8.</b> Perfil térmico y tiempos de PCR convencional para el gen <i>gdh</i> de <i>G. intestinalis</i> . ....	108
<b>Tabla 9.</b> Oligonucleótidos empleados en la detección de <i>bg</i> de <i>G. intestinalis</i> . ....	109
<b>Tabla 10.</b> Perfil térmico y tiempos de PCR convencional para el gen <i>bg</i> de <i>G. intestinalis</i> . ....	110
<b>Tabla 11.</b> Oligonucleótidos empleados en la detección de <i>Blastocystis</i> sp.....	111
<b>Tabla 12.</b> Perfil térmico y tiempos de PCR convencional frente a <i>ssu</i> ADNr de <i>Blastocystis</i> sp. .....	111
<b>Tabla 13.</b> Secuencias de referencia de GenBank empleadas para la tipificación de <i>G. intestinalis</i> . .....	114
<b>Tabla 14.</b> Secuencia de referencia de GenBank XP_001707257: proteína completa <i>NADP-specific glutamate dehydrogenase</i> [ <i>Giardia intestinalis</i> ]. ....	115
<b>Tabla 15.</b> Secuencia de referencia de GenBank XP_001705425: proteína completa Beta-Giardin [ <i>Giardia intestinalis</i> ]. ....	117
<b>Tabla 16.</b> Prevalencia parasitaria obtenida por microscopía óptica (N=7361). ....	127
<b>Tabla 17.</b> Distribución de muestras de heces recibidas por zonas de salud. ....	128
<b>Tabla 18.</b> Distribución de la edad en los pacientes con <i>Blastocystis</i> sp. ....	130
<b>Tabla 19.</b> Prevalencia de <i>Blastocystis</i> sp. por zonas de salud.....	130
<b>Tabla 20.</b> Distribución de <i>Blastocystis</i> sp. según la estación del año. ....	132
<b>Tabla 21.</b> Distribución de la edad en los pacientes con <i>G. intestinalis</i> . ....	133
<b>Tabla 22.</b> Prevalencia de <i>Giardia intestinalis</i> por zonas de salud. ....	134

<b>Tabla 23.</b> Distribución de <i>G. intestinalis</i> según la estación del año. ....	134
<b>Tabla 24.</b> Diversidad genética hallada en <i>Blastocystis</i> sp.....	137
<b>Tabla 25.</b> Distribución de los pacientes según grupo de edad y subtipo de <i>Blastocystis</i> sp....	141
<b>Tabla 26.</b> Distribución de los subtipos según lugar de nacimiento y viajes recientes. ....	142
<b>Tabla 27.</b> Prevalencia de los subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. por Centros de Salud. ....	144
<b>Tabla 28.</b> Sintomatología de los pacientes con <i>Blastocystis</i> sp. subtipados (N=152).....	146
<b>Tabla 29.</b> Sintomatología de los pacientes según subtipos de <i>Blastocystis</i> sp. ....	147
<b>Tabla 30.</b> Diversidad genética hallada en el gen <i>gdh</i> de <i>G. intestinalis</i> . ....	154
<b>Tabla 31.</b> Polimorfismo de un solo nucleótido en el subgenotipo All asignado por <i>gdh</i> .....	158
<b>Tabla 32.</b> Polimorfismo de un solo nucleótido en el subgenotipo BIII asignado por <i>gdh</i> .....	158
<b>Tabla 33.</b> Polimorfismo de un solo nucleótido en el subgenotipo BIV asignado por <i>gdh</i> .....	159
<b>Tabla 34.</b> Secuencia primaria obtenida de la traducción de la secuencia nucleotídica de un aislado de BIV con las mutaciones no sinónimas T265C y C361T (Ref. L40508). ....	160
<b>Tabla 35.</b> Polimorfismo de un solo nucleótido en el subgenotipo BIII/BIV asignado por <i>gdh</i> . .	160
<b>Tabla 36.</b> Diversidad genética hallada en el gen <i>bg</i> de <i>G. intestinalis</i> . ....	161
<b>Tabla 37.</b> Polimorfismo de un solo nucleótido en el subgenotipo All asignado por <i>bg</i> .....	165
<b>Tabla 38.</b> Polimorfismo de un solo nucleótido en el genotipo B asignado por <i>bg</i> . ....	166
<b>Tabla 39.</b> Diversidad molecular en genotipo/subgenotipo de aquellos amplificados de <i>G. intestinalis</i> con resultado de secuenciación tanto de <i>gdh</i> como de <i>bg</i> .....	167
<b>Tabla 40.</b> Distribución de los grupos de edad en años de los pacientes según el subgenotipo de <i>Giardia intestinalis</i> . ....	170
<b>Tabla 41.</b> Distribución de los diferentes genotipos/subgenotipos de <i>G. intestinalis</i> según sexo. ....	171
<b>Tabla 42.</b> Distribución de los subgenotipos según lugar de nacimiento y viajes recientes.....	171
<b>Tabla 43.</b> Prevalencia de cada subgenotipo de <i>G. intestinalis</i> por zonas de salud. ....	173
<b>Tabla 44.</b> Sintomatología de los pacientes con <i>G. intestinalis</i> genotipada (N=50). ....	174
<b>Tabla 45.</b> Sintomatología de los pacientes según genotipos/subgenotipos de <i>G. intestinalis</i> . ....	175

<b>Tabla 46.</b> Comparativa entre la secuencia de referencia de GenBank XP_001705425 y su alternativa tras la mutación 568delA (ref: AY072723). .....	215
--	-----

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>31</b>
1.1. <i>BLASTOCYSTIS</i> SP. ....	33
1.1.1. Descripción histórica, taxonomía y filogenia .....	33
1.1.2. Ciclo biológico y mecanismos de transmisión.....	35
1.1.3. Morfología .....	37
1.1.3.1. Forma vacuolar.....	38
1.1.3.2. Forma granular .....	39
1.1.3.3. Forma ameboide.....	39
1.1.3.4. Forma quística .....	40
1.1.3.5. Otras formas.....	41
1.1.4. Diversidad genética .....	42
1.1.5. Epidemiología y prevalencia .....	47
1.1.6. Patogenicidad y manifestaciones clínicas .....	50
1.1.7. Factores de virulencia .....	53
1.1.8. Diagnóstico .....	57
1.1.8.1. Cultivo.....	57
1.1.8.2. Microscopía óptica .....	57
1.1.8.3. Métodos inmunológicos .....	58
1.1.8.4. Biología molecular .....	59
1.2. <i>GIARDIA INTESTINALIS</i> .....	60
1.2.1. Descripción histórica, taxonomía y filogenia .....	60
1.2.2. Ciclo biológico y mecanismos de transmisión.....	63
1.2.3. Morfología .....	65
1.2.3.1. Trofozoíto.....	65
1.2.3.2. Quiste .....	66
1.2.4. Diversidad genética .....	67
1.2.5. Epidemiología y prevalencia .....	70
1.2.6. Patogenicidad y manifestaciones clínicas .....	73
1.2.7. Factores de virulencia .....	77
1.2.8. Diagnóstico .....	82
1.2.8.1. Cultivo.....	82
1.2.8.2. Microscopía óptica .....	82
1.2.8.3. Métodos inmunológicos .....	83
1.2.8.4. Biología molecular .....	84

<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>87</b>
2.1. OBJETIVO PRINCIPAL .....	89
2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS .....	89
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>91</b>
3.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	93
3.2. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	93
3.3. ÁREA Y POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO .....	96
3.4. MUESTRAS BIOLÓGICAS: RECOGIDA DE HECES.....	97
3.5. MICROSCOPIA ÓPTICA: PRIMER FILTRADO Y CONCENTRACIÓN.....	99
3.6. SEGUNDO FILTRADO Y CONCENTRACIÓN .....	100
3.7. ANÁLISIS MOLECULAR.....	101
3.7.1. Extracción y purificación de ADN .....	101
3.7.2. PCR a tiempo real: qPCR.....	102
3.7.2.1. Identificación molecular de <i>Giardia intestinalis</i> .....	102
3.7.3. PCR convencional.....	104
3.7.3.1. Caracterización molecular de <i>Giardia intestinalis</i> .....	106
3.7.3.1.1. Glutamato deshidrogenasa .....	107
3.7.3.1.2. $\beta$ -giardina.....	108
3.7.3.2. Identificación y caracterización molecular de <i>Blastocystis</i> sp.....	110
3.7.4. Secuenciación Sanger .....	111
3.7.4.1. <i>Giardia intestinalis</i> .....	113
3.7.4.2. <i>Blastocystis</i> sp.....	114
3.7.5. Estudio de cambios aminoacídicos .....	115
3.7.5.1. Glutamato deshidrogenasa .....	115
3.7.5.2. $\beta$ -giardina .....	117
3.7.6. Análisis filogenético.....	118
3.7.6.1. <i>Blastocystis</i> sp.....	119
3.7.6.2. <i>Giardia intestinalis</i> .....	119
3.7.6.2.1. Glutamato deshidrogenasa .....	119
3.7.6.2.2. $\beta$ -giardina.....	119

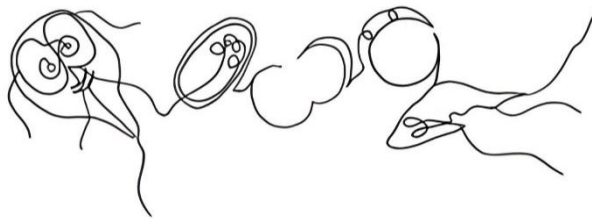
3.8.	RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS .....	120
3.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	121
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>124</b>
4.1.	MUESTRAS Y POBLACIÓN A ESTUDIO .....	126
4.1.2.	Análisis de rutina con microscopía óptica: prevalencia parasitaria .....	126
4.1.2.1.	Coinfecciones .....	127
4.1.3.	Análisis sociodemográfico .....	127
4.1.3.1.	Muestras y población .....	127
4.1.3.2.	<i>Blastocystis</i> sp.....	129
4.1.3.3.	<i>Giardia intestinalis</i> .....	132
4.2.	ANÁLISIS MOLECULAR.....	135
4.2.2.	<i>Blastocystis</i> sp.....	135
4.2.2.1.	Identificación y caracterización molecular: variabilidad genética.....	135
4.2.2.1.1.	Análisis filogenético.....	138
4.2.2.2.	Estudio sociodemográfico según subtipado .....	140
4.2.2.2.1.	Edad y sexo .....	140
4.2.2.2.2.	Movimiento migratorio y movilidad internacional .....	142
4.2.2.2.3.	Distribución geográfica .....	143
4.2.2.3.	Estudio de la clínica asociada según subtipo .....	146
4.2.3.	<i>Giardia intestinalis</i> .....	151
4.2.3.1.	Identificación y caracterización molecular: variabilidad genética.....	151
4.2.3.1.1.	Glutamato deshidrogenasa .....	153
4.2.3.1.1.1.	Análisis filogenético .....	155
4.2.3.1.1.2.	Cambios aminoacídicos .....	157
4.2.3.1.2.	$\beta$ -giardina.....	161
4.2.3.1.2.1.	Análisis filogenético .....	162
4.2.3.1.2.2.	Cambios aminoacídicos .....	164
4.2.3.1.3.	Comparativa Glutamato deshidrogenasa y $\beta$ -giardina .....	167
4.2.3.2.	Estudio sociodemográfico según genotipado .....	168
4.2.3.2.1.	Edad y sexo .....	168
4.2.3.2.2.	Movimiento migratorio y movilidad internacional .....	171
4.2.3.2.3.	Distribución geográfica .....	172
4.2.3.3.	Estudio de la clínica asociada según genotipado .....	174

<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>179</b>
5.1. ANÁLISIS DE RUTINA CON MICROSCOPIA ÓPTICA: PREVALENCIA PARASITARIA Y COINFECCIONES .....	181
5.1.1. <i>Blastocystis</i> sp.....	181
5.1.2. <i>Giardia intestinalis</i> .....	182
5.1.3. Reinfecciones, parasitación crónica y coinfecciones.....	183
5.2. ANÁLISIS SOCIODEMOGRÁFICO.....	185
5.2.1. <i>Blastocystis</i> sp.....	185
5.2.2. <i>Giardia intestinalis</i> .....	186
5.3. ANÁLISIS MOLECULAR.....	188
5.3.2. <i>Blastocystis</i> sp.....	188
5.3.2.1. Identificación y caracterización molecular: variabilidad genética.....	188
5.3.2.1.1. Análisis filogenético.....	192
5.3.2.2. Estudio sociodemográfico según subtipado .....	192
5.3.2.2.1. Edad y sexo .....	192
5.3.2.2.2. Movimiento migratorio y movilidad internacional .....	193
5.3.2.2.3. Distribución geográfica .....	198
5.3.2.3. Estudio de la clínica asociada según subtipado.....	199
5.3.3. <i>Giardia intestinalis</i> .....	205
5.3.3.1. Identificación y caracterización molecular: variabilidad genética.....	205
5.3.3.1.1. Glutamato deshidrogenasa .....	207
5.3.3.1.1.1. Análisis filogenético .....	209
5.3.3.1.1.2. Cambios aminoacídicos .....	210
5.3.3.1.2. $\beta$ -giardina.....	213
5.3.3.1.2.1. Análisis filogenético .....	213
5.3.3.1.2.2. Cambios aminoacídicos.....	214
5.3.3.1.3. Comparativa Glutamato deshidrogenasa y $\beta$ -giardina .....	216
5.3.3.2. Estudio sociodemográfico según genotipado .....	217
5.3.3.2.1. Edad y sexo .....	217
5.3.3.2.2. Movimiento migratorio y movilidad internacional .....	218
5.3.3.2.3. Distribución geográfica .....	220
5.3.3.3. Estudio de la clínica asociada según genotipado .....	220
5.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PROPUESTAS DE FUTURO .....	224
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>226</b>

<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>230</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>298</b>
8.1. ANEXO I. Dictamen del comité de ética.....	300
8.2. ANEXO II: Secuencias de referencia de GenBank empleadas para la caracterización molecular de <i>Giardia intestinalis</i> .....	301
8.2.1. Secuencias <i>gdh</i> .....	301
8.2.2. Secuencias <i>bg</i> .....	302
8.3. ANEXO III: Secuencias de referencia de PUBMLST <i>Blastocystis</i> empleadas para la caracterización molecular de <i>Blastocystis</i> sp. ....	304



# 1. INTRODUCCIÓN





## 1.1. ***BLASTOCYSTIS SP.***

### 1.1.1. Descripción histórica, taxonomía y filogenia

*Blastocystis* sp. es un eucariota unicelular cuyas primeras imágenes datan del año 1849, tomadas en una epidemia de cólera (Swayne, 1849; Salinas & Gonzáles, 2007). Las primeras descripciones se dieron en el inicio de la década de 1910, con su primera identificación en el año 1911 por Alexeieff (Alexeieff, 1911), quien lo clasificó erróneamente como una levadura debido a su apariencia similar en los preparados en frescos al microscopio y la carencia de movilidad, nombrándolo como *Blastocystis enterocola*. Un año después, Brumpt evidenció la presencia de *Blastocystis* sp. en heces humanas y asignó el término *Blastocystis hominis* para describir a los organismos que colonizaban a los humanos, continuando con la creencia de que se trataba de una levadura inocua (Brumpt, 1912). Ya en 1967, Zierdt, basándose en las características morfológicas, fisiológicas y de cultivo de *Blastocystis* sp., propone su reclasificación de levadura a protozoo, agrupándolo en el reino Protista, subreino Protozoa y filo Sarcomastigophora, además de establecer su posible relación con la clínica, comenzando a postularlo como potencialmente patógeno (Zierdt et al., 1967).

Su clasificación como protozoo fue sustentada por diversos autores a lo largo de varios años debido a diferentes características morfológicas que son compatibles con estos organismos, como la presencia de uno o más núcleos, aparato de Golgi, retículo endoplasmático y orgánulos similares a las mitocondrias que están implicados en múltiples vías metabólicas. Su diferenciación con las levaduras se basó en la ausencia de crecimiento en distintos medios de cultivo de hongos, además de demostrar resistencia frente a distintos antifúngicos, pero susceptibilidad a antiprotozoarios (Dunn & Boreham, 1991; Boreham & Stenzel, 1993a; Zierdt et al., 1995).

En el año 1996, cuando se realizaron los primeros análisis moleculares del gen de la subunidad menor del ARN ribosomal (*ssu ADNr*), *Blastocystis* sp. dejó de ser identificado como un protozoo, pasando a reclasificarse en el reino Chromista y filo Stramenopiles (Silberman et al., 1996; Arisue et al., 2002). Se considera el único Stramenopiles capaz de colonizar el lumen gastrointestinal del ser humano (Falcone et al., 2023).

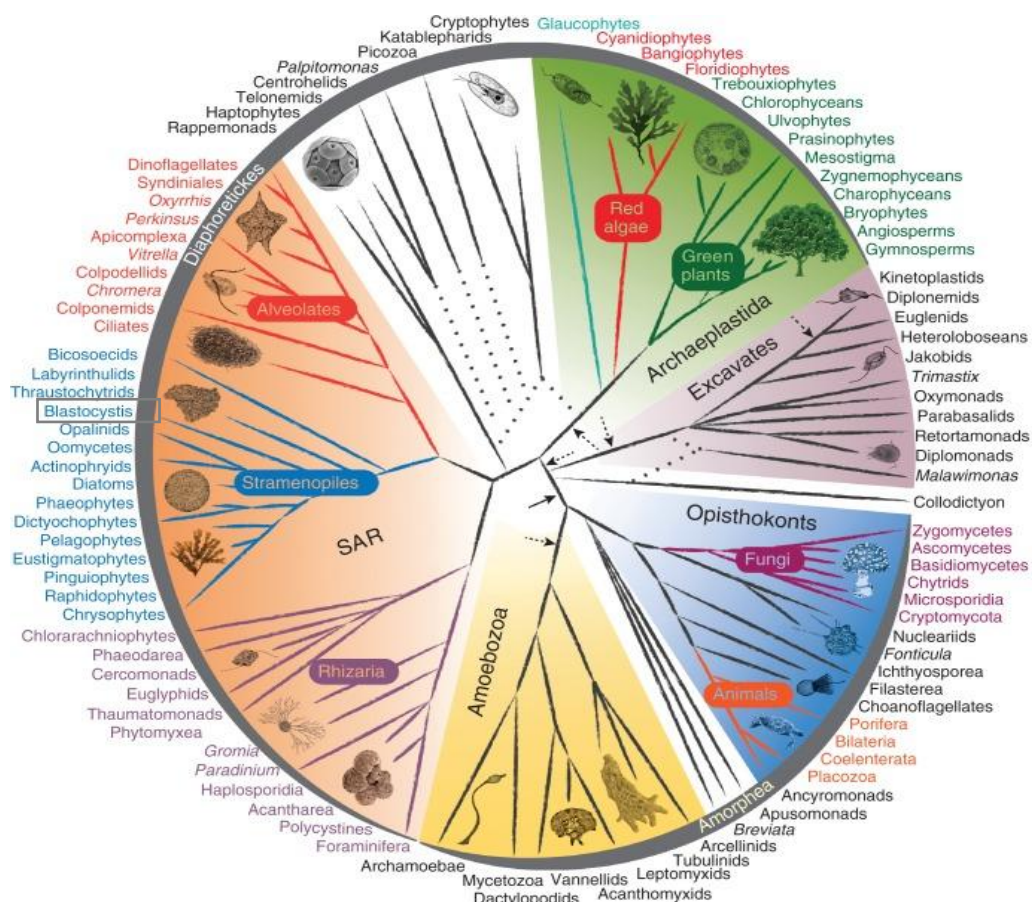
Posteriormente, en 2007, su nomenclatura se modificó, quedando obsoleto el término *Blastocystis hominis* y aceptándose como *Blastocystis* sp., recibiendo la misma denominación todas las especies del género *Blastocystis*, independientemente de su hospedador. Debido a

que *Blastocystis* sp. posee una amplia diversidad genética, la diferenciación de unos organismos de otros se basa en la terminología “subtipos” (ST), nomenclatura válida exclusivamente para los aislados de aves y mamíferos (Salinas & Gonzáles, 2007; Stensvold et al., 2007b).

Actualmente, *Blastocystis* sp. se considera un organismo unicelular anaeróbico cuya taxonomía y clasificación se establece de la siguiente forma (Adl et al., 2019; Stensvold et al., 2020):

- Reino: Protista, Chromista
- Supergrupo: SAR (Harosa) (Stramenopiles, Alveolates y Rhizaria)
- Filo: Stramenopiles
- Clase: Bigyra
- Orden: Opalinata
- Familia: Blastocystidae
- Género: *Blastocystis*
- Especies: no aplica

La relación evolutiva de *Blastocystis* sp. con los diferentes Eucariotas se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Árbol filogenético global de eucariotas (Burki, 2014).

El filo Stramenopiles es un grupo diverso que abarca organismos fotosintéticos unicelulares como las diatomeas, pluricelulares como las algas pardas, y heterótrofos, incluidos parásitos como los oomicetos. Filogenéticamente, comparte el supergrupo SAR con el filo Rhizaria, que incluye foraminíferos y protozoos de vida libre, y el filo Alveolata, integrado por dinoflagelados, ciliados y endoparásitos del grupo Apicomplexa, como los coccidios y *Plasmodium*, patógenos humanos (Adl et al., 2012; Burki, 2014).

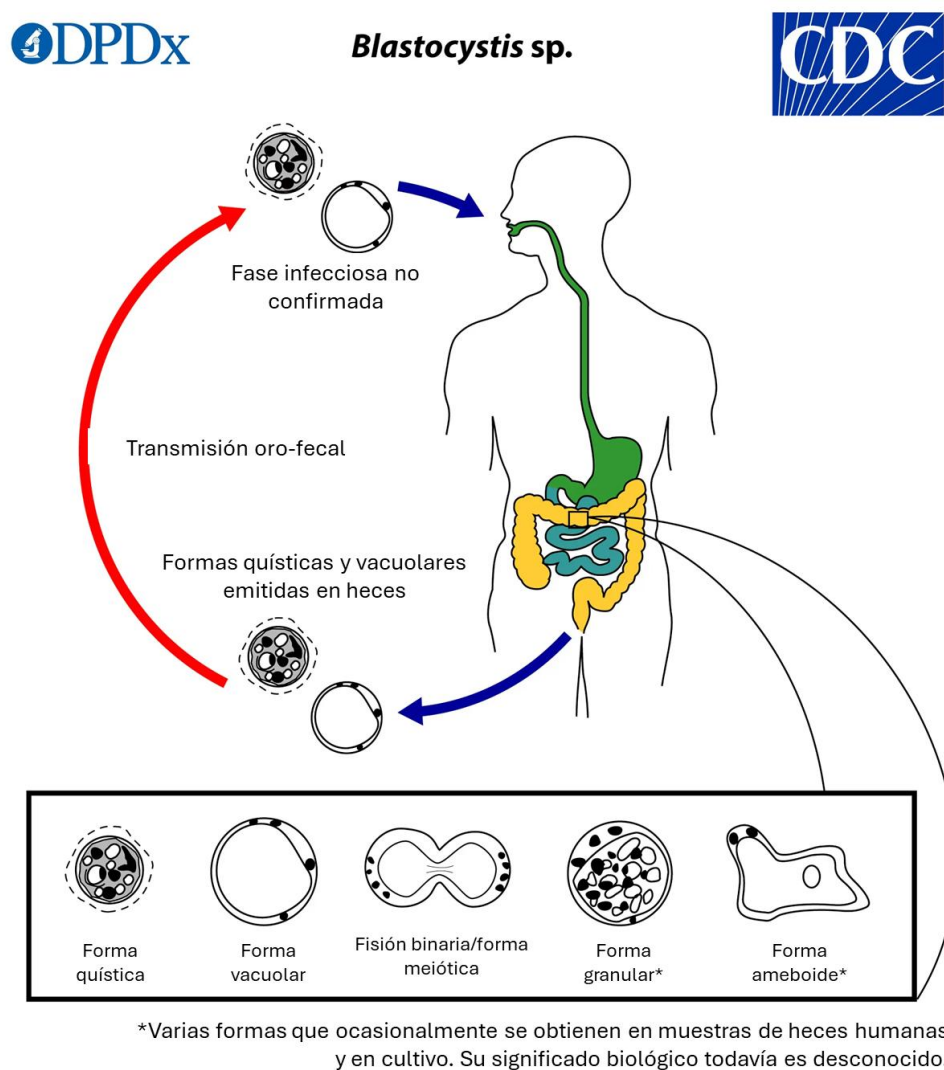
### 1.1.2. Ciclo biológico y mecanismos de transmisión

Hoy en día, todavía no existe consenso sobre el ciclo biológico de *Blastocystis* sp. A pesar de que se han descrito al menos seis etapas del ciclo de vida de este eucariota en heces y cultivos (formas vacuolares, granulares, multivacuolares, avacuolares, ameboides y quísticas) (Stenzel & Boreham, 1996), todavía no se conoce con certeza cuál es la forma infectiva y qué papel desempeña cada una de ellas.

A lo largo de los años se han postulado diversos modos de replicación de *Blastocystis* sp. tales como gemación, plasmotomía, esquizogonia, endodiogonia y fisión binaria (Zierdt, 1991; Singh et al., 1995; Stenzel & Boreham, 1996; Govind et al., 2002). Sin embargo, de todos ellos, la fisión binaria es el proceso de división que más adeptos presenta, ya que es el único claramente demostrable (Tan, 2004). Varios autores sugieren que la forma quística es su forma infectiva (Dunn et al., 1989; Stenzel & Boreham, 1991; Suresh et al., 1993; Singh et al., 1995; Tan, 2004), la cual se ingiere, se desenquista por los jugos gástricos y evoluciona en el intestino grueso a las formas vacuolares que se reproducen por fisión binaria (Tan, 2008; Centro para el Control y Prevención de Enfermedades [CDC], 2019). Posteriormente, antes de ser emitidas al medio exterior por las heces, estas formas vacuolares son capaces de volver a formar quistes como formas de resistencia (Tan, 2008; CDC, 2019); por consiguiente, en heces encontramos predominantemente formas vacuolares y quísticas. Por otro lado, la transición de la forma vacuolar a los otros estadios, todavía no se comprende con precisión. Algunos autores atribuyen a la forma ameboide el rol patogénico de *Blastocystis* sp., asociando su presencia al desarrollo de la sintomatología (Rajamanikam & Govind, 2013; Del Coco et al., 2017; Bahrami et al., 2019), aunque todavía no existe un consenso firme al respecto.

En la Figura 2, se muestra una representación esquemática del proceso de transmisión de *Blastocystis* sp. junto con sus formas predominantes. Como también queda reflejado en esta figura, el principal mecanismo de transmisión de *Blastocystis* sp. es por vía fecal-oral (Wawrzyniak et al., 2013), principalmente indirecta, a través del consumo de alimentos y agua

contaminadas con quistes. Existen numerosos artículos que demuestran la presencia de *Blastocystis* sp. en agua de diferentes procedencias (lagos, ríos, aguas residuales... etc.) y en frutas y verduras (Noradilah et al., 2017; Maritz et al., 2019; Adamska, 2020; Li et al., 2020; Moreno-Mesonero et al., 2022; Bourli et al., 2023; Barrett et al., 2024; Moreno-Mesonero et al., 2024); la ingesta de estos alimentos y de agua no tratada se considera un potencial factor de riesgo para la colonización por *Blastocystis* sp. (Anuar et al., 2013; Attah et al., 2022). Tal es así que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incorporado a este protista en sus Directrices de Calidad del agua potable, remarcando la necesidad del empleo de medios granulares para filtrar el agua, debido al pequeño diámetro de los quistes fecales de *Blastocystis* sp. (2 a 10  $\mu\text{m}$ ), además de informar acerca de su relativa resistencia a la cloración (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2017).



**Figura 2.** Fases emitidas en heces y posibles formas infectantes propuestas entre las principales formas morfológicas descritas de *Blastocystis* sp. (CDC, 2019).

Por otro lado, *Blastocystis* sp. es un protista intestinal que se presenta en una amplia variedad de hospedadores, actuando diversos animales como reservorios, lo que demuestra el potencial zoonótico de este microorganismo (Skotarczak, 2018). La existencia de transmisión entre humanos y otras especies se ha visto reforzada por la mayor incidencia de *Blastocystis* sp. en personas en contacto con animales, en comparación con aquellos que no lo tienen (Rajah et al., 1999; Stensvold et al., 2009c; Parkar et al., 2010; Wang et al., 2014b). Además, estudios moleculares han identificado aislados genéticamente similares presentes tanto en humanos como en animales (Bahrami et al., 2020). En ocasiones, incluso se han observado procesos de transmisión inversa, de humanos a animales, lo que demuestra la gran circulación y adaptabilidad del protista a diferentes especies (Stensvold et al., 2009c; Köster et al., 2022).

Otras vías de transmisión menos estudiadas son la transferencia persona-persona directa por higiene inadecuada (Yoshikawa et al., 2000; Del Coco et al., 2017), o a partir de trasplantes de microbiota fecal, existiendo bibliografía que demuestra la colonización intestinal por *Blastocystis* sp. en receptores (Terveer et al., 2020). A pesar de que no se ha evidenciado la aparición de sintomatología gastrointestinal, ni efecto significativo en los resultados del trasplante tras la adquisición de este protista, la guía Europea de Consenso de Trasplante de Heces recomienda la búsqueda previa de protistas intestinales y clasifica la presencia de *Blastocystis* sp. como posible causa de rechazo (Cammarota et al., 2017). Esta decisión ha sido cuestionada por diferentes autores que apuntan la asociación de *Blastocystis* sp. con una mayor riqueza y diversidad de microbiota, por lo que no consideran que deba influir negativamente en esta práctica (Tito et al., 2019; Piperni et al., 2024).

Por último, el aislamiento y la capacidad de supervivencia de *Blastocystis* sp. en suelos y materia orgánica, sabiendo que los quistes son capaces de sobrevivir durante un mes a temperatura ambiente (Del Coco et al., 2017), también plantea otras posibles rutas desconocidas de transmisión (Jinatham et al., 2021; Ruang-Areerate et al., 2021; Villanueva-Lizama et al., 2024).

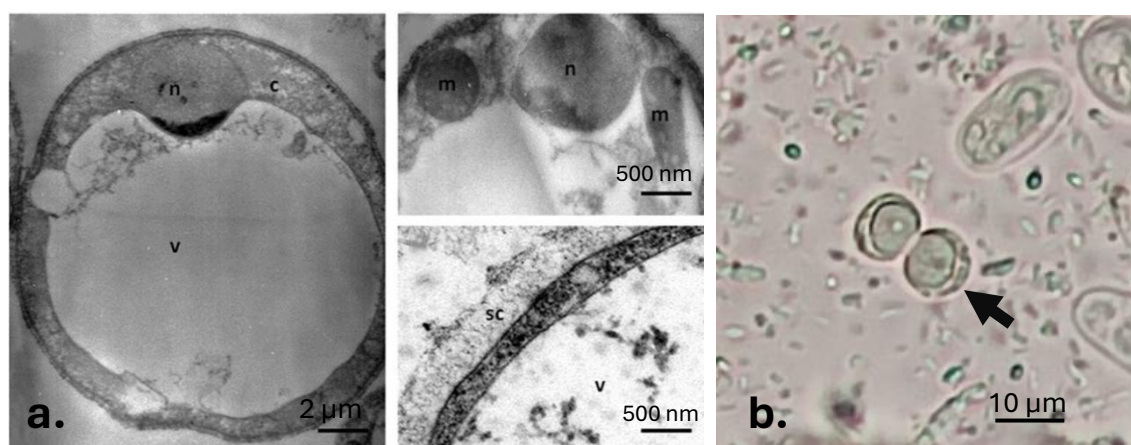
### **1.1.3. Morfología**

*Blastocystis* sp. es un protista polimorfo que puede adoptar diversas morfologías tanto *in vitro* como *in vivo*, las cuales difieren entre sí en forma y en tamaño. Principalmente se han descrito cuatro formas de *Blastocystis* sp.: vacuolar, granular, ameboide y quística, siendo la primera la más frecuentemente observada, tanto en cultivos como en muestras de heces (Tan, 2008; Del Coco et al., 2017).

### 1.1.3.1. Forma vacuolar

Ya en 1967, Zierdt y colaboradores definieron esta forma mediante microscopía óptica (Zierdt et al., 1967), siendo, hasta el momento, considerada como la forma “típica” y característica de *Blastocystis* sp.

Se han descrito tamaños que oscilan entre 2 y 200  $\mu\text{m}$  (Boreham & Stenzel, 1993a), pero su diámetro medio suele encontrarse entre 4 y 15  $\mu\text{m}$  (Stenzel & Boreham, 1996). Esta forma se caracteriza por la presencia de una gran vacuola central que ocupa aproximadamente el 90% del volumen total de la célula, y que contiene hidratos de carbono o lípidos con funciones de reserva, aunque se desconoce la función específica de esta vacuola (Boreham & Stenzel, 1993a; Tan, 2008; Del Coco et al., 2017) (Figura 3). El citoplasma y los orgánulos quedan relegados a un borde periférico delgado, cuya cromatina se suele engrosar donde se ubican los núcleos, típicamente 2 en lados opuestos, aunque podemos encontrar desde 1 hasta 4 núcleos por célula. En el citoplasma también encontramos vacuolas similares a endosomas, aparato de Golgi, microtúbulos y orgánulos similares a mitocondrias (Tan, 2008; Del Coco et al., 2017).



**Figura 3.** Detalles microscópicos de la forma vacuolar de *Blastocystis* sp.

**a.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de la forma vacuolar de *Blastocystis* sp. Bordeando una gran vacuola central (v) se observa una fina banda de citoplasma (c) y un núcleo (n). En una sección más ampliada de la imagen, se muestran orgánulos similares a mitocondrias (m) alrededor de un núcleo (n) y la capa superficial que rodea la célula (sc) (Wawrzyniak et al., 2013).

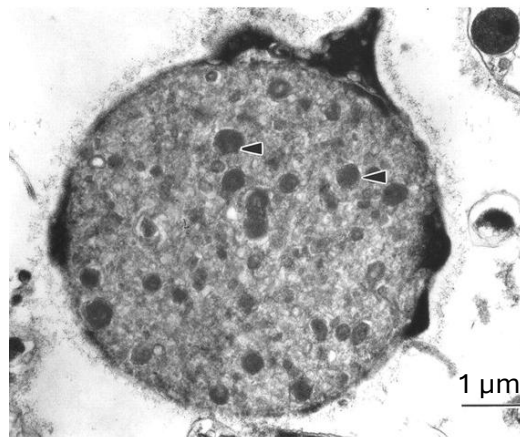
**b.** Imagen propia obtenida por microscopía óptica de heces de humanos donde se observa el proceso de fisión binaria experimentado por la forma vacuolar (flecha).

En algunas ocasiones se puede observar una capa superficial rica en carbohidratos rodeando a las células, denominada capa fibrilar o cápsula, la cual es más gruesa en aislados de heces que

en cultivo. Entre sus funciones se encuentra la nutrición del organismo, facilitando la captura y degradación de bacterias, además de ofrecer protección frente al choque osmótico y actuar como una barrera mecánica (Boreham & Stenzel, 1993a; Tan, 2008).

### 1.1.3.2. Forma granular

La forma granular se observa con mayor frecuencia en cultivos no axenizados envejecidos y tratados con antibióticos (Tan, 2008). Esta forma presenta una morfología muy similar a la vacuolar, difiriendo por la presencia de gránulos, principalmente en la vacuola central, pero también en el citoplasma (Boreham & Stenzel, 1993a) (Figura 4). Encontramos una elevada heterogeneidad bioquímica de los contenidos granulares con funciones todavía desconocidas; algunos autores le atribuyen una función metabólica y reproductiva similar a la esquizogonia, pero existe falta de evidencia científica que lo respalde (Zierdt, 1991; Suresh et al., 1994; Singh et al., 1995).



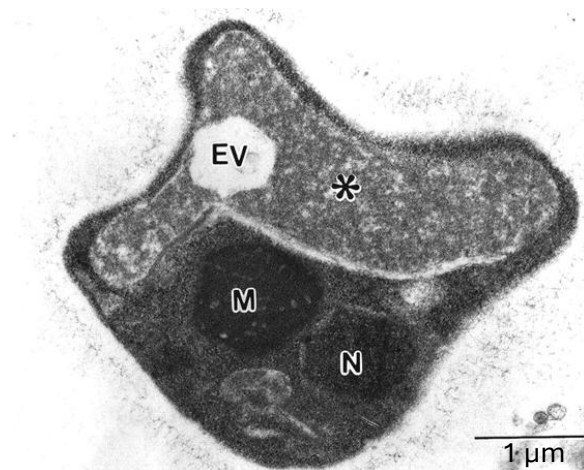
**Figura 4.** Detalles microscópicos de la forma granular de *Blastocystis* sp.

Imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión de la forma granular de *Blastocystis* sp. Se muestran los gránulos densos (puntas de flecha) localizados en la vacuola central (Tan, 2008).

### 1.1.3.3. Forma ameboide

La forma ameboide de *Blastocystis* sp. rara vez se observa en muestras clínicas o en cultivo, y es por lo que su aislamiento en pacientes con síntomas gastrointestinales y dermatológicos ha hecho postularla como posible responsable de la aparición de las manifestaciones clínicas (Zierdt & Tan, 1976; Casero et al., 2015; Velásquez et al., 2022).

Esta forma puede adoptar diversas morfologías y tamaños, presentando un contorno irregular y lobulado, con emisión de prolongaciones similares a pseudópodos, aunque no se ha demostrado que proporcionen motilidad (Boreham & Stenzel, 1993a; Tan, 2008; Del Coco et al., 2017) (Figura 5). En las extensiones citoplasmáticas de los pseudópodos se disponen numerosos cuerpos de inclusión, aparato de Golgi y orgánulos similares a las mitocondrias. Además, se han descrito la existencia de compartimentos similares a lisosomas conteniendo bacterias y detritos (Boreham & Stenzel, 1993a; Tan, 2008).

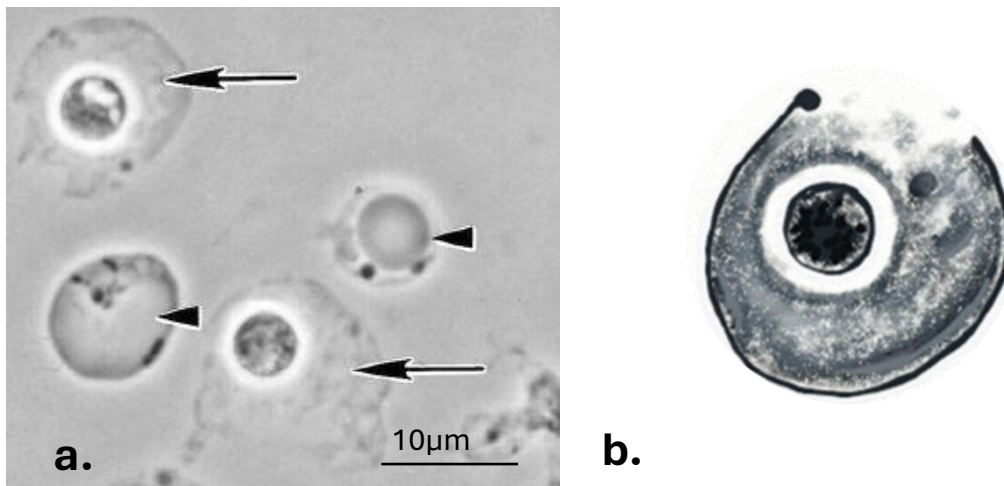


**Figura 5.** Detalles microscópicos de la forma amebioide de *Blastocystis* sp.

Imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión que muestra la forma amebioide de *Blastocystis* sp. De forma irregular, emitiendo extensiones citoplasmáticas similares a pseudópodos, presenta una vacuola central (\*) y vacuola vacía (EV) junto con un núcleo (N) y orgánulos similares a mitocondrias (M) en el citoplasma (Tan, 2008).

#### 1.1.3.4. Forma quística

La forma quística se observa mayoritariamente en materia fecal, siendo infrecuente en los cultivos. Es la forma más pequeña de *Blastocystis* sp., con un tamaño que oscila entre 2-10 µm (Boreham & Stenzel, 1993a; Tan, 2008). En su mayoría presentan una forma ovoide o esférica con un citoplasma condensado y una pared celular gruesa con estructura fibrilar multicapa. En algunas ocasiones se encuentra otra capa superficial exterior morfológicamente similar a la capa superficial descrita en formas vacuolares y granulares (Tan, 2008; Del Coco et al., 2017) (Figura 6). El contenido celular de esta forma quística incluye múltiples vacuolas y depósitos de glucógeno y lípidos (Del Coco et al., 2017).



**Figura 6.** Detalles microscópicos de la forma quística de *Blastocystis* sp.

**a.** *Blastocystis* sp. aislado a partir de cultivo *in vitro* donde se muestran dos formas quísticas con una capa externa suelta (flechas) entre formas vacuolares (puntas de flecha) (Tan, 2008).

**b.** Dibujo propio de forma quística.

Debido a estas características, la forma quística se considera la forma de resistencia de *Blastocystis* sp. en el medio ambiente. Mientras que las formas vacuolares y granulares son sensibles a las condiciones ambientales (Zierdt, 1991), sin capacidad para sobrevivir a cambios de temperatura o la exposición al aire (Boreham & Stenzel, 1993a), los quistes de *Blastocystis* sp. han demostrado permanecer viables 19 días en agua y hasta 1 mes a 25 °C y 2 meses a 4 °C en condiciones ambientales, aunque presentan cierta fragilidad frente a temperaturas extremas y desinfectantes comunes (Moe et al., 1996; Yoshikawa et al., 2004a).

#### 1.1.3.5. Otras formas

Además de las cuatro formas predominantes descritas de *Blastocystis* sp., encontramos otras dos formas que han sido identificadas en algunas ocasiones: forma multivacuolar y forma avacuolar (Stenzel & Boreham, 1996). Ambas han sido encontradas en muestras clínicas de heces y presentan un tamaño inferior a las formas vacuolares típicas (5-8µm). Las formas multivacuolares presentan múltiples vacuolas centrales en lugar de una sola (Boreham et al., 1996; Stenzel & Boreham, 1996), mientras que las formas avacuolares carecen de ella (Boreham & Stenzel, 1993a; Boreham & Stenzel, 1993b).

La visualización de estas morfologías se considera excepcional, siendo interpretadas como fases transitorias en el ciclo de vida de *Blastocystis* sp., intermedias en los procesos de enquistamiento y desenquistamiento (Tan, 2008).

#### 1.1.4. Diversidad genética

*Blastocystis* sp. presenta una elevada diversidad genética expresada mediante subtipos moleculares (ST) que, a pesar de diferir genéticamente, presentan características morfológicas similares entre sí (Del Coco et al., 2017). Además, dentro de los propios ST existen variaciones, reconocidos como alelos (Stensvold & Clark, 2016b). La identificación de estos subtipos y sus alelos se basa, principalmente, en la diversidad del gen codificante de la subunidad menor del ARN ribosómico 18S (*ssu* ADN<sub>r</sub>), donde la mayor parte de los estudios centran la diana genética en una región de  $\approx$  600 pb conocida como “código de barras” (*barcoding*) (Clark et al., 2013; Stensvold & Clark, 2016b).

En el año 2007, se aceptó la nomenclatura de *Blastocystis* sp. y se estableció la existencia de nueve subtipos (ST1-ST9) (Stensvold et al., 2007b). Sin embargo, previo a este año, el estudio de *Blastocystis* sp. se había dado casi exclusivamente en humanos, por lo que la diversidad genética descrita en ese momento era bastante limitada. Una vez que comenzaron a examinarse hospedadores adicionales, se identificaron rápidamente nuevos subtipos, logrando en el año 2013 acumular hasta 17 ST diferentes (Stensvold & Clark, 2020).

Posteriormente, en el año 2017, en un trabajo donde se examinaron muestras fecales recolectadas de 37 especies de animales asilvestrados cautivos en las montañas Qinling (China), incluyendo diferentes aves y mamíferos, se propuso la existencia de cinco nuevos subtipos, ST18-ST22, habiéndose aislado el primero en una alpaca (*Lama pacos*), ST19 en un macaco (*Macaca mulatta*), ST20 en un avestruz (*Struthio camelus*), ST21 en un antílope (*Kobus ellipsiprymnus*) y, el último, ST22, en un guanaco (*Lama guanicoe*) (Zhao et al., 2017). Sin embargo, esta propuesta fue cuestionada por otros autores que argumentaron que cuatro de estas nuevas secuencias (ST18-20 y ST22) eran quimeras. Estas secuencias planteadas como posibles nuevos subtipos coinciden en un porcentaje de identidad elevado ( $\geq 90\%$ ) con diferentes subtipos en cada extremo o, alguno de estos extremos no muestra ninguna similitud con otras secuencias de *Blastocystis* sp., lo que puede identificarse con un producto amplificado de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que combina secuencias de dos dianas de ADN molde distintas, ya sean procedentes de varios subtipos e, incluso, de organismos diferentes (Stensvold & Clark, 2020). Estas características, sumadas a que estos nuevos subtipos han sido reportados en una única ocasión y, en ésta, están representados por una única secuencia, demuestran que no nos encontramos ante verdaderos nuevos subtipos. Por otro lado, el ST21 ha vuelto a ser aislado en otras especies y localizaciones además de en China, como en ganado

vacuno de Estados Unidos (EE. UU.) (Maloney et al., 2019b), lo que apunta a que se trate de un subtipo real.

En el año 2018, en un estudio llevado a cabo en terneras lecheras de 13 estados de EE. UU., se postularon otros cuatro nuevos subtipos, ST23-ST26 (Maloney et al., 2019b), los cuales posteriormente han sido aislados en repetidas ocasiones en diferentes animales (principalmente ganado vacuno y llamas) de distintos países (Norteamérica, Bélgica y Tailandia) (Udonsom et al., 2018; Maloney et al., 2019a; Stensvold & Clark, 2020).

Dos años después, se añadieron los subtipos ST27 y ST28, que habían sido caracterizados de aves (específicamente *Anas querquedula* y *Pavo cristatus*) de Brasil (Maloney et al., 2020a). Durante este año 2020, después de la aparición de los subtipos quiméricos descritos anteriormente, se propusieron directrices específicas para garantizar la correcta identificación de nuevos subtipos; estas incluyen emplear cebadores estándar para la amplificación (Scicluna et al., 2006; Santín et al., 2011), comprobando mediante BLAST cada extremo de las secuencias propuestas, y el posterior estudio de, al menos, el 80% del gen *ssu* ADNr, en lugar de limitarse al "código de barras". Los subtipos potencialmente nuevos deben diferir en  $\geq 4\%$  con respecto a otros subtipos previamente descritos y contar con un análisis filogenético que garantice su exclusión de los clados formados por subtipos ya conocidos (Stensvold & Clark, 2020).

En los últimos años, debido al análisis de una gran variedad de hospedadores alrededor de todo el mundo y al avance en las técnicas de biología molecular, con el incremento del empleo de técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS) y análisis bioinformáticos más complejos, se ha conseguido ampliar el estudio del gen *ssu* ADNr de *Blastocystis* sp. con la obtención de secuencias completas por más grupos de investigación (Maloney et al., 2020b), lo que ha llevado a la identificación en los últimos 4 años (2021-2024) de casi la mitad de todos los subtipos conocidos hoy en día.

En 2021, se consiguieron obtener las secuencias completas de *ssu* ADNr de ST21 y de ST23-ST28 (Maloney & Santin, 2021), corroborando que realmente se trataban de nuevos subtipos. A partir de este año, mediante NGS se han obtenido las secuencias completas de más de 20 subtipos nuevos (ST29-ST49), identificados de diferentes hospedadores y localizaciones de todo el mundo, incluyendo nuevos subtipos capaces de colonizar al humano, como el ST35 que se aisló en dos individuos de Brasil y el ST41 que se obtuvo de un paciente colombiano (Maloney et al., 2022; Hernández-Castro et al., 2023a). En la Tabla 1 se muestran los detalles de hospedadores y países donde se han aislado estos nuevos subtipos.

**Tabla 1.** Nuevos subtipos de *Blastocystis* sp. identificados entre los años 2021 y 2024.

Subtipos	País	Hospedador	Referencia
ST29	Brasil	Gallo ( <i>Gallus gallus</i> )	Maloney et al., 2021a
	Tailandia	Gallo ( <i>Gallus gallus</i> )	Tantrawatpan et al., 2023
ST30	EE.UU.	Venado de cola blanca ( <i>Odocoileus virginianus</i> )	Maloney et al., 2021b
	China	Oveja tibetana	Yang et al., 2023
	Turquía	Perro	Ayan et al., 2024
	China	Camello ( <i>Camelus bactrianus</i> )	Yang et al., 2021
	Portugal	Cabra y oveja	Figueiredo et al., 2024
ST31	EE.UU.	Venado de cola blanca ( <i>Odocoileus virginianus</i> )	Maloney et al., 2021b
	China	Antílope tibetano ( <i>Pantholops hodgsonii</i> )	Yan et al., 2024
ST32	Colombia	Cabra y vaca	Higuera et al., 2021
ST33	Colombia	Caballo	Baek et al., 2022
	China	Asno	Zhang et al., 2024
ST34	Colombia	Caballo	Baek et al., 2022
ST35	Brasil	Humano	Maloney et al., 2022
ST36	México	Murciélago americano ( <i>Sturnira lilium</i> ) y zarigüeya gris ( <i>Philander opossum</i> )	Maloney et al., 2022
ST37	México	Roedores de la familia <i>Heteromyidae</i>	Maloney et al., 2022
ST38	Reino Unido	Rata topera ( <i>Arvicola amphibius</i> )	Maloney et al., 2022
ST39	China	Macaco Rhesus ( <i>Macaca mulatta</i> )	Yu et al., 2023
ST40	Groenlandia	Buey almizclero ( <i>Ovibos moschatus</i> )	Stensvold et al., 2023
	Egipto	Cabra y oveja	Naguib et al., 2024
ST41	Colombia	Humano	Hernández-Castro et al., 2023a
ST42	EE.UU. y Portugal	Ganado vacuno	Santin et al., 2024
	España	Ciervo rojo ( <i>Cervus elaphus</i> )	
ST43	Portugal	Cabras y ovejas	Santin et al., 2024, Figueiredo et al., 2024
	España y Portugal	Jabalí europeo de la península ibérica ( <i>Sus scrofa</i> )	Köster et al., 2024
ST44	EE.UU.	Venado de cola blanca ( <i>Odocoileus virginianus</i> )	Santin et al., 2024, Figueiredo et al., 2024
	Portugal	Cabras y ovejas	
	Groenlandia	Ovejas	
	Egipto	Camellos, cabras y caballos	Naguib et al., 2024
	Francia	Mejillones ( <i>Mytilus edulis</i> )	Ryckman et al., 2024
ST45	Australia	Marsupiales ( <i>Macropus giganteus</i> )	Koehler et al., 2023
ST46	Australia	Marsupiales ( <i>Macropus giganteus</i> y <i>Wallabia bicolor</i> ), ave ( <i>Dromaius novaehollandiae</i> ) y cánidos	Koehler et al., 2023
ST47 y ST48	República Checa	Chimpancé ( <i>Pan troglodytes</i> )	Šejnohová et al., 2024
ST49	España y Portugal	Corzos ( <i>Capreolus capreolus</i> )	Figueiredo et al., 2025

Algunos de estos nuevos subtipos han demostrado una amplia distribución, con capacidad de adaptación en diferentes hospedadores; por ejemplo, ST30 ha sido detectado en diferentes mamíferos de diversas regiones, como en venado de EE.UU. (Maloney et al., 2021b), ovejas tibetanas (Yang et al., 2023), perros de Turquía (Ayan et al., 2024), camellos de China (Yang et al., 2021), o en ovejas y cabras de Portugal (Figueiredo et al., 2024). De forma similar, ST44 se ha observado en diferentes mamíferos de Portugal, EE.UU., Egipto y Groenlandia (Figueiredo et al., 2024; Naguib et al., 2024; Santin et al., 2024), e incluso en mejillones de Francia (Ryckman et al., 2024). Mientras que otros subtipos parecen tener un rango de hospederos más limitado, como ST29 que queda restringido a las aves (Maloney et al., 2021a; Tantrawatpan et al., 2023) o ST33 que únicamente se ha aislado en équidos (Baek et al., 2022; Zhang et al., 2024).

Diferentes autores resaltan la importancia de la dieta y las características morfológicas y funcionales de los tractos gastrointestinales de los hospedadores como clave en los subtipos de *Blastocystis* sp. observados; así, los herbívoros estrictos tienen prevalencias y diversidades genéticas mucho mayores que los carnívoros estrictos, mientras que los omnívoros presentan valores intermedios. Encontramos prevalencias  $\approx$  50% en ungulados salvajes, ganado vacuno y cerdos,  $\approx$  30% en humanos y jabalíes, mientras que estos valores caen significativamente en carnívoros, con, por ejemplo, un  $\approx$  6% y  $\approx$  5% en perros y gatos domésticos, respectivamente (Popruk et al., 2024; Caballero-Gómez et al., 2025; Figueiredo et al., 2025).

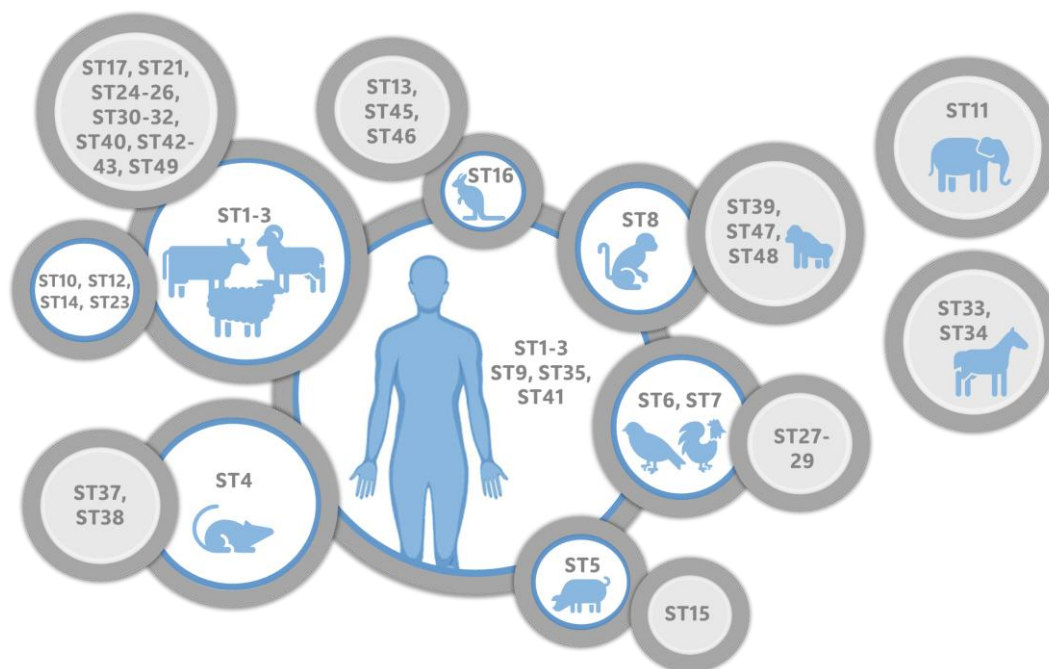
Existe evidencia científica de la afinidad de los diferentes subtipos por unas especies animales u otras. En humanos encontramos que más del 90% de los *Blastocystis* sp. capaces de colonizarnos pertenecen a los subtipos 1, 2, 3 y 4 (Stensvold & Clark, 2020; Popruk et al., 2021), habiéndose detectado hasta 16 subtipos (ST1-10, ST12, ST14, ST16, ST23, ST35 y ST41) en el intestino humano y siendo ST35 y ST41 los únicos subtipos humano-estrictos, sin literatura que demuestre su presencia en ningún otro hospedador (Maloney et al., 2022; Hernández-Castro et al., 2023a), aunque debido a su reciente descubrimiento es posible que en un futuro cercano aparezcan nuevos hospedadores. De forma similar, ST9 parece estar más asociado a los humanos que a cualquier otro animal, con escasos reportes de aislamientos en pollos de Malasia y lémures de China (Ma et al., 2020; Jiménez et al., 2022). De estos 16 subtipos, ST3 es el predominante a nivel mundial en humanos (Alfellani et al., 2013c; Zhang et al., 2020b), seguido por ST1 (Popruk et al., 2021). ST1-3 tienen una distribución cosmopolita, habiéndose encontrado en múltiples mamíferos alrededor del mundo, mientras que otros subtipos capaces de infectar al ser humano parecen tener una mayor especificidad por determinadas especies animales. En general, ST4 es más común en roedores, ST5 en cerdos, ST6–ST7 en aves y ST8 en primates no

humanos (Alfellani et al., 2013a, b, c; Clark et al., 2013, Rehena et al., 2025; Farzam et al., 2025), mientras que ST10, ST12, ST14 y ST23 se encuentran principalmente en ganado vacuno, ovino y otros mamíferos (Rauff-Adedotun et al., 2020; Stensvold & Clark, 2020; Higuera et al., 2021; Shams et al., 2022). Por último, los reportes de ST16 son relativamente escasos hasta la fecha, observándose de forma aislada en humanos y en canguros (Osorio-Pulgarin et al., 2021; Jiménez et al., 2022).

Se considera que la adquisición de ST1-4 en humanos generalmente se debe a una transmisión interhumana (antroponótica), mientras que la del resto de ST aparece principalmente por interacciones entre humanos y animales (Ghafari-Cherati et al., 2024).

En cuanto a los 29 subtipos restantes (ST11, ST13, ST15, ST17, ST21, ST24-34, ST36-40 y ST42-49), han sido detectados en animales diferentes al ser humano de todo el mundo, con distinta predisposición de especie según el subtipo, principalmente mamíferos y aves, pero también en reptiles, anfibios y animales marinos como peces, bivalvos y esponjas (Rudzińska et al., 2022; Sutthikornchai et al., 2024; Ghafari-Cherati et al., 2024).

Los principales hospedadores de todos los subtipos quedan representados en la Figura 7.



**Figura 7.** Distribución de los subtipos de *Blastocystis* sp. según sus principales hospedadores (elaboración propia).

Los subtipos que han sido aislados en el ser humano se muestran con fondo blanco, mientras que los subtipos con fondo gris son exclusivos de animales. Se superponen los subtipos aislados de especies animales relacionadas.

### 1.1.5. Epidemiología y prevalencia

*Blastocystis* sp. se considera un protista ubicuo, estimándose que existen más de mil millones de personas colonizadas en el mundo (Popruk et al., 2021). A pesar de su amplia distribución, su prevalencia varía considerablemente según la zona geográfica, siendo influenciada por factores como las características socioeconómicas y la metodología diagnóstica empleada en su detección. En general, se estima una prevalencia en torno al 20% en países industrializados y puede superar el 50% en los países en vías de desarrollo, llegando a existir estudios en Senegal con valores próximos al 100% en población infantil (El Safadi et al., 2014; Khaled et al., 2020; Popruk et al., 2021).

Los principales factores de riesgo que generan una mayor tasa de individuos con *Blastocystis* sp. en los países en desarrollo se deben a las condiciones socioeconómicas, higiénico-sanitarias y planes de saneamiento deficientes de estos países, lo que implica una higiene personal y comunitaria deficitaria, peor calidad del agua para consumo humano y una mayor exposición a alimentos contaminados (Tan, 2008; Del Coco et al., 2017). En los países industrializados, los malos hábitos higiénicos personales, los viajes a países endémicos, el compromiso inmunitario y la existencia de contacto estrecho con animales, parecen jugar un papel importante en la adquisición de *Blastocystis* sp. (Tan, 2008; Del Coco et al., 2017).

Cabe destacar que las considerables variaciones en cuanto a datos de prevalencia, a veces incluso entre diferentes comunidades de un mismo país, pueden deberse al uso de diferentes métodos de diagnóstico que han demostrado una gran variabilidad en los resultados (Tan, 2008; Bayo et al., 2022; Fernández et al., 2022). En un metaanálisis reciente donde se analizó la prevalencia de *Blastocystis* sp. a nivel mundial, con un estudio en 50 países de 5 continentes, se mostró que la menor variabilidad entre países de un mismo continente se encuentra en Europa (3,5%-27,8%) (Zhang et al., 2020b). Tanto en España, como en otros países como Italia, Reino Unido y Dinamarca, las prevalencias obtenidas mediante microscopía oscilan entre el 6% y el 11% (Windsor et al., 2002; Stensvold et al., 2011; Gabrielli et al., 2020). Sin embargo, estos valores aumentan considerablemente, llegando incluso a triplicarse, en países como Holanda, Luxemburgo, Francia y Dinamarca cuando se emplean técnicas de PCR (Stensvold et al., 2007a; Bart et al., 2013; El Safadi et al., 2016; Moniot et al., 2024).

Las tasas de prevalencia descritas en la literatura dentro del territorio español quedan reflejadas en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Prevalencia de *Blastocystis* sp. en diferentes regiones y poblaciones de España.

Ciudad (Provincia)	Periodo	Población a estudio	Técnica diagnóstica	Prevalencia (%)	Referencia
Varias	1993-1997	Niños/as acogidos Shahrarawis	Microscopía	22,0	Talayero et al., 1998
Barcelona	1999-2005	Pacientes ambulatorios	Microscopía	7,0	González-Moreno et al., 2011
El Ejido (Almería)	2004-2016	Pacientes de Consulta de Medicina Tropical	Microscopía	18,0	Ocaña-Losada et al., 2018
Valencia	2007	Niños/as acogidos Shahrarawis	Microscopía	14,8	Soriano et al., 2011
Álava (País Vasco)	2014	Familias asintomáticas	ssu ADNr PCR convencional	35,2	Paulos et al., 2018
Leganés (Madrid)	2017-2018	Niños/as asintomáticos	ssu ADNr PCR convencional	13,0	Muadica et al., 2020
Zaragoza	2018	Pacientes hospitalarios	Microscopía	5,0	Matovelle et al., 2022
Valencia	2016-2019	Pacientes con TGC	Microscopía	7,8	Cifre, 2021
			ssu ADNr PCR convencional	9,8	
Valencia	2019	Pacientes con malabsorción de fructosa/lactosa	Microscopía	12,6	Trelis et al., 2019
		Individuos sanos		13,4	
Lleida	2019-2021	Pacientes pediátricos	Microscopía	4,8	Bayo et al., 2022
			qPCR <i>Allplex Parasite</i> (Seegene®) *	28,1	
Majadahonda y Las Rozas (Madrid)	2020-2021	Niños/as asintomáticos	ssu ADNr PCR convencional	5,6	Hernández-Castro et al., 2023b
Madrid	No consta	Niños/as asintomáticos	ssu ADNr PCR convencional	10,0	Köster et al., 2021a
Lugo	2021	Pacientes ambulatorios y hospitalarios	Microscopía	8,3	Fernández et al., 2022
			qPCR <i>Allplex Parasite</i> (Seegene®) *	23,0	
Valencia	2022	Pacientes con obesidad mórbida	qPCR <i>Allplex Parasite</i> (Seegene®) *	44,2	Caudet et al., 2022b
Valencia	2022	Reclusos	Microscopía	7,0	Muñoz-Antoli et al., 2023

TGC: Trastornos Gastrointestinales Crónicos; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real; ssu ADNr: gen codificante de la subunidad menor del ARN ribosómico 18S (ssu ARNr); \**Allplex™ GI-Parasite Assay* (Seegene, Seúl, Corea del Sur).

Si analizamos más en profundidad estos datos, observamos ligeras variaciones en los resultados al emplear las mismas técnicas diagnósticas en poblaciones similares de diferentes ciudades y

periodos de tiempo, como en pacientes de Barcelona entre 1999-2005, Zaragoza en 2018 y Lugo en 2021, en las que por microscopía se obtuvieron prevalencias de 7,0%, 5,0% y 8,3%, respectivamente (González-Moreno et al., 2011; Fernández et al., 2022; Matovelle et al., 2022).

Sin embargo, cuando se emplean técnicas de biología molecular estos valores tienden a aumentar. Mediante microscopía se obtiene una prevalencia promedio de  $11,0\% \pm 5,6$  (Talayero et al., 1998; González-Moreno et al., 2011; Soriano et al., 2011; Ocaña-Losada et al., 2018; Trelis et al., 2019; Cifre, 2021; Bayo et al., 2022; Fernández et al., 2022; Matovelle et al., 2022; Muñoz-Antoli et al., 2023), mediante PCR convencional frente a *ssu* ADNr esta cifra asciende hasta  $14,7\% \pm 11,7$  (Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020; Cifre, 2021; Köster et al., 2021a; Hernández-Castro et al., 2023b), y, por último, al emplear PCR a tiempo real (qPCR), se alcanza una prevalencia de  $31,8\% \pm 11,1$ , consiguiendo la mayor sensibilidad de las técnicas a estudio (Bayo et al., 2022; Caudet et al., 2022b; Fernández et al., 2022).

Cabe destacar que aquellos estudios en los que se incluyen individuos procedentes de zonas endémicas, como niños saharawis o pacientes de medicina tropical (principalmente inmigrantes africanos) (Talayero et al., 1998; Soriano et al., 2011; Ocaña-Losada et al., 2018), la prevalencia vuelve a verse enormemente incrementada con respecto a los estudios llevados a cabo en la población local.

En cuanto a la distribución de los subtipos de *Blastocystis* sp. según las regiones geográficas, el subtipo ST3 es el más común a escala global (Alfellani et al., 2013c; Zhang et al., 2020b), con una prevalencia que generalmente supera el 40% en la mayoría de los países (Alfellani et al., 2013c; Nguyen et al., 2023; Flores & Almachi, 2024; Fusaro et al., 2024; Zhao et al., 2024); seguido por ST1, que junto con ST2 también tienen una distribución cosmopolita y representan un promedio a nivel mundial de 10-30% (Alfellani et al., 2013c; Taylor-Orozco et al., 2016; Asghari et al., 2021; Mülayim et al., 2021). En el caso de ST4, nos encontramos con un claro acotamiento geográfico a Europa, con escasos reportes en el resto del mundo (Alfellani et al., 2013c; Clark et al., 2013; Zhang et al., 2020b); su prevalencia media en Europa es  $\approx 20\%$ , mientras que en otros continentes su proporción se encuentra entre menos del 1% y 4% (Rudzińska et al., 2023). Existen estudios en pacientes de Dinamarca, España y Francia donde incluso ST4 se identificó como subtipo predominante, representando el 76%, el 94% y el 63% de los casos, respectivamente (Domínguez-Márquez et al., 2009; Poirier et al., 2011; Stensvold et al., 2011). Por su parte, el subtipo ST6 también presenta una distribución desigual entre continentes; en los estudios europeos presenta prevalencias cercanas al 3% (Menounos et al., 2008; Rene et al., 2009; Poirier et al., 2011; Bart et al., 2013; Safadi et al., 2016; Seyer et al., 2017; El Rudzińska et

al., 2019; Rudzińska et al., 2023) y porcentajes similares encontramos en países de Sudamérica y Norteamérica (Ramírez et al., 2016; Jiménez et al., 2019), mientras que, las mayores tasas han sido informadas en diferentes países de Asia, a destacar Filipinas y Nepal (12,3% y 43,5%, respectivamente) (Clark et al., 2013; Nemati et al., 2021b). No hay ninguna razón obvia que explique que los humanos en Europa puedan estar más expuestos a los roedores y en Asia a las aves, por lo que la transmisión zoonótica de *Blastocystis* sp. parece una explicación poco probable para esta adquisición de subtipos diferentes entre continentes; es posible que otras variables dietéticas, culturales o demográficas sean las responsables, pero hasta el momento no hay consenso científico que las respalde (Clark et al., 2013).

En España, la mayor parte de los estudios identifican al subtipo ST2 como predominante. En términos generales, los subtipos ST2 (33,6% ± 17,5) y ST4 (30,0% ± 27,0) son los más frecuentes en nuestro país, seguidos por ST3 con una prevalencia promedio de 20,7% (±10,5%), ST1 (12,1% ± 9,0), y, muy por detrás, ST6 (1,8% ± 3,4) (Domínguez-Márquez et al., 2009; Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020; Cifre, 2021; Köster et al., 2021a; Hernández-Castro et al., 2023b; Matovelle et al., 2024; Seijas-Pereda et al., 2024).

#### **1.1.6. Patogenicidad y manifestaciones clínicas**

Los principales síntomas que se le atribuyen a la infección por *Blastocystis* sp. en humanos son gastrointestinales, tales como diarrea, náuseas, dolor abdominal y meteorismo (Stensvold et al., 2009b). En algunas ocasiones se han reportado casos de sintomatología digestiva más grave como hemorragia rectal (Lucía et al., 2007), proctosigmoiditis hemorrágica (Yarze, 1996), diarrea sanguinolenta (Janarthanan et al., 2011) y diarrea que desencadena hipoalbuminemia y anasarca (Nassir et al., 2004). Además, también se ha asociado la infección por este parásito con afectaciones extraintestinales como artritis reactiva (Tejera et al., 2012; AlamLih et al., 2020), urticaria crónica (Bahrami et al., 2019) e hipersensibilidad alimentaria (Tuzer et al., 2022).

Más sorprendente es el aislamiento del propio parásito en áreas extraintestinales, como en muestras de líquido esplénico derivadas de un quiste, donde se observó *Blastocystis* sp. por microscopía y se confirmó su aislamiento por PCR y secuenciación (subtipo ST3) (Santos et al., 2014), o en el aspirado de un absceso hepático de un paciente con antecedentes de fiebre, diarrea acuosa y alto título de anticuerpos anti-*Entamoeba histolytica* (Hu et al., 2008), sin existir una explicación concisa de cómo accedió *Blastocystis* sp. a estas localizaciones.

Aun así, la patogenicidad de *Blastocystis* sp. sigue siendo foco de discrepancia, en parte debido a que su prevalencia es similar entre individuos sanos y sintomáticos, y que sus factores de virulencia no están totalmente descritos (Stensvold et al., 2009b; Andersen & Stensvold, 2016; Kumarasamy et al., 2018). La definición de este protista podría ser de patobionte, considerándolo comensal, simbiote y componente normal de la microbiota intestinal, pero con capacidad de adquirir poder patogénico como parásito bajo determinadas condiciones genéticas o ambientales. Entre estas condiciones encontramos determinantes derivados del propio protista y del hospedador (Stensvold et al., 2009b).

En cuanto al protista, se ha propuesto en diversas ocasiones la concentración en heces como factor limitante, asociando la visualización de cinco o más células por campo de 40x en microscopía óptica como una concentración lo suficientemente alta como para provocar sintomatología (Garavelli et al., 1991; Boreham et al., 1996). Existen estudios que demuestran que una carga alta, basada en este método de microscopía, representan un riesgo estadísticamente significativo para el desarrollo de síntomas (Kaya et al., 2007; Seguí et al., 2017). Sin embargo, esta teoría ha quedado obsoleta debido a la ambigüedad de marcar un número exacto de células observadas por microscopía para diferenciar una infección de una colonización (Clark et al., 2013). Bajo una visión más actual, se ha planteado el empleo de los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos en PCR a tiempo real (qPCR) como marcadores para establecer una concentración baja o alta, donde valores de Ct  $\leq 35$  se consideran, muy probablemente, indicativos de una infección activa (Stensvold et al., 2012a). Sin embargo, estudios comparativos de estos valores entre población sana y sintomática no consiguieron establecer ninguna correlación entre la carga y la sintomatología (Poirier et al., 2011; Maas et al., 2014), y otro estudio realizado únicamente en población con diarrea mostró una gran variabilidad en los datos de Ct (12-40) (Stensvold et al., 2012a). Estos resultados junto con la evidencia de que la eliminación de *Blastocystis* sp. en heces es intermitente, con variación de la concentración en cuestión de días (Vennila et al., 1999), complica la posibilidad de establecer relaciones entre la carga del protista y la aparición de síntomas.

Por otro lado, la variante genética de *Blastocystis* sp. ha sido considerada durante años como posible causa de su papel patogénico, asociando esta diferencia de virulencia según el caso, a la presencia de un subtipo u otro. No obstante, encontramos resultados discrepantes en la literatura, con autores que reportan el predominio de determinados subtipos en pacientes sintomáticos, mientras que otros estudios identifican los mismos subtipos en pacientes asintomáticos. Por ejemplo, se ha aislado ST2 en pacientes con diarrea de diferentes partes del

mundo (Vogelberg et al., 2010; Ramírez et al., 2014; Zhao et al., 2024), pero también en personas sanas (Dogruman-Al et al., 2008; Asghari et al., 2021). Además, se ha demostrado la existencia de variaciones fenotípicas dentro de un mismo subtipo (ST3), en diferentes perfiles de individuos, asintomáticos, sintomáticos y con Síndrome del Intestino Irritable (SII) (Ragavan et al., 2014; Sheela et al., 2020; Rajamanikam et al., 2022), lo que posiblemente demuestra que la patogenicidad de *Blastocystis* sp. no está vinculada de forma específica a su subtipo, o al menos, no depende exclusivamente de este factor.

En cuanto al papel del hospedador, se considera que el estado inmunológico y la composición de la microbiota intestinal pueden influir en el desarrollo de síntomas tras la colonización por *Blastocystis* sp. (Stensvold et al., 2009b; Rajamanikam et al., 2023). Ya en el año 1976 se observó que existía diferencia en los síntomas provocados en ratas según fuesen infectadas con parásitos xénicos y axénicos, donde las primeras desarrollaban infecciones con diarrea acuosa, mientras que las segundas se mantenían asintomáticas (Phillips & Zierdt, 1976). Este hallazgo fue uno de los primeros en destacar la importancia del entorno bacteriano en la infección por *Blastocystis* sp.

Se ha observado que las personas con una alimentación saludable a base de vegetales y sin alimentos procesados tienen una mayor probabilidad de ser portadoras de *Blastocystis* sp. (Lepczyńska et al., 2017; Piperni et al., 2024). Por otro lado, se ha comprobado que los lípidos desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la infección, ya que pueden aumentar la capacidad patogénica de *Blastocystis* sp., observándose que, cuanto mayor es el suplemento lipídico externo, mayor es el daño celular infundido por éste (Liao et al., 2023). Los pacientes colonizados y asintomáticos presentan una mayor riqueza y diversidad de microbiota, con un intestino eubiótico rico en géneros bacterianos potencialmente beneficiosos como *Prevotella* y *Ruminococcus* (Gabrielli et al., 2020; Stensvold et al., 2022), mientras que la presencia de *Bacteroides* y otros indicadores de disbiosis, parecen estar inversamente relacionados con la detección de *Blastocystis* sp. (Stensvold & Clark, 2016a; Forsell et al., 2017; Tito et al., 2019; Gabrielli et al., 2020; Antonetti et al., 2024). Se han encontrado individuos portadores del protista durante largos periodos de tiempo, incluso 10 años, sin presentar sintomatología, lo que puede indicar que, en estos pacientes, *Blastocystis* sp. actúa como parte de una microbiota intestinal sana (Scanlan et al., 2014; Tito et al., 2019; De Boer et al., 2020; Gabrielli et al., 2020), e incluso se ha relacionado, en algunas ocasiones, con un perfil metabólico más saludable, reduciendo la incidencia de síndrome metabólico, resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 (Caudet et al., 2022a; Piperni et al., 2024).

A su vez, se ha asociado antagónicamente el subtipo ST4 con el género bacteriano *Bacteroides* (Forsell et al., 2017), demostrando, incluso, su capacidad para inhibir el crecimiento de *Bacteroides vulgatus*, un patógeno común implicado en la disbiosis intestinal (Deng & Tan, 2022). Por otro lado, encontramos un estudio que demuestra la capacidad del subtipo ST7 de disminuir la concentración intestinal de bacterias comensales beneficiosas como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Yason et al., 2019), y otro que expone diferencias en la diversidad microbiana según el subtipo presente, con una correlación negativa entre ST3 y la bacteria *Akkermansia*, la cual ha sido relacionada con la prevención de la obesidad, lo que podría indicar una asociación de este subtipo con un fenotipo de hospedador menos saludable (Tito et al., 2019). Estos resultados muestran la posibilidad de que existan diferentes interacciones según el perfil microbiano y los subtipos presentes, con una posible repercusión en la salud del hospedador.

En resumen, la aparición de síntomas en pacientes infectados por *Blastocystis* sp. parece ser multifactorial, influido por diversos elementos que desencadenan su patogenicidad, lo que provoca que no exista consenso en la literatura al analizar exclusivamente uno de estos factores, debido a la variabilidad interindividual que depende del resto.

#### **1.1.7. Factores de virulencia**

Una vez que *Blastocystis* sp. coloniza el intestino grueso, es capaz de establecerse y dividirse por fisión binaria (Stensvold et al., 2020). Su capacidad para sobrevivir en este ambiente intestinal parece radicar en que es capaz de evadir el sistema inmunitario del hospedador (Stensvold et al., 2009b; Stensvold et al., 2020). *In vitro*, se ha comprobado la capacidad de *Blastocystis* sp. de inhibir la producción de óxido nítrico (NO) mediante regulación negativa de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Mirza et al., 2011). Además, *Blastocystis* sp. puede unirse a la mucina intestinal y secretar proteasas de cisteína (principalmente catepsina B (catB-like) y legumaínas) que degradan IgA (Puthia et al., 2005; Argüello-García et al., 2023), inmunoglobulinas que actúan como la principal defensa inmunitaria en las mucosas al neutralizar patógenos ingeridos y sus toxinas.

Las proteasas de cisteína también provocan la modulación de la respuesta inmunitaria tras la liberación de citoquinas inflamatorias (Long et al., 2001). Por un lado, son capaces de activar el factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), que induce la producción de interleuquina 8 (IL-8) y del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) por parte de las células epiteliales intestinales, lo que desencadena la quimiotaxis de células inflamatorias a la mucosa intestinal (Puthia et al., 2008; Kumarasamy et al., 2018; Argüello-García et al., 2023). Por

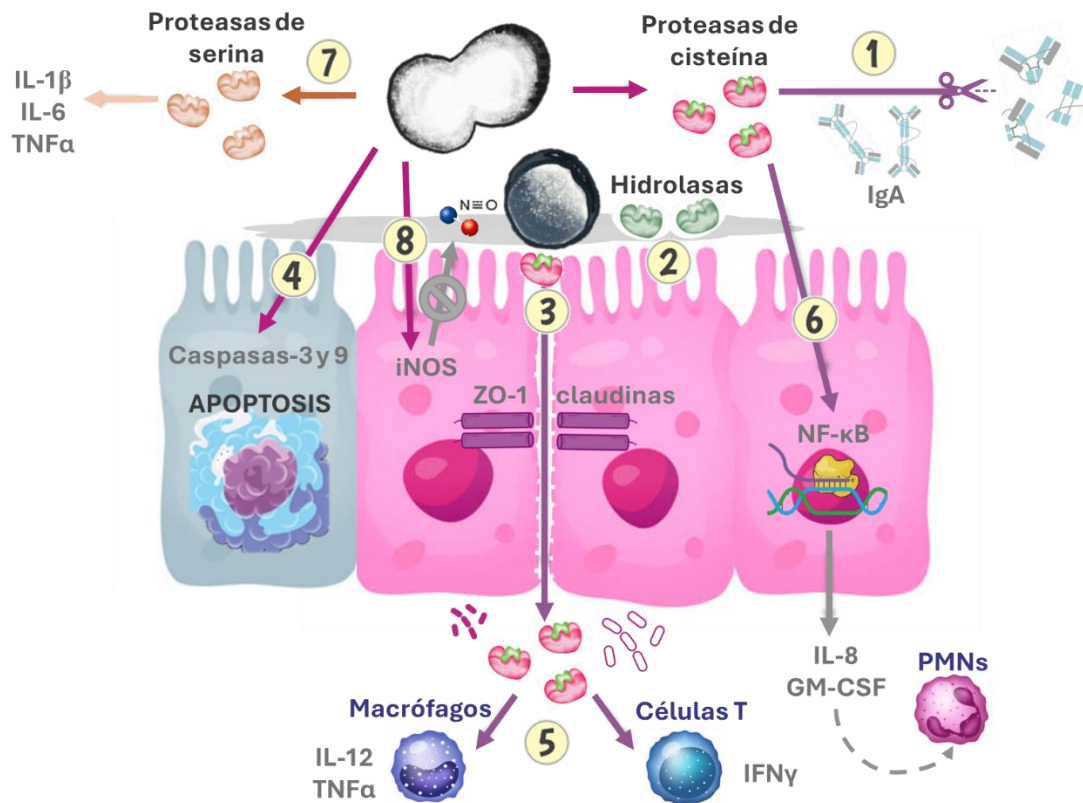
otro lado, en el espacio intraepitelial estas proteasas de cisteína pueden inducir una respuesta inmunitaria tipo 1 mediada por la producción de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) por linfocitos T, y la producción de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) a partir de monocitos y macrófagos (Iguchi et al., 2009), contribuyendo a generar respuestas inflamatorias, así como respuestas locales específicas por parte del hospedador (Argüello-García et al., 2023). Este estado proinflamatorio termina por generar daño tisular y los consiguientes trastornos gastrointestinales que pueden desembocar en síntomas como diarrea y dolor abdominal. Existe evidencia de una mayor producción de proteasas por parte de *Blastocystis* sp. en pacientes sintomáticos con respecto a los asintomáticos (Abdel-Hameed & Hassanin, 2011; Karamati et al., 2021), lo que podría demostrar que estas hidrolasas intervienen en la patogénesis como parásito.

A su vez, estas proteasas de cisteína son capaces de modular la proteína quinasa asociada a Rho epitelial (Rho/ROCK), modificando el citoesqueleto celular, lo que da como resultado la reorganización de las uniones intercelulares estrechas de los enterocitos y la disfunción de la barrera epitelial (Mirza et al., 2012). *In vitro*, se ha comprobado que *Blastocystis* sp. puede provocar cambios en la permeabilidad epitelial intestinal mediante el compromiso de las uniones estrechas de los enterocitos tras adherirse a los espacios intercelulares, generando alteraciones en proteínas como ZO-1 (*zonula occludens*-1) y claudinas (Mirza et al., 2012; Wu et al., 2014; Mohammad Rahimi et al., 2022a). Además, provoca la elongación, reordenamiento y disrupción de filamentos de actina del citoesqueleto de las células epiteliales, lo que induce una disminución significativa de la resistencia transepitelial (TER) con la pérdida de la homeostasis celular y el aumento de permeabilidad de las uniones estrechas, favoreciendo la translocación bacteriana y de toxinas (Puthia et al., 2006; Mirza et al., 2012). Por otro lado, *Blastocystis* sp. también es capaz de inducir la apoptosis de las células intestinales tras activar las caspasas-3 y 9, proteasas implicadas en la muerte celular activa (Puthia et al., 2006; Stensvold et al., 2009b; Wu et al., 2014; Stensvold et al., 2020).

A pesar de que las principales proteasas producidas por *Blastocystis* sp. son de cisteína (Adao & Rivera, 2022; Argüello-García et al., 2023), se han descrito otros tipos de proteasas secretadas por este protista, como proteasas de serina, de ácido aspártico y metaloproteasas (Puthia et al., 2005; Adao & Rivera, 2022). También se ha demostrado la implicación de algunas de estas proteasas en la patogénesis producida por *Blastocystis* sp., como las proteasas de serina de ST7, capaces de inducir en macrófagos de origen murino un aumento de las citoquinas inflamatorias interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleuquina 6 (IL-6) y TNF- $\alpha$  (Lim et al., 2014). Además, se ha

evidenciado la capacidad de ST7 de producir hidrolasas como la fucosidasa, hexosaminidasa y  $\beta$ -galactosidasa, las cuales son capaces de degradar las glicoproteínas de la mucosa intestinal, desprotegiendo al epitelio intestinal que queda al descubierto frente a antígenos del lumen, lo que favorece la aparición de reacciones inflamatorias y alérgicas (Poirier et al., 2012).

El resumen de los principales factores de virulencia se muestra en la Figura 8.



**Figura 8.** Principales factores de virulencia de *Blastocystis sp.* (imagen propia).

Una vez *Blastocystis sp.* accede al intestino grueso, se divide por fisión binaria y produce proteasas de cisteína (CP), las cuales le ayudan a evadir el sistema inmunitario por degradación de IgA del hospedador (1). Este protista es capaz de producir hidrolasas, como la fucosidasa, hexosaminidasa y  $\beta$ -galactosidasa que degradan la mucosa intestinal (2) facilitando la adherencia de *Blastocystis sp.* a las uniones intercelulares, donde pueden liberar CP y degradar proteínas de unión como ZO1 y claudinas, promoviendo una mayor permeabilidad epitelial (3). La alteración de las uniones intercelulares junto con una probable activación de la vía de la caspasa-3, puede dar lugar a la muerte celular programada (apoptosis) (4). Las CP en el compartimento intraepitelial pueden inducir la regulación positiva de las citoquinas proinflamatorias en monocitos/macrófagos (M $\phi$ ) y linfocitos T (5) generando un estado proinflamatorio que se potencia por la inducción de producción de interleuquina 8 (IL-8) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) por parte de los enterocitos, inducidas por las CP vía factor de transcripción nuclear kappa B (NF-kB), lo que desemboca en la quimiotaxis de

neutrófilos y polimorfonucleares (6). Existen otras proteasas producidas por *Blastocystis* sp., como proteasas de serina, que también desembocan en un aumento de citoquinas proinflamatorias (7). Por último, para facilitar la supervivencia de *Blastocystis* sp. en este entorno desfavorable, *in vitro*, se ha comprobado que es capaz de inhibir la producción de óxido nítrico (NO) por parte del hospedador mediante regulación negativa de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (8).

*In vitro*, se ha observado una diferente virulencia, con distinto grado de patogenicidad, en función del subtipo estudiado y del hospedador que infecta. En cuanto a los niveles de proteasas, en *Blastocystis* sp. obtenidos de heces de humanos, se ha encontrado una mayor actividad en ST6 con respecto a ST1, ST2 y ST3, siendo la producción de proteasas por ST2 muy cercana a cero (Karamati et al., 2021), mientras que, en otro estudio, *Blastocystis* sp. ST7 aislado de pacientes mostraron una actividad de proteasa de cisteína aproximadamente dos veces mayor a ST4 obtenido de ratas (Mirza & Tan, 2009).

Se ha demostrado la capacidad de ST4 de producir alteraciones en la permeabilidad intestinal y apoptosis de células epiteliales intestinales derivadas de ratas (IEC-6), (Puthia et al., 2008), sin embargo, en células de adenocarcinoma colorrectal humano (CaCo-2) no parece causar este efecto (Wu et al., 2014), aunque demostró inducir la producción de IL-8 en células epiteliales colónicas humanas T84 (Puthia et al., 2008). Por otro lado, en células CaCo-2, ST7 sí que provoca muerte celular y una alteración de la integridad de las proteínas de uniones intercelulares estrechas ZO-1 produciendo un aumento de la permeabilidad intestinal (Wu et al., 2014). De forma similar, en un modelo celular CaCo-2, *Blastocystis* sp. ST7 provocó la inhibición de la producción de NO, mientras que ST4 no logró hacerlo (Mirza et al., 2011).

La capacidad invasiva de *Blastocystis* sp. se ha confirmado en modelos en animales, hallando niveles elevados de hialuronidasa en orina de ratas infectadas por este protista, lo que sugiere que es capaz de invadir y penetrar en el intestino de este hospedador (Chandramathi et al., 2012), y observando directamente, mediante estudios histológicos, la adherencia de cepas ST1 a la lámina propia del intestino de las ratas, donde genera úlceras y edema de la mucosa (Li et al., 2013). Sin embargo, se desconoce si estos procesos ocurren en humanos *in vivo* (Stensvold et al., 2020).

En conjunto, estas observaciones sugieren que existen diferencias en la virulencia de los subtipos según el hospedador, con diferentes interacciones hospedador-protista durante la colonización e infección, lo que podría modular la producción de distintos factores de virulencia por *Blastocystis* sp., interviniendo en este proceso factores del hospedador propuestos en apartados anteriores, como el microambiente intestinal y la respuesta inmunitaria. Es por ello

que, actualmente, los mecanismos por los que *Blastocystis* sp. produce su patogénesis en humanos no están completamente definidos.

### **1.1.8. Diagnóstico**

#### **1.1.8.1. Cultivo**

El método de referencia o *gold standard* para el diagnóstico de *Blastocystis* sp. es el cultivo xénico, siendo el medio de Jones modificado (medio líquido monofásico) el más comúnmente utilizado (Shaw et al., 2025). Desde que Zierdt y Williams en el año 1974 consiguieran cultivar aislados de *Blastocystis* sp. libres de otros organismos contaminantes (Zierdt & Williams, 1974), se han propuesto numerosos métodos y modificaciones para lograr cultivos axénicos de *Blastocystis* sp. (Mei et al., 2024), considerándose este proceso un reto todavía hoy en día, con únicamente tres subtipos axenizados con éxito hasta la fecha (ST1, ST4 y ST7) (Shaw et al., 2025).

El cultivo presenta una sensibilidad más alta que la microscopía, sin embargo, requiere un mayor tiempo de procesamiento y recursos humanos, ya que es necesario un proceso de incubación, que puede extenderse hasta varios días para alcanzar el crecimiento óptimo del protista (Zierdt & Swan, 1981; Lanuza et al., 1997; Padukone et al., 2018). A su vez, las condiciones de incubación deben garantizar los requerimientos para el correcto aislamiento de *Blastocystis* sp., necesitando de un ambiente anaeróbico con una temperatura de 37 °C (Mei et al., 2024; Shaw et al., 2025). Finalmente, para confirmar los cultivos positivos es necesario combinar esta técnica con otra, como la microscopía óptica.

Debido a estos motivos, el cultivo no suele emplearse en la práctica clínica habitual siendo sustituido por otra metodología más tiempo-eficiente, como la microscopía óptica o técnicas de biología molecular. Sin embargo, los métodos de cultivo son ampliamente utilizados en el ámbito de la investigación, ya que proporcionan microorganismos viables para estudios morfológicos, fisiológicos y genéticos.

#### **1.1.8.2. Microscopía óptica**

A pesar de los avances en métodos de diagnóstico parasitario, todavía, hoy en día, la microscopía óptica sigue siendo el método más empleado en la rutina de los laboratorios. Esta herramienta ha sido empleada durante décadas como único método de diagnóstico y, aunque en muchos laboratorios se han implementado técnicas moleculares para la detección, a

menudo algunos resultados aún requieren confirmación por microscopía, por ejemplo, ante la presencia de inhibidores en heces o sospecha de contaminación cruzada (Ruenchit, 2021).

El principal motivo por el que la microscopía óptica se sigue utilizando e imponiendo sobre el resto de las metodologías en la práctica clínica, es su bajo coste y mínimo equipamiento requerido, especialmente en las regiones económicamente desfavorecidas del mundo, donde el costo de los *kits* moleculares e inmunológicos sigue siendo prohibitivo (Momčilović et al., 2019). Además, se trata de un método más rápido que la técnica de referencia hasta el momento, el cultivo. Por otro lado, las desventajas de la microscopía son su baja especificidad y sensibilidad en comparación con métodos moleculares y con el cultivo, con la necesidad de contar con microscopistas altamente cualificados para evitar resultados erróneos (Yansouni et al., 2014; Ruenchit, 2021).

Para la visualización al microscopio de *Blastocystis* sp. se puede emplear un frotis directo, preparado con la mezcla de una pequeña cantidad de heces y solución salina. Sin embargo, debido a la escasa cantidad de células por muestra empleada en la mezcla, la sensibilidad de esta opción es bastante baja. La técnica de concentración de heces se realiza desde hace varias décadas; ya en 1948, Ritchie describía este método para conseguir recuperar los parásitos a partir de pequeñas cantidades de heces ( $\approx 2 \text{ cm}^3$ ) consiguiendo un aumento en la sensibilidad con respecto a exámenes directos sin concentración (Ritchie, 1948; Young et al., 1979). Las modificaciones añadidas en los últimos años incluyen la adición de filtros que eliminan más artefactos, garantizando una visión más nítida al microscopio, y la sustitución de disolventes orgánicos tóxicos, como el acetato de etilo y el éter, por otros más seguros y que pueden emplearse en técnicas de biología molecular (Tenorio-Abreu et al., 2013; DeBurger et al., 2018).

Además de la visión en fresco, existen tinciones que facilitan la visualización de las diferentes partes de la morfología de *Blastocystis* sp., como la tinción tricrómica modificada, que tiñe de color verdoso el cuerpo central y rojo brillante los cuerpos de inclusión en el citoplasma, o la tinción de yodo, que muestra los núcleos refráctiles al proporcionar un color pardo al glucógeno y citoplasma (Elghareeb et al., 2015).

### **1.1.8.3. Métodos inmunológicos**

Las técnicas inmunológicas disponibles se basan en la detección de antígenos de *Blastocystis* sp. en heces mediante enzimoimmunoensayos (ELISA, Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) y métodos de inmunofluorescencia directa (DFA) o indirecta (IFA). Existen *kits*

comerciales, siendo los más utilizados el *coproELISA™ Blastocystis* (Savyon Diagnostics, Ashdod, Israel), ELISA que cuenta con una mezcla de anticuerpos policlonales de conejo con especificidad para los subtipos de *Blastocystis* sp. ST1, 2, 3 y 5; y el *Blasto-Fluor* (Antibodies Inc., Davis, CA, EE. UU.), técnica de IFA que presenta anticuerpos preparados a partir de antígeno de *Blastocystis* sp. ST3 (Dogruman-Al et al., 2010; Dogruman-Al et al., 2015).

Estas técnicas aportan resultados en apenas una hora, en lugar de los 3 a 4 días necesarios para el cultivo. Además, no necesitan de personal altamente cualificado para identificar *Blastocystis* sp., como ocurre con la microscopía óptica (Dogruman-Al et al., 2010). Algunos autores han evaluado estos *kits* comerciales obteniendo sensibilidades y especificidades próximas  $\approx 90\%$ , muy superiores a las reportadas en microscopía óptica (Dogruman-Al et al., 2010; Dogruman-Al et al., 2015). Sin embargo, debido a que existe un escaso número de estudios que muestren su efectividad, además de que no se ha definido con precisión el rango de subtipos que pueden detectar, actualmente, el uso de métodos inmunológicos para el diagnóstico de *Blastocystis* sp. no se encuentra muy extendido (Stensvold & Clark, 2016a).

#### **1.1.8.4. Biología molecular**

Para la identificación y caracterización molecular de *Blastocystis* sp. se emplean genes ribosomales, incluyendo regiones del espaciador transcrito interno (*Internal Transcribed Spacer, its*) y siendo el marcador de elección el gen codificante del ARN de la subunidad pequeña ribosomal (*ssu ADNr*). El gen *ssu ADNr* es multicopia, lo que proporciona una cantidad de ADN diana inicial lo suficientemente alto como para garantizar una buena sensibilidad de las técnicas de PCR, además, a pesar de ser un gen conservado, presenta regiones hipervariables que permiten la diferenciación tanto de los subtipos como de sus variantes alélicas. El principal inconveniente de esta diana es que debido a que sus secuencias nucleotídicas están relativamente bien conservadas entre especies evolutivamente cercanas, pueden aparecer falsos positivos con amplificaciones inespecíficas, necesitando en algunos casos la confirmación de la identificación por microscopía óptica o secuenciación (Dacal et al., 2020).

La secuencia completa de este gen *ssu ADNr* es de 1800 pb, sin embargo, se han descrito cebadores que engloban regiones de 500-600 pb (conocidas como “códigos de barras”) con secuencias altamente variables que permiten la detección y el análisis filogenético de *Blastocystis* sp. a partir de una única PCR convencional y posterior secuenciación (Sciocluna et al., 2006; Santín et al., 2011; Stensvold & Clark, 2020), de tal forma que, además de para la identificación, estas muestras de ADN también se pueden emplear para el subtipado de

*Blastocystis* sp., lo que permite la evaluación de su diversidad genética (Stensvold & Clark, 2016a).

Encontramos otros tipos de PCR, como las PCR con cebadores dirigidos frente a “Sitios Etiquetados por Secuencia” (*Sequence-Tagged Sites*, STS), secuencias cortas y específicas de un subtipo u otro que permiten, a partir de una única PCR, la tipificación y detección de infecciones mixtas, sin precisar de secuenciación (Yoshikawa et al., 2004b). Sin embargo, se necesitan de cebadores específicos para cada subtipo y ha demostrado una sensibilidad moderada (Stensvold, 2013).

En el año 2008 se presentó la primera PCR semicuantitativa en tiempo real (qPCR) para el diagnóstico de *Blastocystis* sp. Esta qPCR presentaba una sonda FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Förster) que amplificaba una secuencia de 152 pb de una región no caracterizada del genoma de *Blastocystis* sp. ST1, ST3 y ST4 (Jones et al., 2008). Años después, se ampliaron estas dianas abarcando la identificación de ST1 a ST9, con el desarrollo de técnicas de qPCR con sondas *SYBR green* (Poirier et al., 2011) y sondas de hidrólisis *TaqMan* (Stensvold et al., 2012a), con especificidades del 95% y 100%, respectivamente.

En los últimos años, se han desarrollado ensayos de PCR múltiple en tiempo real (qPCR) que permiten la detección simultánea de varios parásitos entéricos, lo que supone una gran ventaja para los laboratorios clínicos, proporcionando rapidez, con una relativa sencillez de manejo y manteniendo la elevada sensibilidad de las técnicas de qPCR (Dacal et al., 2020). Algunos de los kits comerciales más empleados en la práctica clínica son *Allplex™ GI-Parasite Assay* (Seegene, Seúl, Corea del Sur) (Autier et al., 2020), *EasyScreen™ Gastrointestinal Parasite Detection Kit* (Genetic Signatures, Nueva Gales del Sur, Australia) (Stark et al., 2014) y *NanoCHIP® Gastrointestinal Panel* (GIP) (Savyon Diagnostics, Ashdod, Israel) (Ken Dror et al., 2016), todos ellos demostrando una sensibilidad próxima al 100%, muy superior a la microscopía óptica.

Las principales desventajas de estas técnicas de biología molecular son su elevado coste, y la imposibilidad de diferenciar organismos viables de no viables o el estudio de la morfología.

## **1.2. GIARDIA INTESTINALIS**

### **1.2.1. Descripción histórica, taxonomía y filogenia**

*Giardia intestinalis* (también denominada *Giardia lamblia* y *Giardia duodenalis*) es un microorganismo unicelular flagelado descrito por primera vez en 1681 por Antonie van

Leeuwenhoek quien, tras examinar al microscopio sus propias heces diarreicas, identificó organismos móviles que encajaban con la descripción de este enteroparásito (Adam, 2001). Las primeras características morfológicas datan del año 1859, plasmadas por un dibujo realizado por Vilém Dušan Lambl sobre las formas observadas en heces de un niño (Figura 9) (Lipoldová, 2014), denominando a *Giardia* como *Cercomonas intestinalis* (Lipoldová, 2014; Adam, 2001).



**Figura 9.** Primer dibujo de las características microscópicas de *Giardia intestinalis* realizado por Vilém Dušan Lambl en el año 1859 (Lambl, 1859; Lipoldová, 2014).

Después de este año, se han propuestos numerosas nomenclaturas para *G. intestinalis*. En el año 1882, Johann Künstler, tras describir un organismo flagelado en el intestino de renacuajos de anuros, empleó por primera vez el término *Giardia* como nombre de género, en honor a Alfred

Mathieu Giard, zoólogo francés especialista en parasitología. En 1888, Raphael Anatole Émile Blanchard modificó este nombre a *Lambliia intestinalis*, que Charles Wardel Stiles luego renombró como *Giardia intestinalis* en 1902 y *Giardia lamblia* en 1915 para conmemorar el trabajo de Alfred Mathieu Giard y Vilém Dušan Lambl (Lipoldová, 2014; Adam, 2001). Hoy en día, se aceptan las denominaciones *G. lamblia*, *G. intestinalis* o *G. duodenalis* como especie capaz de provocar infección en humanos.

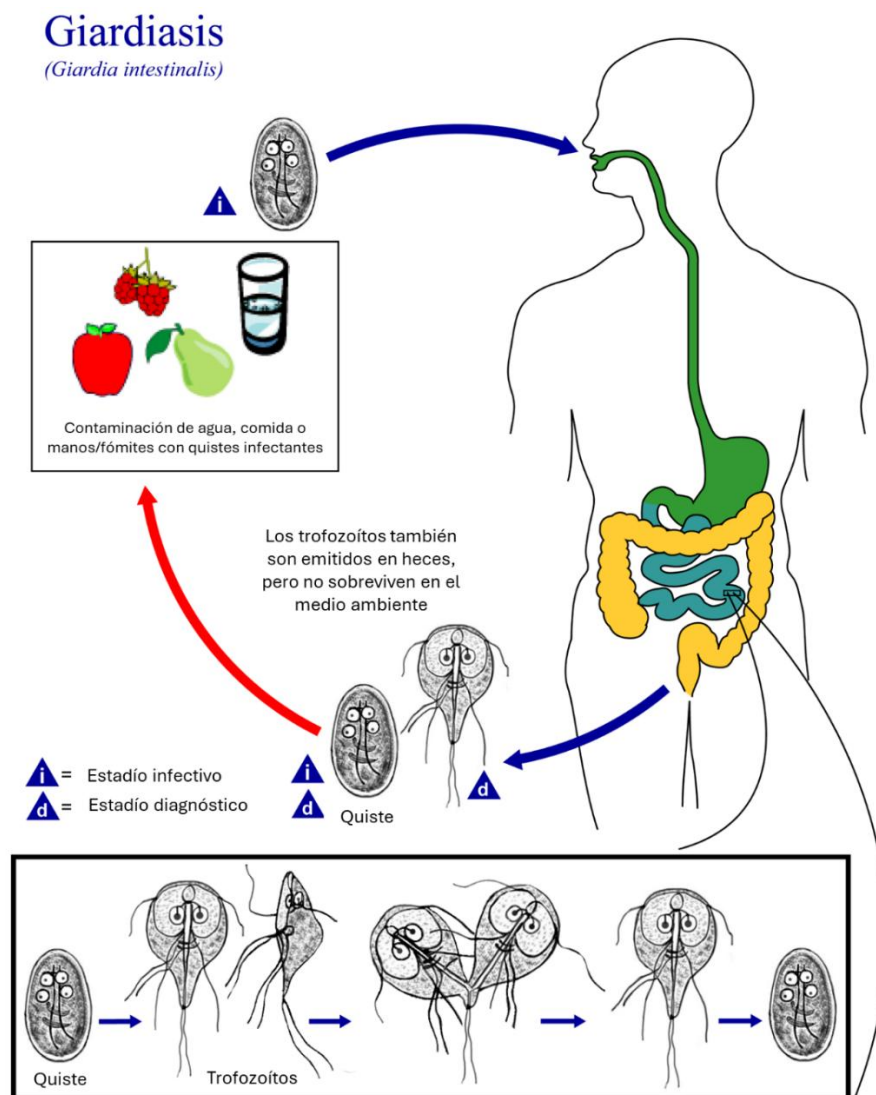
*Giardia intestinalis* se considera un organismo unicelular flagelado y microaerofílico con la siguiente taxonomía y clasificación (Ryan et al., 2021):

- Reino: Protista, Protozoa, Supergrupo Excavata
- Filo: Sarcomastigophora
- Subfilo: Mastigophora
- Clase: Zoomastigophorea
- Orden: Diplomonadida
- Familia: Hexamitidae
- Subfamilia: Giardiinae
- Género: *Giardia*
- Especie: *G. lamblia*, *G. intestinalis* o *G. duodenalis*.

Además de la especie *G. intestinalis*, dentro de este género encontramos otras especies. Previo al año 1952, se llegaron a describir hasta 51 especies erróneas basadas en una equívoca especificidad de cada una de ellas por un hospedador, nombrando por ejemplo *G. equi* en caballos o *G. canis* en perros (Ryan et al., 2021). No fue hasta este año 1952, cuando Francis Patrick Filice consolidó estos nombres en tres especies únicas, *G. intestinalis*, *G. muris* y *G. agilis*, basándose en características morfológicas de los trofozoítos del enteroparásito, específicamente en la forma y disposición de las estructuras microtubulares presentes en los cuerpos medios (Filice, 1952). A partir de este momento se emplearon estos criterios para la clasificación de *Giardia* spp., llegándose a describir hasta siete especies distintas, *G. intestinalis* aislada en mamíferos, incluyendo el ser humano (Lambl, 1859), *G. agilis* en anfibios (Künstler, 1882), *G. varani* en lagartos (*Varanus niloticus*) (Lavie, 1923), *G. ardeae* y *G. psittaci* en aves (Filice, 1952), *G. microti* y *G. muris* en roedores (Filice, 1952). Actualmente, el análisis de secuencias en múltiples *locus* ha permitido un aumento del número de especies descritas, alcanzando un total de nueve identificadas hasta la fecha (Ryan et al., 2021), añadiendo al listado anterior *G. peramelis*, aislado de bandicuts australianos (*Isoodon obesulus*) (Hillman et al., 2016) y *G. cricetidatum* de hámsteres (Lyu et al., 2018).

### 1.2.2. Ciclo biológico y mecanismos de transmisión

*Giardia intestinalis* es un protozoo microaerófilo capaz de colonizar el intestino delgado proximal (duodeno y yeyuno) del ser humano y otras especies de vertebrados, principalmente mamíferos. El ciclo de vida de *G. intestinalis* es monoxeno y consta de dos etapas, quiste como forma infectiva y trofozoíto como forma de reproducción, el cual, aunque también aparece en las heces de los hospedadores infectados, no es capaz de sobrevivir en el medio ambiente (Einarsson et al., 2016; Vivancos et al., 2018; Leung et al., 2019) (Figura 10).



**Figura 10.** Vía de transmisión y formas morfológicas de *Giardia intestinalis* (CDC, 2024).

La vía de transmisión de este parásito es fecal-oral, de forma indirecta tras el consumo de agua o alimentos contaminados con quistes de *Giardia*, o de forma directa por el contacto con personas o animales infectados (Figura 10) (Einarsson et al., 2016; Vivancos et al., 2018; Leung

et al., 2019; Ryan et al., 2021; Centro para el Control y Prevención de Enfermedades [CDC], 2024). En los países industrializados, la vía de transmisión predominante es antroponótica de forma indirecta y, en menor medida, directa. Sin embargo, se han propuesto animales domésticos y salvajes como posibles reservorios, encontrando variantes genéticas de animales en humanos y viceversa, lo que, además, confirma la existencia de transmisión zoonótica inversa (Martínez-Díaz et al., 2011; Dado et al., 2012b; Köster et al., 2021b; Zajackowski et al., 2021; Rego et al., 2023). Solo en los Estados Unidos, entre 1971 y 2011, se notificaron 242 brotes, principalmente debido a la transmisión indirecta por agua (74,8%) y alimentos (15,7%), pero también a la transmisión directa de persona a persona (2,5%) y, en menor medida, al contacto con animales (1,2%) (Adam et al., 2016). En España, el aislamiento de *G. intestinalis* de frutas, verduras y agua de riego, demuestra la contaminación ambiental con un potencial foco de infección humana de forma indirecta (Amorós et al., 2010; Moreno-Mesonero et al., 2022; Trelis et al., 2022; Moreno-Mesonero et al., 2023).

Tras la ingesta de quistes maduros, debido a su exposición con el ácido gástrico, la bilis y proteasas pancreáticas en el duodeno, se produce la disolución de la pared quística liberando excitoítos tetranucleados que se transforman rápidamente en dos trofozoítos móviles binucleados (4n, dos núcleos diploides). Estos trofozoítos son capaces de adherirse a la superficie apical de los enterocitos del intestino delgado (especialmente el duodeno y yeyuno) donde proliferan mediante fisión binaria longitudinal, con un tiempo de duplicación de 9 a 12 horas. La predilección por esta zona del intestino es debido a que este parásito requiere una alta concentración de nutrientes para sobrevivir, principalmente aquellos que no puede sintetizar por sí mismo, como el colesterol, elemento fundamental para la biogénesis de sus membranas y el proceso de enquistamiento. Es durante la etapa de trofozoíto cuando se desencadenan los síntomas clínicos, como resultado del daño producido en la mucosa intestinal (Einarsson et al., 2016; Vivancos et al., 2018; Leung et al., 2019).

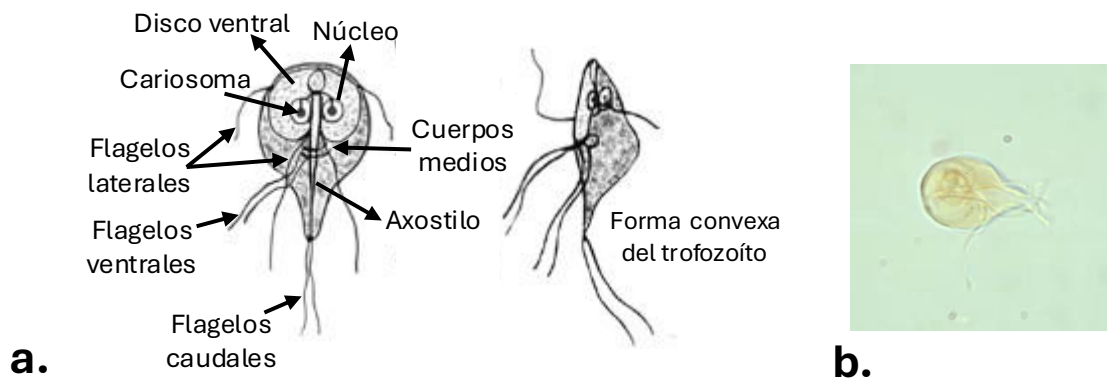
Estos trofozoítos pueden desprenderse de las microvellosidades y avanzar por el intestino hasta el colon, donde se enquistan de nuevo debido a encontrarse en un ambiente desfavorable con escasez de nutrientes. Se produce un desmantelamiento del citoesqueleto del trofozoíto, la célula se redondea y se sintetizan proteínas y azúcares que serán los componentes de la pared quística, acumulándose en vesículas específicas formadas por un sistema similar al aparato de Golgi (Thomas et al., 2021). Durante este proceso se producen dos ciclos de replicación cromosómica y un ciclo de división nuclear, lo que da como resultado un quiste maduro con cuatro núcleos, cada uno de los cuales es 4n (Adam, 2021), con una capa glicoproteica como

pared quística que brinda protección contra los factores ambientales, permitiendo que el parásito sobreviva durante semanas en ambientes húmedos y frescos. Estos quistes pueden ser inmediatamente infecciosos tras excretarse por las heces (Einarsson et al., 2016; Vivancos et al., 2018; Leung et al., 2019).

### 1.2.3. Morfología

#### 1.2.3.1. Trofozoíto

Los trofozoítos de *Giardia intestinalis* tienen morfología piriforme y miden aproximadamente de 12 a 15  $\mu\text{m}$  de largo y de 5 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho (Adam, 2001; Adam, 2021). Se muestran dorsalmente convexos y presentan una concavidad ventral denominada disco ventral que es el orgánulo responsable de la adhesión del parásito al epitelio intestinal. Muestra dos núcleos dispuestos simétricamente en la mitad anterior del parásito, a cada lado de la línea media o axostilo, sin nucléolos, con un gran cariosoma central (Figura 11). Estos núcleos presentan una cantidad muy similar de ADN, siendo prácticamente idénticos y se replican aproximadamente al mismo tiempo (Adam, 2001).



**Figura 11.** Morfología del trofozoíto de *G. intestinalis*.

- a. Se muestra en detalle las partes del trofozoíto de *G. intestinalis* (Modificada de: CDC, 2024).
- b. Trofozoíto de *G. intestinalis* en una preparación en fresco teñida con yodo (CDC, 2024).

El citoesqueleto, compuesto principalmente por heterodímeros de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, incluye los cuerpos medios, cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral) y el disco de succión ventral. Asociados a este citoesqueleto encontramos más de 300 proteínas como la  $\beta$ -giardina, anexinas y quinasas NIMA (NEK). Este citoesqueleto participa en la motilidad, la adhesión al hospedador, el transporte intracelular, la mitosis y la división celular, el enquistamiento y el desenquistamiento del parásito, marcando la transición de la forma

patogénica de trofozoíto a la forma de resistencia y transmisible de quiste (Einarsson et al., 2016; Hagen et al., 2020).

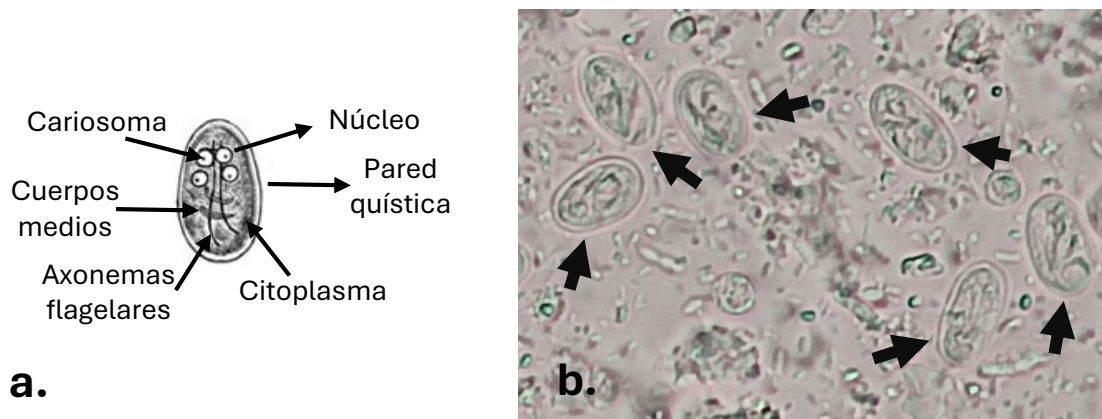
Los flagelos proporcionan la motilidad a los trofozoítos y, además, junto con el disco ventral, los flagelos ventrales parecen intervenir en la adhesión al epitelio intestinal, generando una fuerza hidrodinámica que favorece la succión por parte del disco (Adam, 2021). Estos flagelos pueden ser visibles en preparaciones en fresco (Figura 11).

Los cuerpos medios se localizan debajo de los núcleos, con forma cilíndrica dispuesta transversalmente en el citoplasma, formando una "sonrisa torcida" (Figura 11). Sus funciones son desconocidas, con hipótesis que apuntan a que actúan como reservorios de subunidades de tubulina para la citocinesis, participando en la organización del citoesqueleto (Adam, 2001; Adam, 2021).

En el citoplasma también se encuentran vacuolas lisosomales que contienen hidrolasas, así como gránulos ribosómicos y de glucógeno (Adam, 2001). Aunque estos trofozoítos carecen de algunos orgánulos típicos de las células eucariotas convencionales, presentan otros similares, como el mitosoma (vestigios de mitocondrias) y un sistema de transporte con muchas de las características del aparato de Golgi, que se hace visible en los trofozoítos durante el proceso de enquistamiento, encargado de formar vesículas específicas claves para este proceso (Adam, 2021).

### 1.2.3.2. Quiste

Los quistes de *G. intestinalis* presentan una forma elipsoidal, con un tamaño que oscila entre 7 y 10  $\mu\text{m}$  de longitud y 5 y 8  $\mu\text{m}$  de ancho. Poseen una pared quística de 0,3-0,5  $\mu\text{m}$  de espesor que se observa refráctil bajo microscopía óptica (Figura 12), compuesta de una capa filamentosa externa y una capa membranosa interna (Adam, 2001). Esta pared presenta una estructura fibrilar formada por fibrillas de homopolímero de N-acetilgalactosamina (GalNAc), monosacárido derivado de la glucosa. Este homopolímero contiene enlaces  $\beta$ -1,3, proporcionando una estructura rígida y resistente. Para mantener la integridad estructural, encontramos, al menos, 3 proteínas de la pared del quiste (CWP1, CWP2 y CWP3) compuestas por repeticiones ricas en leucina y una región rica en cistina en su extremo C terminal, que proporcionan la unión a GalNAc y completan la estructura tridimensional de la pared quística (Chatterjee et al., 2010).



**Figura 12.** Morfología del quiste de *G. intestinalis*.

- a.** Se muestran en detalle las partes del quiste de *G. intestinalis* (Modificada de: CDC, 2024).
- b.** Imagen propia obtenida a partir de microscopía óptica de concentrado de heces de humanos donde se observan diversos quistes de *G. intestinalis* (flechas).

En el citoplasma granular se encuentran cuatro núcleos en los quistes maduros y dos en los prequistes o quistes inmaduros, que habitualmente se localizan en un extremo del quiste. El cariosoma nuclear puede tener una posición central o excéntrica. En este citoplasma también encontramos cuerpos medios, axonemas flagelares asociados a dos láminas de microtúbulos, otros microtúbulos que conforman fragmentos del disco ventral del trofozoíto, además de numerosos ribosomas y vacuolas. Sin embargo, no existen mitocondrias, ni aparato de Golgi (Sheffield & Bjorvat, 1977). Varias de estas formas son fácilmente identificables en el microscopio óptico (Figura 12). Los quistes tienen una actividad metabólica equiparable a únicamente el 10-20% de la de los trofozoítos (Adam, 2001; Adam, 2021).

#### 1.2.4. Diversidad genética

Además de las 9 especies del género *Giardia* spp., encontramos diferentes genotipos (*assemblages* en inglés) dentro de la especie *G. intestinalis*. Entre los años 1985 y 1993, mediante análisis de antígenos de superficie y polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del ADN se establecieron cuatro grupos de *G. intestinalis* (Ryan et al., 2021). Posteriormente, en 1999, mediante análisis filogenético analizando cuatro *locus* (fragmentos de los genes que codifican para la enzima Glutamato deshidrogenasa (*gdh*), Triosa fosfato isomerasa (*tpi*), el Factor de elongación 1-alfa (*ef1-α*) y la subunidad menor del ARN ribosómico (*ssu* ADN<sub>r</sub>)) se examinaron las relaciones filogenéticas renombrando a los grupos I y II como genotipo A y los grupos III y IV como genotipo B (Monis et al., 1999). Actualmente, se conocen hasta 8 genotipos diferentes de *G. intestinalis* que presentan cierta especificidad de especie,

incluidos los genotipos C y D aislados principalmente en perros, genotipo E asociado al ganado, F de gatos, G de roedores y H detectado en diferentes animales salvajes como focas y gaviotas (Monis et al., 2009; Adam, 2021; De Pablos & Sotillo, 2021; Ryan et al., 2021).

Prácticamente la totalidad de infecciones de *G. intestinalis* en humanos son causadas por los genotipos A y B (Zajackowski et al., 2021). No obstante, el genotipo E se ha identificado en hasta 50 casos humanos en diversos países alrededor del mundo (Cacciò et al., 2018; Ryan et al., 2021), mientras que los genotipos C, D, F y G se han reportado esporádicamente en humanos (Gelanew et al., 2007; Sprong et al., 2009; Feng & Xiao, 2011; Higuera et al., 2020; Sarria-Guzmán et al., 2022). Por otro lado, aunque los genotipos A y B están asociados a los humanos, también se han encontrado en una gran diversidad de especies animales como otros primates, ganado, perros, gatos, pollos, ungulados salvajes y mesocarnívoros, roedores, marsupiales e incluso mamíferos marinos (Adam, 2021; De Pablos & Sotillo, 2021).

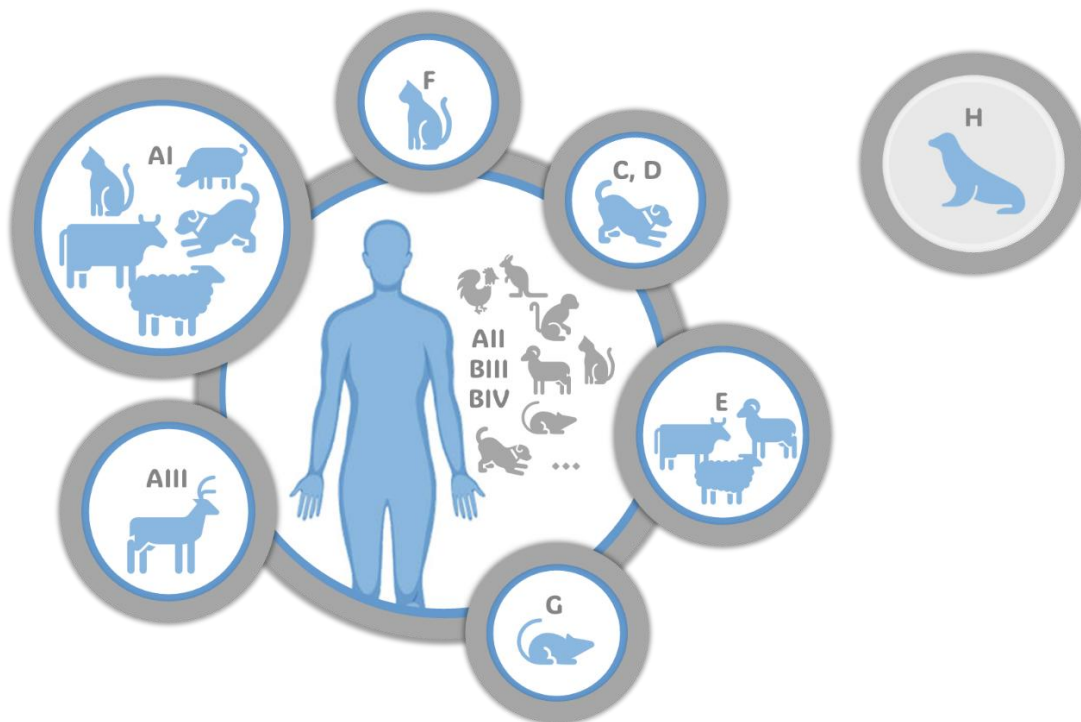
Gracias al avance en el empleo de herramientas de genotipificación y el estudio de múltiples *locus*, como el gen codificante para la proteína  $\beta$ -giardina (*bg*) y las enzimas GDH y TPI (*gdh* y *tpi*), se han encontrado numerosas variantes genéticas dentro de los genotipos, subdividiendo los genotipos A y B en 5 subgenotipos (*subassemblages* en inglés): AI, AII, AIII, BIII y BIV (De Pablos & Sotillo, 2021; Ryan et al., 2021; Zajackowski et al., 2021; Chang et al., 2023).

La identidad de secuencia de nucleótidos entre los genomas de los distintos genotipos varía en función de los genotipos comparados. Curiosamente, existe una mayor diferencia filogenética entre los genotipos humanos, A y B, en los que encontramos una identidad de 77%, que entre estos genotipos humanos y algunos otros genotipos de animales, como entre A y E, en los que esta cifra aumenta hasta un 87% (Jarlström-Hultqvist et al., 2010a; Adam et al., 2013; Cacciò et al., 2018; Adam, 2021); esto repercute en los aminoácidos codificados por cada genotipo, siendo ortólogos conservados el 90% entre el genotipo A y E, y únicamente el 78% entre el genotipo A y B (Cacciò et al., 2018). El genotipo A se encuentra más próximo filogenéticamente a los genotipos E y F, mientras que el genotipo B tiene una mayor relación con los genotipos C y D (Monis et al., 1999; Monis et al., 2009; De Pablos & Sotillo, 2021; Wielinga et al., 2023). Además, al comparar diferentes secuencias de distintos genotipos, se observaron distintos índices de heterogeneidad alélica, siendo, por ejemplo, 10 veces mayor en los genotipos B, C y D que en los genotipos A y E (Cacciò et al., 2018; Kooyman et al., 2019).

Debido a ello, en los últimos años se ha propuesto separar en diferentes especies los distintos genotipos e incluso subgenotipos de *G. intestinalis* que infectan a los humanos, planteando

renombrar el subgenotipo AI como *Giardia duodenalis*, el subgenotipo AII como *Giardia intestinalis* y el genotipo B como *Giardia enterica* (Wielinga et al., 2023), aunque esta nueva clasificación todavía sigue en debate.

Los subgenotipos AII, BIII y BIV se encuentran predominantemente en humanos y mantienen una transmisión antroponótica (Zajackowski et al., 2021), aunque también han sido aislados en otros animales (Monis et al., 2009; Inpankaew et al., 2014; Gil et al., 2017; Zhang et al., 2020a). Por otro lado, el subgenotipo AI es potencialmente zoonótico, aislado con mayor frecuencia en el ganado y mascotas (Sprong et al., 2009). En el caso de AIII, existen reportes episódicos en humanos (De Lucio et al., 2015; Costache et al., 2020; Garcia-R et al., 2021), manteniéndose principalmente restringido a animales rumiantes salvajes (Cacciò et al., 2008; Feng & Xiao, 2011; Zajackowski et al., 2021). La distribución de los hospedadores de los diferentes genotipos/subgenotipos se muestra en la Figura 13 (Monis et al., 2009; Sprong et al., 2009; Lebbad et al., 2010; Reboredo-Fernández et al., 2015; Wielinga et al., 2023).



**Figura 13.** Distribución de los genotipos y subgenotipos de *G. intestinalis* según sus principales hospedadores (elaboración propia).

Los genotipos/subgenotipos que han sido aislados en el ser humano se muestran con fondo blanco, mientras que el genotipo H, con fondo gris, es exclusivo de animales. Se muestran en azul los principales hospedadores a los que se asocia cada genotipo/subgenotipo, mientras que en gris aparecen otros hospedadores secundarios en los que se han aislado.

### 1.2.5. Epidemiología y prevalencia

Se estima que cada año aproximadamente 280 millones de personas en todo el mundo se ven afectadas por *Giardia intestinalis*. La prevalencia oscila entre el 2-7% en los países industrializados y el 20-30% en los países en vías de desarrollo, siendo los más afectados niños/as entre 2 y 12 años (Carmena et al., 2012; Leung et al., 2019; Hajare et al., 2022).

Existen reportes epidemiológicos anuales emitidos por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (*European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)*), en los que se estudia la epidemiología y factores sociodemográficos de los casos de *G. intestinalis* documentados por 22 estados miembros de la Unión Europea (UE), además de Islandia y Noruega. En el último informe emitido en el año 2024, donde se analizan los datos de 2022, se reportaron 10.894 nuevos casos, siendo España el país en el que más casos confirmados se comunicaron (3298), representando el 30,3% del total, con 7,6 casos por cada 100.000 habitantes, únicamente superando esta cifra Luxemburgo (18,9 casos/100.000 habitantes) y Bélgica (13,0 casos/100.000 habitantes) (Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades [ECDC], 2024).

Mientras que en Suecia e Islandia más del 70% de los casos documentados están asociados a viajes fuera del país, en el resto de los países (incluida España) la adquisición del parásito es predominantemente local. Esto respalda la hipótesis planteada en estudios recientes, según la cual una proporción significativa de los casos en países industrializados se debe a una transmisión autóctona influenciada por factores de riesgo locales, dejando atrás la consideración de *G. intestinalis* como un parásito exclusivamente asociado a viajes a países endémicos (Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Zajackowski et al., 2021).

En España, la giardiosis es una enfermedad de declaración obligatoria. Desde el año 2015, la mayor parte de las Comunidades Autónomas (CCAA) han incorporado la detección de *G. intestinalis* en sus circuitos de vigilancia epidemiológica, reportando en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) los casos obtenidos en los servicios de Salud Pública, datos a partir de los cuales se genera cada año un informe epidemiológico sobre la situación de la giardiosis en nuestro país. En total, participan en esta vigilancia quince CCAA y las ciudades autónomas de Ceuta y Melilla. Es importante reseñar que no todas las CCAA notifican regularmente, ya que, aunque existe RENAVE, cada comunidad gestiona la recogida y envío de datos de forma independiente. A esto hay que sumarle la existencia de factores, como casos asintomáticos, que llevan a que los datos oficiales reflejen solo una parte de la prevalencia real,

probablemente más alta de la actualmente reportada (Aparicio & Díaz-Cirujano, 2021). Desde el año 2017 hasta 2019 el número de casos notificados aumentó un 49,5% (2991 casos en 2017, 3566 casos en 2018 y 4361 casos en 2019). Debido a la pandemia por COVID-19, este aumento se detuvo con un retroceso hasta los 1679 casos detectados en 2021. En 2022, fecha del último informe publicado hasta la fecha, se volvió a observar un repunte, alcanzando los 3298 pacientes infectados (Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III [CNE-ISCIII], 2023).

El ligero aumento de casos con los años puede deberse a diversos factores, desde una mayor incidencia de esta parasitosis en nuestro país hasta cambios en la metodología diagnóstica empleada en los laboratorios clínicos, tales como modificaciones en los protocolos de cribado o un incremento del empleo de técnicas con mayor sensibilidad, como la biología molecular.

En distintos estudios llevados a cabo en España se observan grandes diferencias en la prevalencia de *G. intestinalis* según la edad de la población a estudio, la presencia de enfermedades gastrointestinales de base o el uso de diferentes técnicas diagnósticas (Tabla 3).

El empleo de técnicas de biología molecular, específicamente PCR a tiempo real (qPCR), consigue detectar más casos de *G. intestinalis* ( $17,8\% \pm 13,4$ ) que la microscopía ( $6,3\% \pm 4,9$ ). Estos datos muestran una alta desviación estándar lo que podría indicar que la prevalencia varía según la población a estudio. Se reporta un mayor porcentaje de positivos en pacientes con trastornos gastrointestinales crónicos (Cifre, 2021) y en edades pediátricas (Mateo et al., 2014; Muadica et al., 2020; Ara-Montojo et al., 2021; Köster et al., 2021a; Bayo et al., 2022; Hernández-Castro et al., 2023b), con valores homogéneos en estudios llevados a cabo en niños/as asintomáticos de la misma ciudad (Madrid) durante diferentes periodos de tiempo ( $16,1\% \pm 1,9$ ) (Muadica et al., 2020; Köster et al., 2021a; Hernández-Castro et al., 2023b).

Además, cabe destacar que estudios realizados en diferentes regiones entre 1999 y 2013, empleando la microscopía como técnica diagnóstica, encontraron prevalencias similares en pacientes inmigrantes y pacientes españoles (Manzardo et al., 2008; González-Moreno et al., 2011; Cobo et al., 2016), lo que sugiere de nuevo una alta transmisibilidad de este parásito entre la población local. No obstante, no se debe subestimar a *G. intestinalis* como posible etiología en pacientes con enfermedades asociadas a los viajes, ya que estudios de vigilancia en Europa y América del Norte lo posicionan como el protozoo intestinal más relacionado con el turismo, afectando al 3-4% de los retornados sintomáticos (Weitzel et al., 2024). En algunas zonas de España se ha encontrado *G. intestinalis* en un 13,7% de pacientes con diarrea del viajero (Zboromyrska et al., 2014).

**Tabla 3.** Prevalencia de *Giardia intestinalis* en diferentes regiones y poblaciones de España.

Ciudad (Provincia)	Periodo	Población a estudio	Técnica diagnóstica	Prevalencia (%)	Referencia
Madrid	1980-1983	Pacientes ambulatorios y hospitalarios	Microscopía	2,7	Velasco et al., 1984
Barcelona	1999-2005	Pacientes adultos ambulatorios	Microscopía	3,9	González-Moreno et al., 2011
Barcelona	2001-2004	Pacientes inmigrantes de Consulta de Medicina Tropical	Microscopía	5,4	Manzardo et al., 2008
El Ejido (Almería)	2004-2013	Pacientes de Consulta de Medicina Tropical	Microscopía	4,6	Cobo et al., 2016
Álava	2008	Niños/as sintomáticos y asintomáticos	Ag-ELISA ( <i>G. lamblia</i> ) * + ICT ( <i>Crypto-Giardia</i> ) †	3,1	Cardona et al., 2011
Barcelona	2011-2012	Pacientes con diarrea del viajero	qPCR xTAG® GPP ‡	13,7	Zboromyrska et al., 2014
Majadahonda (Madrid)	2013	Niños/as sintomáticos y asintomáticos	Microscopía	15,6	Mateo et al., 2014
Madrid	2014-2017	Pacientes pediátricos	Microscopía + ICT ( <i>Crypto-Giardia</i> ) †	8,4	Ara-Montojo et al., 2021
	2018-2019		Microscopía + qPCR Allplex Parasite (Seegene®) §		
Leganes (Madrid)	2017-2018	Niños/as asintomáticos	ssu ADNr qPCR	17,4	Muadica et al., 2020
Lleida	2019-2021	Pacientes pediátricos	Microscopía	1,6	Bayo et al., 2022
			qPCR Allplex Parasite (Seegene®) §	7,0	
Valencia	2019	Pacientes con malabsorción de fructosa/ lactosa	Microscopía + ELISA indirecto <i>in-house</i> en saliva + ICT <i>Crypto-Giardia-Entamoeba</i>	26,5	Trelis et al., 2019
		Individuos sanos		1,2	
Valencia	2016-2019	Pacientes con TGC	Microscopía	4,4	Cifre, 2021
			ELISA indirecto <i>in-house</i> en saliva (Trelis et al., 2019)	45,8	
			ssu ADNr qPCR	46,8	
Madrid	No consta	Niños/as asintomáticos	ssu ADNr qPCR	14,0	Köster et al., 2021a
Madrid	2020-2021	Niños/as asintomáticos	ssu ADNr qPCR	2,5-31,6 (17,0)	Hernández-Castro et al., 2023b
Valencia	2022	Pacientes con obesidad mórbida	qPCR Allplex Parasite (Seegene®) *	8,7	Caudet et al., 2022b
Valencia	2022	Reclusos	Microscopía	12,0	Muñoz-Antoli et al., 2023

ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas; ICT: Inmuncromatografía; qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real; TGC: Trastorno Gastrointestinal Crónico; \**Giardia lamblia* antigen-ELISA (Novatec Immunodiagnóstica GMMH, Dietzenbach, Alemania); † *Stick Crypto-Giardia* (Operon, Zaragoza, España); ‡ xTAG® *Gastrointestinal Pathogen Panel* (GPP) (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Canada); § Allplex™ *GI-Parasite Assay* (Seegene, Seúl, Corea del Sur); || *Simple Crypto - Giardia-Entamoeba* (Operon, Zaragoza, España).

En cuanto a la distribución de las variantes genéticas de *G. intestinalis*, a nivel global, las infecciones humanas son principalmente causadas por el genotipo B ( $\approx 58\%$  de los casos) seguidas por el genotipo A ( $\approx 37\%$ ) (Einarsson et al., 2016). Más específicamente, el genotipo A parece ser más frecuente en América, mientras que el genotipo B lo es en Europa, África, Sudeste Asiático y Australia/Nueva Zelanda (Wielinga et al., 2023). Los subgenotipos All, BIII y BIV son los más frecuentes en humanos, con predominancia de unos sobre otros según poblaciones y países. Dentro del genotipo B, los subgenotipos BIII y BIV parecen diferir por continentes, encontrando en África una predominancia de BIII, con cifras superiores al 80%, mientras que en Norteamérica BIV es más frecuente, con prevalencias de  $\approx 86\%$ . Sin embargo, en Europa, Latinoamérica y Australia suele haber distribuciones similares entre ambos subgenotipos de B (Sprong et al., 2009; Sarria-Guzmán et al., 2022). Por otro lado, a pesar de que a nivel global el subgenotipo All es más frecuente en humanos que AI, en poblaciones de áreas rurales de Colombia y México, parece imponerse este último, siendo incluso el mayoritario de todos los subgenotipos (García-Cervantes et al., 2017; Sánchez et al., 2017); del mismo modo, en algunos países de Asia y en Australia también se encuentra AI con mayor frecuencia que All (Sprong et al., 2009; Al-Mohammed, 2011; Thakur et al., 2021).

En España, la mayor parte de los estudios posicionan el genotipo B como predominante (Sahagún et al., 2008; Goñi et al., 2010; Mateo et al., 2014; De Lucio et al., 2015; Gabín-García et al., 2017; Wang et al., 2019; Muadica et al., 2020,). El subgenotipo BIV es el más frecuentemente aislado, aunque con una elevada variabilidad entre estudios ( $50,2\% \pm 36,6$ ). Le sigue All con una frecuencia de  $27,9\% \pm 19,8$ , mientras que el resto de subgenotipos presentan valores promedio inferiores al 5% (Mateo et al., 2014; De Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Muadica et al., 2020; Cifre, 2021; Hernández-Castro et al., 2023b).

### **1.2.6. Patogenicidad y manifestaciones clínicas**

La giardiosis puede tener una manifestación clínica muy variable, con pacientes que desarrollan síntomas y otros que permanecen como portadores asintomáticos durante largos periodos de tiempo. La mayoría de las veces la sintomatología aparece 1 o 2 semanas después de la adquisición del parásito, siendo los síntomas más frecuentes la diarrea aguda o crónica, dolor abdominal, flatulencias, náuseas, vómitos y pérdida de peso. A pesar de que algunos pacientes presentan síntomas autolimitados con remisión espontánea, existen otros que desarrollan una enfermedad grave de larga duración que no responde al tratamiento habitual. Es de especial relevancia el aumento de la incidencia de estas giardiosis refractarias en los últimos años, donde muchos autores lo asocian a infecciones adquiridas en países asiáticos, como India (Nabarro et

al., 2015; Muñoz-Gutiérrez et al., 2013). La infección a largo plazo puede desembocar en la aparición de intolerancias a los carbohidratos (principalmente lactosa y fructosa), síndrome del intestino irritable (SII) y fatiga crónica; con autores que demuestran que tras la erradicación del parásito se mejoran estas patologías (Trelis et al., 2019). Además, en niños menores de dos años, incluso en aquellos que no presentan diarrea, pueden surgir complicaciones como malabsorción que deriva en deficiencia de micronutrientes esenciales, como el zinc, hierro o vitamina A, afectando al crecimiento y el desarrollo cognitivo adecuado (Einarsson et al., 2016; Zajaczkowski et al., 2021, Allain & Buret, 2020; Hagen et al., 2024).

*Giardia intestinalis* también puede producir complicaciones extraintestinales mediadas por reacciones inmunológicas, incluyendo patologías oculares y retinianas (Corsi et al., 1998; Turnbull et al., 2013), artritis reactiva (Turner et al., 2021; Zeidler & Hudson, 2021) y alergias cutáneas e intestinales mediadas por inmunoglobulina E (IgE) (Allain & Buret, 2020).

Esta amplia variabilidad en la presentación clínica de la giardiosis viene determinada por factores ambientales, del hospedador y del propio parásito, entre los que encontramos la diversidad genética de *G. intestinalis*, la dieta, el estado nutricional, la microbiota intestinal y el sistema inmunitario del hospedador (Einarsson et al., 2016; Allain & Buret, 2020; Zajaczkowski et al., 2021).

La interacción de *G. intestinalis* con la microbiota bacteriana intestinal es bidireccional. Por un lado, existe microbiota capaz de controlar la colonización y establecimiento de este parásito en el intestino (Singer & Nash, 2000; Allain & Buret, 2020; Fekete et al., 2021), y, por otro, *G. intestinalis* puede modular la diversidad bacteriana.

Modelos *in vivo* de giardiosis han revelado que la suplementación probiótica está asociada con potentes efectos inmunomoduladores, aumentando citoquinas antiinflamatorias e inmunoglobulinas IgA e IgG específicas frente a *Giardia* (Fekete et al., 2021). La interacción de *G. intestinalis* con *Lactobacillus* spp. ha sido estudiada en varias ocasiones, la presencia de ambos en el intestino delgado superior propicia la competencia de los dos microorganismos por los nutrientes disponibles. Además, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la capacidad de varias especies de lactobacilos de ejercer efectos citostáticos y/o citotóxicos contra los trofozoítos de *Giardia*, como el acúmulo de sales biliares desconjugadas o la secreción de bacteriocinas (Fekete et al., 2021). Se ha comprobado que la administración de *Lactobacillus* sp. a ratones antes o durante las infecciones por *Giardia* reducen la gravedad y la duración de la infección

(Goyal & Shukla, 2013), mientras que la colonización por *Giardia* es capaz de disminuir la población intestinal de *Lactobacillus* spp. (Caudet et al., 2022a; Bhatt et al., 2024).

Varios estudios demuestran la remodelación de la microbiota intestinal tras la infección por *G. intestinalis* generando cambios de enterotipos (Toro-Londono et al., 2019; Berry et al., 2020; Mejia et al., 2020; Caudet et al., 2022a). Se ha comprobado que, además de modificar la concentración bacteriana, *Giardia* también puede inducir cambios funcionales en bacterias comensales. En un estudio se observó su capacidad para alterar la expresión de 172 genes en cepas no patógenas de *Escherichia coli* que se habían cultivado con trofozoítos de *G. intestinalis*, lo cual desembocó en la capacidad de esta bacteria de inducir la muerte del nematodo *Caenorhabditis elegans* (Gerbaba et al., 2015).

El estado nutricional y la dieta del hospedador juega un papel importante en las patologías inducidas por *Giardia* (Allain & Buret, 2020). En un modelo murino se encontró que, si se sometían a los ratones a una dieta deficiente en proteínas, el parásito generaba un aumento de ácidos biliares primarios con daño de la barrera intestinal, además de evitar el aumento de peso en comparación con ratones alimentados con una dieta de control (Bhatt et al., 2024). Otro estudio reciente en ratones, también demostró que una dieta rica en grasas aumentaba la carga de trofozoítos de *Giardia*, donde los ácidos grasos ejercieron efectos pro-crecimiento; además, en ratones con esta dieta se provocaba un daño mayor en las células intestinales con alteración del moco y aumento de infiltración por células inflamatorias, junto con una modificación en la abundancia y diversidad de la microbiota, generando un aumento significativo de bacterias pertenecientes a los filos Bacteroides y Verrucomicrobia, y una disminución de bacterias del filo Firmicutes (Allain et al., 2021).

Estas modificaciones producidas en la composición de la microbiota pueden influir en el desarrollo de los síntomas de la giardiosis. Por ejemplo, tras la infección se ha observado una disminución de la abundancia de genes de biosíntesis de vitamina B12 (cobalamina) por parte de la microbiota bacteriana, lo que podría contribuir al deterioro del crecimiento y el desarrollo en los niños/as (Mejia et al., 2020). Además, la suplementación con micronutrientes y oligoelementos en la infancia se ha asociado con una disminución en la frecuencia y gravedad de la diarrea, lo que indica que la intervención dietética podría ser, en parte, una estrategia terapéutica eficaz (Fekete et al., 2021).

Por último, la diversidad genética de *G. intestinalis* también ha sido propuesta como posible factor en el desarrollo de la clínica. La gran diferencia en el genoma de los dos principales

genotipos que infectan a los seres humanos, A y B, implica diferentes repertorios de proteínas, algunas de las cuales actúan como factores de virulencia, como las proteínas variables de superficie (VSP) que cubren vesículas extracelulares (VE), claves para la evasión inmunitaria, y que son completamente diferentes entre ambos genotipos (Ma'ayeh & Brook-Carter, 2012; Cacciò et al., 2018).

Varios son los estudios que establecen el genotipo B con un poder patogénico más evidente que el genotipo A. En jerbos, se ha comprobado que el genotipo B (aislado de referencia GS/E) provoca una infección más prolongada (hasta 42 días) que el subgenotipo AI (aislado WB) (Aggarwal & Nash, 1987). Otro estudio también llevado a cabo en jerbos demuestra que AI (aislado WB) y B (aislado GS/M-83-H7) provocan una patogenicidad mayor que AI y E, generando un daño más extenso en la mucosa y con más infiltración de células inflamatorias, además de producir cargas más altas de trofozoítos durante un período más largo (Bénére et al., 2012). Mientras que, en ratones, el genotipo B (aislado GS/M) fue capaz de colonizar de forma más eficaz y causando signos patológicos más evidentes que el subgenotipo AI (aislado WB) (Solaymani-Mohammadi & Singer, 2011).

Sin embargo, en casos clínicos en humanos existen discrepancias, con literatura que atribuye una clínica más exacerbada al genotipo B (Homan & Mank, 2001; Sahagún et al., 2008; Xiao & Feng, 2017; Wang et al., 2019; Zajackowski et al., 2021), y otros estudios que observan más síntomas gastrointestinales en pacientes parasitados por el genotipo A (Read et al., 2002; Aydin et al., 2004; Zajackowski et al., 2021). Una evaluación robusta de la posible asociación entre genotipos y sintomatología debe de llevarse a cabo mediante estudios de casos/controles con un tamaño muestral suficientemente representativo, siendo estos estudios en la actualidad muy escasos y con resultados dispares, encontrando en algunos casos el genotipo A como predominante en pacientes con diarrea y en otros sin relación entre la clínica y el genotipo (Haque et al., 2009; Messa et al., 2021).

En España, se ha observado el genotipo B como predominante en pacientes hospitalarios (Sahagún et al., 2008; Goñi et al., 2010; De Lucio et al., 2015; Gabín-García et al., 2017), pero también en población asintomática (Muadica et al., 2020), por lo que es evidente que otros factores influyen en el desarrollo de la sintomatología, no exclusivamente la variante genética.

Esta hipótesis se refuerza con las diferencias de virulencia observadas dentro de un mismo subgenotipo. Por ejemplo, algunos aislados del genotipo AI, como NF (obtenido de agua) y S2 (obtenido de ovejas), lograron inducir apoptosis en células epiteliales duodenales humanas

mediante la activación de la caspasa-3; en cambio, otros aislados del mismo subgenotipo AI de origen humano, WB y Portland-1, no mostraron esta capacidad (Chin et al., 2002). De forma similar, un aislado de subgenotipo AI procedente de un perro en Brasil (BHFC1) mostró una multiplicación más rápida de sus trofozoítos en cultivo axénico en comparación con el aislado Portland-1 del mismo subgenotipo; sin embargo, en ratones infectados, BHFC1 presentó una menor tasa de formación de quistes en el intestino delgado (Coelho et al., 2017). Otro estudio en el que se comparaban aislados del subgenotipo AI de humanos sintomáticos (Bris/83/HEPU/106 y Bris/91/HEPU/1279) con un aislado de otro subgenotipo AI en una cacatúa de cresta azufrada (Bris/95/HEPU/2041) demostró en modelos murinos que el aislado aviar era más virulento, generando una mayor carga parasitaria y provocando alteraciones fisiopatológicas más severas, incluyendo una mayor pérdida de peso en los ratones. Además, los animales infectados con la cepa aviar produjeron menores niveles de IgA e IgM anti-*Giardia*, pero mayores niveles de IgA sérica no específica en comparación con los infectados con las cepas humanas, lo que resalta que, además de la variante genética de *G. intestinalis*, el papel del hospedador es crucial en la respuesta inmunológica y la eliminación del parásito (Cacciò et al., 2018).

En resumen, todavía no hay una explicación sencilla de por qué las infecciones por *G. intestinalis* manifiestan síntomas clínicos tan variables, pero los estudios apuntan a que el desarrollo de la enfermedad depende de un proceso multifactorial complejo en el que intervienen características del parásito y del hospedador, además de la interacción entre ambos y con el entorno intestinal.

### **1.2.7. Factores de virulencia**

Los síntomas clínicos aparecen durante la etapa de trofozoíto del parásito. La fisiopatología en la giardiosis se produce en ausencia de invasión de los tejidos intestinales, donde los trofozoítos se localizan sobre la superficie apical de los enterocitos, adhiriéndose a las microvellosidades intestinales a través del disco de succión ventral (Cacciò et al., 2018; Vivancos et al., 2018; Allain & Buret, 2020).

Una vez instalada en el intestino, *Giardia intestinalis* altera la primera defensa del hospedador al escindir la mucina-2 humana (MUC2) mediante proteasas de cisteína (principalmente catepsina B (catB-like)), generando una degradación proteolítica del moco (Allain et al., 2019; Allain & Buret, 2020). Además, los trofozoítos son capaces de inducir hipersecreción de mucina por las células caliciformes, lo que resulta en un agotamiento de la mucina intracelular (Amat et al., 2017), junto con la alteración de la bioquímica de estas mucinas, modificando los patrones de

O-glicosilación que la conforman (Fekete et al., 2024). Se ha comprobado que, aunque coloniza exclusivamente la parte superior del intestino delgado, produce también una reducción del espesor de la capa de moco del colon, lo que implica la existencia de mecanismos independientes del contacto que terminan alterando la barrera mucosa (Allain et al., 2019; Allain & Buret, 2020; Fekete et al., 2024). Estas enzimas también provocan alteraciones en la microbiota del intestino delgado, lo que conduce a un entorno intestinal de disbiosis (Argüello-García et al., 2023).

*Giardia intestinalis* evade el sistema inmunitario del hospedador mediante un proceso de variación antigénica, mecanismo por el que altera sus proteínas de superficie. En este proceso, el trofozoíto es capaz de expresar una única proteína variable de superficie (VSP) de las aproximadamente 150 proteínas que posee, ubicándola en su superficie e intercambiándola por otra mediante cambio antigénico, lo que resulta en la incapacidad del sistema inmunitario del hospedador para detectar y eliminar el parásito (Ma'ayeh & Brook-Carter, 2012; Gargantini et al., 2016; Lagunas-Rangel & Bermúdez-Cruz, 2019). Además, *Giardia* puede escindir directamente moléculas clave del sistema inmunológico producidas por el hospedador, lo que resulta en respuestas inmunitarias atenuadas (Fekete et al., 2021). Las proteasas de cisteína son las principales responsables de este mecanismo, ya que se ha comprobado que pueden degradar inmunoglobulinas, incluidas IgA e IgG anti-*Giardia*, así como las defensinas  $\alpha$ -HD6 y  $\beta$ -HD1 (Liu et al., 2019). Además, también degradan diversas quimioquinas y citoquinas, como quimioquinas de la familia CXC y CC (CXCL1, CXCL2 y CXCL3, CCL2 y CCL20) e interleuquina 8 (IL-8), lo que reduce la infiltración de neutrófilos (Cotton et al., 2014; Liu et al., 2018).

Estas proteasas de cisteína, principalmente la proteasa de tipo papaína caracterizada como Giardipain-1 (Quezada-Lázaro et al., 2022; Argüello-García et al., 2023), pueden inducir una reducción en la resistencia transepitelial (TER) de las células intestinales, provocando apoptosis de las células y afectando a los complejos de unión apicales epiteliales, con reordenación de proteínas de las uniones intercelulares estrechas ZO-1 (*zonula occludens*-1) y claudinas (claudina 1, claudina 4 y ocludina), además de afectar a las proteínas de unión adherente  $\beta$ -catenina y E-cadherina (Einarsson et al., 2016; Liu et al., 2018; Ortega-Pierres et al., 2018). Esto resulta en un aumento de la permeabilidad intestinal, lo que puede desencadenar el acceso de microorganismos, toxinas y moléculas no digeridas hacia el torrente circulatorio con la consiguiente respuesta inmunitaria alterada, mayor riesgo de alergias e intolerancias alimentarias, reacciones autoinmunes (Ej. Artritis reactiva), trastornos digestivos y desequilibrio en la microbiota intestinal.

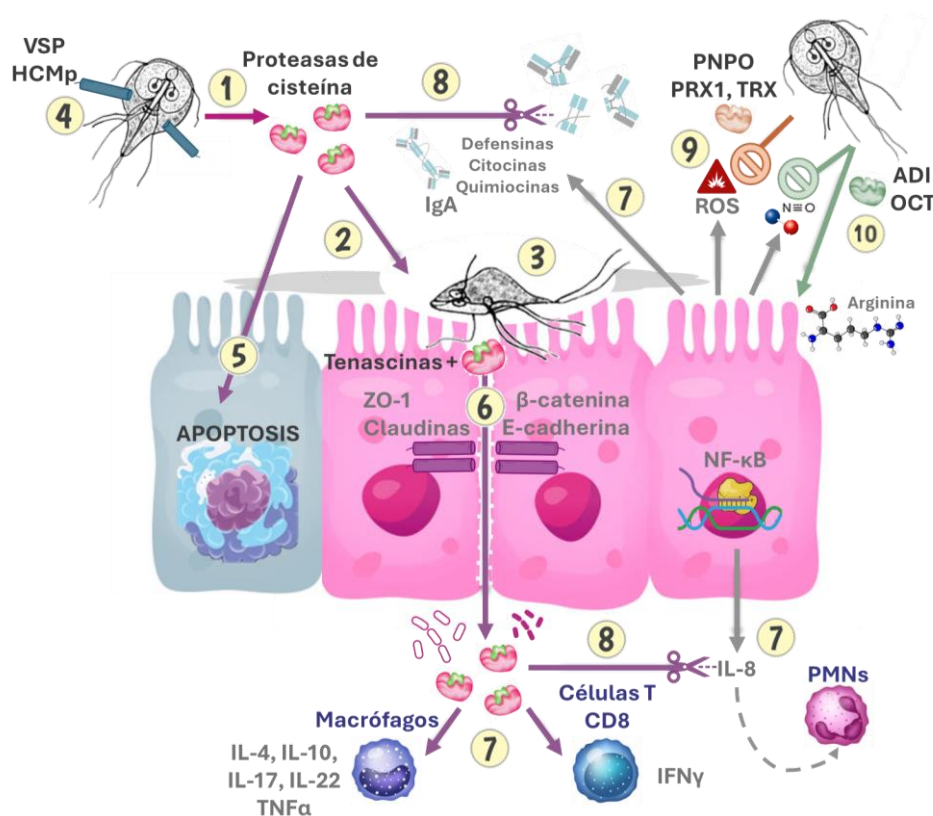
Este aumento de permeabilidad se ve potenciado por la inducción de la respuesta inmunitaria del hospedador tras la infección con el parásito. En primer lugar, se activan mecanismos de defensa independientes de las células B, como la producción de óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS), defensinas y lactoferrinas. También se estimula la quimiotaxis de células inmunitarias, incluyendo fagocitos, mastocitos y células dendríticas (Einarsson et al., 2016). Como resultado, aumenta principalmente la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleuquina 10 (IL-10), así como de interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 13 (IL-13), interleuquina 17 (IL-17), interleuquina 22 (IL-22) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Solaymani-Mohammadi & Singer, 2011; Leung et al., 2019). Además, se produce la infiltración de linfocitos CD8 intraepiteliales y en la lámina propia, generando un ambiente proinflamatorio que causa daño tisular y acortamiento de las microvellosidades del borde en cepillo (Scott et al., 2000). La reducción de la longitud de las microvellosidades disminuye el área de absorción del intestino, lo que resulta en una malabsorción de agua, lípidos, vitaminas liposolubles, carbohidratos y electrolitos como el Na<sup>+</sup> y disacáridos, que, combinada con la hipersecreción de aniones como el Cl, causa distensión intestinal y peristalsis, lo que conduce a la diarrea (Einarsson et al., 2016; Allain & Buret, 2020). La pérdida de función de barrera intestinal es la base de las complicaciones agudas y posinfecciosas asociadas con la infección por *G. intestinalis* (Allain & Buret, 2020). Posteriormente, *Giardia* desencadena la producción de anticuerpos IgA e IgG anti-*Giardia* por parte del hospedador que son los principales responsables de la eliminación del parásito (Einarsson et al., 2016).

Además de las proteasas de cisteína, tras la colonización intestinal, *G. intestinalis* sobreexpresa otras proteínas, como las VSPs y las proteínas de membrana con alto contenido de cisteína (HCMp), las cuales podrían desempeñar un papel en la protección del parásito durante el cambio de VSPs y en condiciones de estrés (Rodríguez-Walker et al., 2022). También se expresan proteínas antioxidantes para combatir el estrés oxidativo generado por el hospedador, como la peroxirredoxina 1 (PRX1), la tiorredoxina (TRX) y la proteína enriquecida piridoxamina 5'-fosfato oxidasa (PNPO); esta última es una enzima dependiente de flavin-mononucleótido (FMN), capaz de fijar el oxígeno molecular, lo que genera un ambiente reductor que favorece el crecimiento de los trofozoítos (Ma'ayeh & Brook-Carter, 2012; Emery et al., 2016; Dubourg et al., 2018).

Además, produce nucleasas extracelulares que degradan la capa externa del moco intestinal, así como tenascinas, glicoproteínas de la matriz extracelular cuya diana es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y que actúan impidiendo la reparación de las uniones intercelulares estrechas dañadas (Dubourg et al., 2018). También se expresan moléculas

similares a toxinas, como CRP136 y ESP58, que inducen la hiperperistalsis intestinal (Ortega-Pierres & Argüello-García, 2019). Finalmente, el protozoo emplea las enzimas metabólicas arginina deiminasa (ADI) y ornitina carbamoil transferasa (OCT) para metabolizar activamente la arginina y obtener energía; este consumo parece contribuir al daño de los enterocitos, al evitar su proliferación celular y reducir la producción de óxido nítrico (NO) por parte del hospedador (Ringqvist et al., 2008; Stadelmann et al., 2012; Einarsson et al., 2016; Ortega-Pierres & Argüello-García, 2019).

Los principales factores de virulencia de *G. intestinalis* se muestran en la Figura 14.



**Figura 14.** Principales factores de virulencia de *G. intestinalis* (elaboración propia).

Los trofozoítos de *G. intestinalis* en el intestino delgado secretan proteasas de cisteína (CP) que interactúan con múltiples dianas (1); degradan la mucina-2 (MUC2) (2) dañando la mucosa intestinal y favoreciendo el acceso de los trofozoítos a las microvellosidades donde se adhieren gracias al disco de succión ventral (3). Los trofozoítos expresan en su membrana proteínas de membrana con alto contenido de cisteína (HCMp) y proteínas variables de superficie (VSP) que modifican mediante un proceso de variación antigénica para evadir el sistema inmunitario (4). Las CP provocan apoptosis de las células intestinales (5) y alteran las proteínas de unión estrecha (ZO-1 y claudinas) y proteínas de unión adherente ( $\beta$ -catenina o E-cadherina) provocando un aumento de la permeabilidad intestinal (6). Este efecto se potencia por las tenascinas, que evitan la recuperación de estas uniones vía receptor del factor de

crecimiento epidérmico (EGF). La respuesta inmunitaria del hospedador incluye la producción de IgA secretada por células B plasmáticas, defensinas, diferentes citoquinas y quimioquinas, producidas por macrófagos, células T y los propios enterocitos, lo que genera un estado proinflamatorio y el acortamiento de las microvellosidades (7). Las CP de *Giardia* pueden degradar estas moléculas del sistema inmunitario provocando una respuesta inmunitaria atenuada frente al parásito (8). Para favorecer la supervivencia y crecimiento de los trofozoítos, *Giardia* combate el estrés oxidativo produciendo moléculas antioxidantes como la tiorredoxina (TRX), peroxirredoxina 1 (PRX1) y la proteína enriquecida piridoxamina 5'-fosfato oxidasa (PNPO) (9). Una de las principales fuentes de energía de *Giardia* es la arginina, la cual obtiene gracias a la expresión de las enzimas metabólicas arginina deiminasa (ADI) y ornitina carbamoil transferasa (OCT), el consumo de este aminoácido evita la proliferación de los enterocitos y reduce la producción de óxido nítrico (NO) (10).

En cuanto a la diferenciación entre los genotipos/subgenotipos que afectan al ser humano, se han identificado diferencias entre genotipos, con distintos genes variables codificantes para VSPs, HCMp, anexinas y proteínas que contienen repeticiones de anquirina, donde, a su vez, el alto nivel de divergencia de secuencia alélica observado en B (aislado GS) provoca que este genotipo pueda generar un número superior (próximo a 2000) de nuevas variantes proteicas en comparación con el subgenotipo A1 (aislado WB) (Cacciò et al., 2018). Ya en el año 1990 se determinó que diferencias en los antígenos de membrana implicaban distintos grados de virulencia (Nash et al., 1990), lo que sugiere que existen diferencias de patogenicidad entre genotipos. Además, se ha observado que la actividad de proteasas de cisteína y de tenascinas caracterizadas en aislados del subgenotipo A1 (WB) es mayor que en el genotipo B (aislado GSM), y el tipo específico de estas proteasas expresadas en un genotipo u otro varían (Dubourg et al., 2018; Allain et al., 2019). Sin embargo, el genotipo B (GS) parece tener una ventaja adaptativa en un ambiente rico en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), evidenciada por una mayor expresión de genes antioxidantes como los codificantes para la PRX1 y TRX (Ma'ayeh et al., 2015; Ma'ayeh et al., 2017), lo que facilita una mayor supervivencia de este genotipo ante el estrés oxidativo.

En conclusión, estos resultados apuntan que ambos genotipos presentan diferencias en sus mecanismos de virulencia. Sin embargo, las discrepancias en los estudios clínicos, que asocian sintomatología a un genotipo u otro según el caso, indican que el impacto de estas variantes genéticas en el desarrollo de la enfermedad puede estar influenciado por otros factores, como la respuesta inmunitaria del hospedador y las condiciones del ambiente intestinal.

### 1.2.8. Diagnóstico

#### 1.2.8.1. Cultivo

*Giardia* es un organismo exigente cuyos trofozoítos son sensibles al oxígeno, requiere de un ambiente microaerófilo o anaeróbico para su crecimiento en cultivo (Davids & Gillin, 2011). El primer cultivo axénico logrado de *Giardia* data del año 1970, donde Meyer consiguió preparar un medio basado en suero humano y extractos de embrión de pollo (Meyer, 1970). Posteriormente, en 1978, Diamond y colaboradores desarrollaron el medio “TYI-S-33” para el cultivo de especies de *Entamoeba* y *Trichomonas* (Diamond et al., 1978), que, tras modificaciones y mejoras, sería la base para el cultivo actual de *Giardia*. La incubación en este medio necesita de 24 a 48 horas antes de obtener un crecimiento exponencial de los trofozoítos, y para mantener la viabilidad del parásito, debe subcultivarse dos veces por semana a una temperatura de 37°C (Davids & Gillin, 2011).

El tiempo y material necesario ha relegado esta técnica al ámbito de la investigación, con el fin de reproducir el ciclo de vida *in vitro*, estudiar la expresión de factores de virulencia y los procesos de enquistamiento y desenquistamiento, entre otras finalidades.

#### 1.2.8.2. Microscopía óptica

La microscopía óptica continúa siendo el método de referencia para el diagnóstico de *G. intestinalis* en el ámbito clínico. Su bajo costo y la rapidez en la obtención de resultados, la convierten en una técnica altamente accesible, especialmente en países en desarrollo, donde los métodos serológicos y de biología molecular suelen estar fuera del alcance debido a su elevado coste.

Sin embargo, se requiere de microscopistas experimentados para evitar obtener resultados erróneos. Además, como consecuencia de la naturaleza intermitente de la excreción de los quistes en heces, se estima que la sensibilidad de esta técnica radica en torno al 40% cuando se evalúa una sola muestra, y hasta un 85% cuando se estudian tres muestras, preferiblemente obtenidas en días alternos (El-Nahas et al., 2013; Trelis et al., 2019), lo que hace que en los últimos años se esté suplantando por técnicas más sensibles, como métodos de biología molecular.

El análisis en el microscopio de los quistes o trofozoítos se basa en frotis de heces procesadas previamente mediante técnicas de concentración fijadas con formalina-acetato de etilo u otro

conservante. La visualización se puede realizar en fresco o empleando tinciones como yodo, hematoxilina férrica, Giemsa y tricrómico que facilitan un análisis más exhaustivo de la morfología de *G. intestinalis* (Adeyemo et al., 2018).

### 1.2.8.3. Métodos inmunológicos

Existen diversas técnicas para el inmunodiagnóstico de *G. intestinalis* en heces, como ensayos de fluorescencia directa (DFA), enzimoimmunoensayos (ELISA, Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) e inmunocromatografías (ICT). Estos métodos aportan ventajas frente a la microscopía, como el requerimiento de menos mano de obra y, en algunos casos, tiempos de respuesta más cortos y la capacidad de procesar simultáneamente varias muestras (Aziz et al., 2024).

Muchos de estos inmunoensayos están bien establecidos, disponiendo de *kits* comercializados, algunos mostrando sensibilidades próximas al 100%, como *Giardia Stool Antigen Detection Microwell ELISA* (IVD Research, Carlsbad, EE. UU.) y la ICT de *Crypto/Giardia K-SeT*<sup>®</sup> (Coris Bioconcept, Gembloux, Bélgica). En términos generales, los ELISA comerciales presentan sensibilidades más altas (95%) que las ICT (91%), manteniendo ambas altas especificidades (98% a 99%). Mientras que el ELISA involucra múltiples dianas que permiten la detección de cargas parasitarias más bajas que las ICT, presenta un mayor tiempo de procesamiento (60-100 min) que estas últimas (10 min) (Aziz et al., 2024).

Además de en heces, se han empleado inmunoensayos de ELISA en muestras de suero para detectar anticuerpos. Sin embargo, su uso es controvertido debido a que no se han observado diferencias en los niveles de IgG anti-*Giardia* en suero entre pacientes sintomáticos y asintomáticos, además de que persisten elevados meses, incluso más de un año, tras la erradicación del parásito. Por otro lado, el empleo de técnicas de ELISA frente a IgA anti-*Giardia* en muestras de saliva está demostrando resultados prometedores, al tratarse de una inmunoglobulina con escasa vida media, desapareciendo rápidamente tras la eliminación del parásito, lo que la hace eficaz para diagnosticar casos de giardiosis activa y evaluar la eficacia del tratamiento antiparasitario (Trelis et al., 2019). Sin embargo, no existen *kits* comercializados, donde su escasa literatura al respecto se basa en técnicas *in-house* mostrando sensibilidades dispares, aunque en varios estudios obtienen porcentajes mayores que por inmunocromatográfica y microscopía (Rodríguez et al., 2004; Shatla et al., 2004; El-Gebaly et al., 2012; Trelis et al., 2019; Cifre, 2021).

#### 1.2.8.4. Biología molecular

Las técnicas de biología molecular, principalmente las basadas en la amplificación de ácidos nucleicos (PCR), han supuesto un enorme avance en el diagnóstico e investigación de *G. intestinalis*. Proporcionan una mayor sensibilidad y especificidad que los ensayos microscópicos o inmunológicos, y, además, aportan la capacidad de caracterizar los aislados, pudiendo estudiar genotipos, subgenotipos y sus variaciones genéticas (Cai et al., 2021).

Existen una gran variedad de dianas genéticas en el estudio de *G. intestinalis*. Los genes ribosomales, como el espaciador transcrito interno (*its*) y el gen codificante del ARN de la subunidad ribosomal pequeña (*ssu* ADNr) o de la proteína ribosomal L7a (*rpl7a*), son genes altamente conservados que pueden emplearse para la identificación de este parásito. La naturaleza multicopia del *ssu* ADNr proporciona a este *locus* una alta sensibilidad, por lo que es el marcador molecular más utilizado en la detección de *Giardia*. Sin embargo, la estabilidad genética de estos genes ribosomales hace que carezcan de utilidad para estudios de caracterización molecular. Para este fin, se han estudiado genes con alta diversidad genética, como genes constitutivos codificantes para el factor de elongación 1- $\alpha$  (*ef1-a*), la enzima Glutamato deshidrogenasa (*gdh*) o la enzima Triosa fosfato isomerasa (*tpi*), y genes codificantes para proteínas estructurales como la actina, ferredoxina, tubulina y la  $\beta$ -giardina (*bg*) (Dacal et al., 2020; Cai et al., 2021; Chang et al., 2023).

Se han propuesto métodos de Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) que, mediante el análisis de diferentes *locus*, permiten una caracterización molecular más precisa de *G. intestinalis*. Los genes ampliamente estudiados en estas técnicas de MLST son *gdh*, *tpi* y *bg* (Cacciò et al., 2008); sin embargo, en los últimos años se han descrito otros genes hipervariables que son útiles para el análisis evolutivo del genotipo A, como genes codificantes para la proteína de muerte inducida por cafeína 1 (CID1), la proteína de reparación y recombinación de ADN Rhp26p (RHP26), dos proteínas de membrana con alto contenido de cisteína (HCMP22547 y HCMP6372), la proteína de control mitótico Dis3 (DIS3) y una quinasa NEK (NEK15411) (Ankarklev et al., 2018; Klotz et al., 2022).

En el genotipo B, se observa una alta hipervariabilidad de secuencias en los genes *gdh*, *bg* y *tpi*, lo que dificulta su caracterización molecular mediante secuencias cortas, ya que generan una baja resolución filogenética. Para abordar esta limitación, en los últimos años se ha propuesto el análisis de otros genes distintivos entre genotipos y subgenotipos, pero más estables y conservados que los marcadores hipervariables *gdh*, *bg* y *tpi*; entre estas nuevas dianas

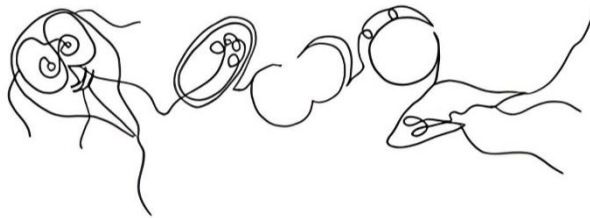
genéticas encontramos una secuencia parcial del gen que codifica la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*6-pgdh*) y una región del gen responsable de la subunidad catalítica de la enzima fosforilasa quinasa B (*phk*) (Seabolt et al., 2021).

Existen diferentes tipos de PCR disponibles para el estudio molecular de *G. intestinalis*. Para su detección encontramos PCR a tiempo real con una sola diana (qPCR) y múltiple (qPCRm) y PCR convencionales, anidadas y semianidadas (*nested PCR*, nPCR). Además, encontramos PCRs a partir de las cuales pueden identificarse infecciones mixtas y polimorfismos, como PCR con Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*, PCR-RFLP) o PCR con Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple (*Single-Strand Conformation Polymorphism*, PCR-SSCP); sin embargo, para la caracterización molecular de *G. intestinalis*, las técnicas de nPCR concatenadas con secuenciación de los productos amplificados son las más empleadas (Dacal et al., 2020; Chang et al., 2023).

Los procesos de caracterización molecular se basan en técnicas laboriosas, que requieren de largos tiempos de análisis, por lo que se limitan principalmente a la investigación, sin ser habitualmente empleadas en la rutina del diagnóstico clínico. En este ámbito, el desarrollo de técnicas de qPCRm ha supuesto un gran avance para los laboratorios clínicos, facilitando el trabajo con menor consumo de tiempo y con valores de sensibilidad superiores a técnicas convencionales, como la microscopía o los inmunoensayos. Algunos kits comercializados que detectan *G. intestinalis* son *Allplex™ GI-Parasite Assay* (Seegene, Seúl, Corea del Sur) y *FAST-TRACK-Diagnostics-FTD Stool Parasites* (Fast Track, Esch-sur-Alzette, Luxemburgo), mostrando sensibilidades cercanas al 100% (Paulos et al., 2019).



## 2. OBJETIVOS





## 2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

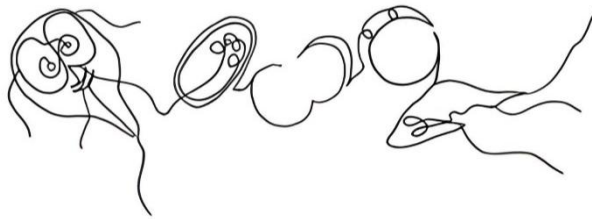
El objetivo principal del presente proyecto es realizar un estudio de la prevalencia y diversidad molecular de *Blastocystis* sp. y *Giardia intestinalis* en pacientes del Área de Salud del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (H.U.P. La Fe) (Valencia, España), realizando un análisis clínico-epidemiológico y estableciendo si existe relación o no con la caracterización molecular.

## 2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Estudiar casos de multiparasitismo junto con las principales coinfecciones parasitarias observadas mediante microscopía óptica.
2. Analizar la estacionalidad y la tendencia evolutiva de los casos de *Blastocystis* sp. y *G. intestinalis*.
3. Determinar la frecuencia y principales polimorfismos en los genes analizados de *Blastocystis* sp. y *G. intestinalis*.
4. Realizar un análisis evolutivo mediante estudio filogenético de los aislados de *Blastocystis* sp. y *G. intestinalis*.
5. Estudiar la posible implicación de los polimorfismos identificados en diferentes genes de *G. intestinalis* sobre las proteínas resultantes, analizando los cambios aminoacídicos.
6. Establecer un umbral en la qPCR de *ssu* ADNr de *G. intestinalis* para identificar muestras con baja carga parasitaria, en las que la realización de procesos de caracterización molecular no sería eficiente.
7. Estudiar la distribución geográfica de las distintas variantes genéticas de *Blastocystis* sp. y *G. intestinalis* en el Área de Salud del H.U.P. La Fe.
8. Analizar los principales síntomas tanto gastrointestinales como extraintestinales, así como otros signos y patologías asociadas al aislamiento de *Blastocystis* sp. y *G. intestinalis*.
9. Buscar posibles factores de riesgo implicados en la adquisición, transmisión y desarrollo de sintomatología en infecciones producidas por *Blastocystis* sp. y *G. intestinalis* en nuestro entorno y población a estudio.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**





### 3.1. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los datos y muestras recabados para el desarrollo de este estudio forman parte del proyecto de investigación PARACLINIC con título “Estudio de prevalencia de parasitosis intestinales y la clínica asociada” (Número de registro: 2025-0418-1) llevado a cabo en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe (H.U.P. La Fe) (Valencia, España) (Anexo I), y del proyecto de investigación PI19CIII/00029 con título “Estableciendo las bases para la implantación del diagnóstico sindrómico en el CNM en el diagnóstico de patógenos causantes de diarrea mediante técnicas moleculares y de metagenómica”, financiado en la convocatoria AESI2019 del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (Majadahonda, Madrid, España).

### 3.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional analítico retrospectivo en el que se incluyeron pacientes, tanto sintomáticos como asintomáticos, con muestras de heces remitidas al H.U.P. La Fe por indicación médica para estudio parasitológico como diagnóstico clínico de rutina, desde el 1 de junio de 2017 hasta el 30 de agosto de 2019. Este diagnóstico se realizó mediante microscopía óptica y, adicionalmente, se analizó la diversidad molecular de los aislados parasitarios más habituales en nuestro medio (*Blastocystis* sp. y *Giardia intestinalis*), además de realizar un estudio epidemiológico de la población afectada en busca de posibles asociaciones.

La recolección de las muestras de heces se realizó con el *Kit REAL MiniSystem Easy Pick System* con *Total-Fix*<sup>®</sup> (Durviz, Valencia, España). Estas muestras fueron procesadas para diagnóstico clínico en el laboratorio de Microbiología y Parasitología del H.U.P. La Fe. El primer paso, tras la recepción de las muestras correctamente, fue preparar el sedimento de heces correspondiente tras centrifugación y su observación al microscopio óptico.

Aquellas muestras donde se visualizaron formas morfológicas de *Blastocystis* sp. y/o *Giardia intestinalis* y presentaron cantidad de heces suficiente (> 200 mg) tras el diagnóstico clínico, se seleccionaron para una segunda concentración y filtrado con el *Kit MidiParasep*<sup>®</sup> *Solvent Free* de 50 mL (Apacor, Wokingham, UK), siguiendo las instrucciones del fabricante, con el fin de aumentar la sensibilidad de las pruebas de biología molecular posteriores.

Los segundos concentrados de heces se remitieron al ISCIII donde se extrajo el ADN con el *QIAamp*<sup>®</sup> *Fast DNA Stool Mini kit* (QIAGEN, Hilden, Alemania) y se realizaron las técnicas posteriores en colaboración con el equipo de investigación del Dr. Carmena.

El protocolo de análisis molecular varía en función del protista observado por microscopía:

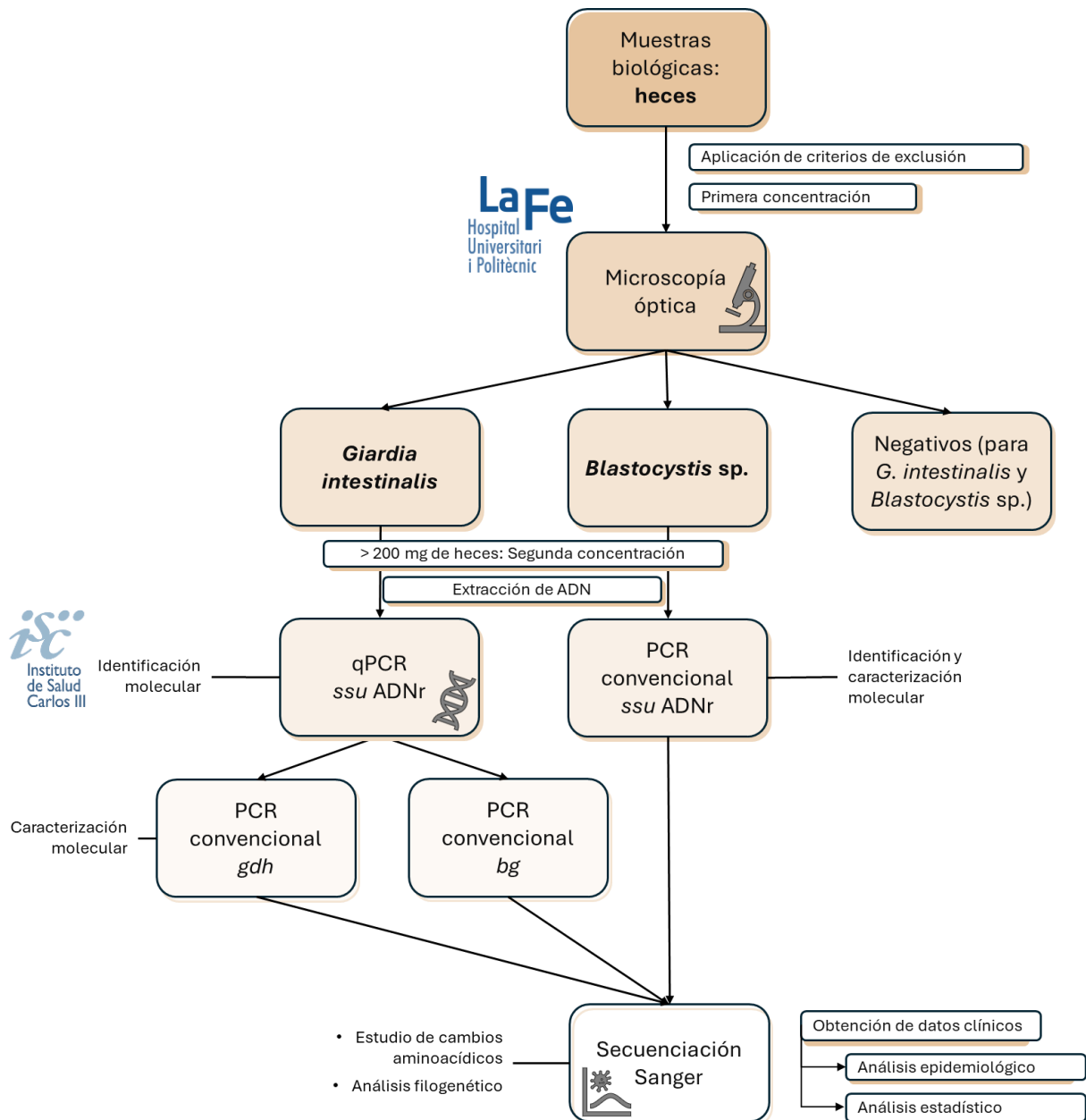
- Las muestras positivas para *Blastocystis* sp. se analizaron mediante PCR convencional para el gen codificante de la subunidad menor del ARN ribosómico 18S (*ssu* ARNr) y se secuenciaron para determinar los subtipos (linajes ribosomales) y diversos alelos de estos subtipos (variación de subtipos).
- En el caso de *G. intestinalis*, se realizó PCR a tiempo real (qPCR) para la identificación del parásito mediante la detección del gen codificante de *ssu* ARNr (*ssu* ADNr). Posteriormente, para realizar la caracterización molecular del parásito, se realizó un estudio de Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) basado en el estudio mediante PCR convencional frente a los genes codificantes de la enzima Glutamato deshidrogenasa (*gdh*) y de la proteína estructural  $\beta$ -giardina (*bg*).

El proceso de análisis de los resultados de secuenciación se basó en el estudio de los cromatogramas de los dos protistas. De cada aislado, se estudiaron los cromatogramas de ambos cebadores (*primers*), en direcciones *forward* y *reverse*, mediante el programa *Chromas* 2.6.6 (Technelysium, Brisbane, Australia). Para identificar el subtipo/alelo o genotipo/subgenotipo al que pertenecía cada uno de nuestros aislados, se intentó obtener una secuencia consenso a partir de las dos secuencias derivadas de la secuenciación (*forward* y *reverse*). Para ello, se alinearon ambas con el software *MEGA-X 11* v11.0.13 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), gracias al algoritmo *ClustalW* (Kumar et al., 2018). En el caso de no obtener una secuencia consenso por baja calidad de alguna de las secuencias, se completó el estudio con sólo una de ellas.

Se analizaron las secuencias en busca de polimorfismos de un solo nucleótido, también denominados SNPs (por sus siglas en inglés *Single-Nucleotide Polymorphism*), y coexistencia de varios subtipos/alelos o genotipos/subgenotipos, según el caso.

Para confirmar la identificación, las secuencias obtenidas se sometieron a un *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Camacho et al., 2009) en diferentes bases de datos, según el protista a estudio. Para *Blastocystis* sp. se empleó la base de datos pública *Public databases for molecular typing and microbial genome diversity of Blastocystis sp.* (<http://pubmLst.org/Blastocystis/>) (PUBMLST *Blastocystis*). En el caso de *G. intestinalis*, la secuencia consenso se contrastó con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information* (NCBI)) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

En la Figura 15 se representa el flujo de trabajo resumido que posteriormente se detallará en apartados posteriores.



**Figura 15.** Flujo de trabajo empleado para lograr los objetivos del estudio.

ssu ADNr: gen codificante del ARN de la subunidad ribosomal pequeña 18S; qPCR: PCR a tiempo real.

El estudio de los datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes para establecer asociaciones con los resultados experimentales se basó en el análisis de la anamnesis, patologías y datos de interés de los pacientes, asociados al episodio clínico activo por el que se remitía la muestra de heces al laboratorio. Para ello, se empleó la plataforma *GestLab* (Clinisys, Alicante, España), el

programa *Mizar* (Orion Clinic) y el Sistema de Información Ambulatorio (SIA) *ABUCASIS* de la Agencia Valenciana de Salud (AVS).

Los datos sociodemográficos o clínicos recopilados se anonimizaron convenientemente para preservar la identidad de los pacientes involucrados. Este estudio forma parte del proyecto “Estudio de prevalencia de parasitosis intestinales y la clínica asociada” con certificación y aprobación por parte del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del CEIM - HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA FE (número de registro: 2025-0418-1). A su vez, es un estudio vinculado al proyecto “Estableciendo las bases para la implantación del diagnóstico sindrómico en el CNM en el diagnóstico de patógenos causantes de diarrea mediante técnicas moleculares y de metagenómica” - PI19CIII/00029 - financiado en la convocatoria AESI2019 del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid).

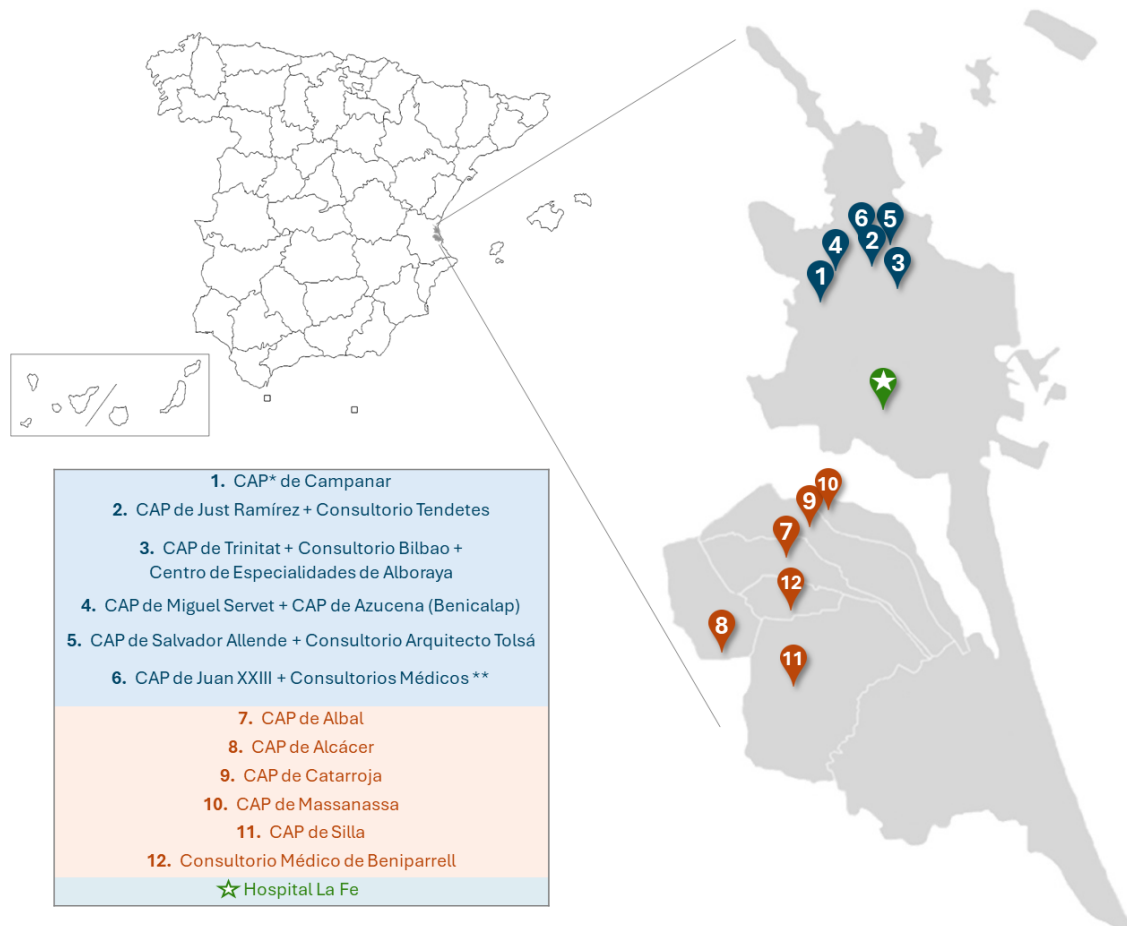
Para el análisis estadístico se utilizó el *software IBM® SPSS® Statistics para Windows Versión 25.0* (Armonk, Nueva York, EE.UU.).

### **3.3. ÁREA Y POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO**

El H.U.P. La Fe se corresponde con el Departamento de Salud 7 de la Comunidad Valenciana, que abarca, además del propio hospital, 12 Centros de Salud o Centros de Atención Primaria (CAP), 9 Consultorios Auxiliares y el Centro de Especialidades Ricardo Trénor Palavicino de Alboraya. En total, es responsable de la atención sanitaria de alrededor de 300.000 habitantes, a los que se le suman pacientes de otros departamentos que acuden al hospital por su carácter de referencia (La Fe – Hospital Universitari i Politènic. [H.U.P. La Fe], s.f.).

Todos estos centros atendidos por el H.U.P. La Fe pueden dividirse en dos zonas bien delimitadas, pertenecientes a la zona norte y la zona de la Comarca de la Huerta Sur de Valencia; que se corresponden con 7 municipios (Albal, Alcácer, Catarroja, Massanassa, Silla, Beniparrell y Valencia).

Como queda reflejado en la Figura 16, los CAP de Campanar, Juan XXIII, Miguel Servet, Azucena, Salvador Allende, Trinitat y Just Ramírez junto con los Consultorios Médicos de Bilbao, Borbotó, Benifaraig, Poble Nou, Carpesa, Marco Merenciano, Arquitecto Tolsá, Tendetes y el Centro de Especialidades de Alboraya se agrupan en la zona norte de Valencia, mientras que los Centros de Salud de Albal, Alcácer, Catarroja, Massanassa y Silla junto con el Consultorio médico de Beniparrell, se encuentran en la zona sur.



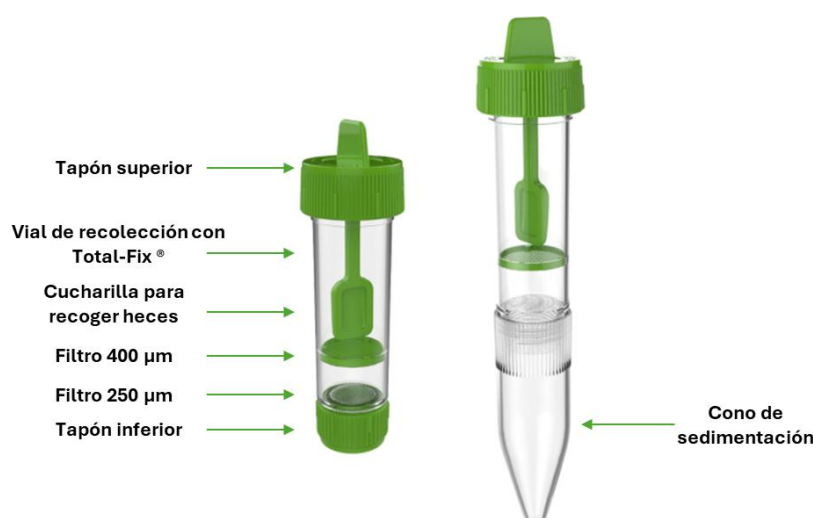
**Figura 16.** Localización del Hospital Universitario y Politécnico La Fe junto con los diferentes Centros de Atención Primaria y Consultorios Médicos que atiende.

\*CAP: Centro de Atención Primaria; \*\* Consultorios Médicos de Borbotó, Benifaraig, Poble Nou, Carpesa y Marco Merenciano

### 3.4. MUESTRAS BIOLÓGICAS: RECOGIDA DE HECES

Las muestras biológicas objeto de estudio fueron heces. La recolección se llevó a cabo mediante el *Kit REAL MiniSystem Easy Pick System* con *Total-Fix*® (Durviz, Valencia, España) (Figura 17), sistema que preserva la morfología del parásito sin dañar su material genético ni sus proteínas de membrana, ya que contiene un medio libre de formaldehído, mercurio y PVA, permitiendo la conservación y concentración de los parásitos en heces sin interferir en las pruebas de biología molecular (Durviz, s.f.).

Además, este medio *Total-Fix*® permite la conservación de las heces a temperatura ambiente, sin que se produzca degradación y pérdida de las formas parasitarias en el almacenamiento y transporte, lo que ayuda a garantizar una mayor rentabilidad de los resultados en su procesamiento posterior en el laboratorio (Durviz, s.f.).



**Figura 17.** Sistema de recolección, filtrado y concentración de heces *Kit REAL MiniSystem Easy Pick System* con *Total-Fix®* (Durviz, Valencia, España) (Modificado de: Real life-science solutions, s.f.).

En el Laboratorio de Microbiología y Parasitología del H.U.P. La Fe, se analizaron las muestras fecales recogidas correctamente con este *kit*. Los pasos para una correcta recogida de heces fueron los especificados por la casa comercial Durviz en sus instrucciones, enumerados en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Correcta recogida de heces para estudio parasitológico.

1. Recoger heces con la cucharilla de recogida de muestra del *kit*. Las heces deben ser frescas y emitidas en un recipiente limpio, evitando el contacto con el agua del inodoro para que no exista contaminación cruzada.
2. Introducir la cucharilla en el vial de recolección que contiene el fijador *Total-Fix®*, evitando colmarlo para que no haya fugas por sobrecarga, y cerrar fuertemente el tapón superior.
3. Conservación a temperatura ambiente hasta su transporte al laboratorio.

Además, se establecieron los siguientes criterios de exclusión para descartar, por considerarse inadecuadas, todas aquellas heces recibidas en el laboratorio con una o varias de las siguientes características:

- Muestra incorrectamente identificada: muestra sin identificación o con discrepancia en los datos identificativos entre la muestra y la petición del médico solicitante.
- Muestra insuficiente: cantidad inferior a 200 mg de heces.

- Muestra derramada: no se procesaron aquellas muestras de volumen excesivo de heces con desbordamiento en la parte externa del vial de recolección.

Se recomendó la recogida de las muestras por triplicado, en días alternos, de cada paciente, para aumentar la sensibilidad de la detección parasitaria, debido a la eliminación intermitente de parásitos en heces (Trelis et al., 2019). Sin embargo, se analizaron incluso aquellas en las que se recibió un único ejemplar, con el fin de intentar identificar el mayor número de muestras positivas, aunque la sensibilidad del proceso pudiera ser menor. Estas tres muestras se recibían a la vez en el laboratorio, observándose al microscopio por separado, pero considerándose como una misma muestra biológica, con un único resultado parasitológico.

Posteriormente, para evitar duplicidades en el cálculo de prevalencia y otros análisis estadísticos, se consideró como muestra estadística cada episodio clínico, definiendo como un nuevo episodio aquel en el que transcurrieron 6 meses o más entre una muestra biológica de heces y la siguiente con el mismo aislamiento parasitario.

### **3.5. MICROSCOPIA ÓPTICA: PRIMER FILTRADO Y CONCENTRACIÓN**

En el laboratorio de Microbiología y Parasitología del H.U.P. La Fe se analizaron mediante microscopía óptica todas las muestras fecales correctamente identificadas y en condiciones óptimas para su transporte, considerando como positiva la visualización de formas parasitarias tanto en una, como en dos o en las tres heces recibidas a la vez de cada paciente.

En primer lugar, se agita vigorosamente el vial de recolección durante 30 segundos para facilitar la disgregación de la muestra. Acto seguido, se realiza un proceso de concentración y filtración por centrifugación durante 3 minutos a 2000 rpm, con el fin de separar las formas parasitarias de tamaño igual o inferior a 250  $\mu\text{m}$  (lo que incluye quistes, ooquistes y trofozoítos de protozoos y huevos de helmintos) de material fecal de mayor volumen, como restos de comida sin procesar, productos vegetales o similares.

Posteriormente, para la visualización al microscopio óptico, mediante una pipeta Pasteur se transfiere a un portaobjetos una pequeña cantidad del sedimento obtenido. Sobre esta mezcla se deposita un cubreobjetos para facilitar su análisis evitando dañar la lente del objetivo del microscopio.

Se examinaron las láminas cuidadosamente en busca de alguna forma parasitaria, incluyendo quistes o trofozoítos de *Giardia intestinalis* o cualquiera de las formas morfológicas de *Blastocystis* sp. Para la correcta identificación, es necesario la visualización con el objetivo de

40x aumentos, que nos permite evidenciar claramente núcleos, pared quística y otros elementos morfológicos identificativos de cada protista.

### 3.6. SEGUNDO FILTRADO Y CONCENTRACIÓN

Con el fin de aumentar la sensibilidad de las pruebas de biología molecular posteriores, en aquellas muestras en las que había suficiente material fecal remanente tras el diagnóstico clínico (> 200 mg), se llevó a cabo un proceso adicional de concentrado y filtrado de heces en el que se potenció el homogenizado de la materia fecal sobrante del vial de recolección del *Kit REAL MiniSystem Easy Pick System*, junto con lo obtenido tras el primer filtrado en el cono de sedimentación del *kit*, realizando un *pool* de las tres muestras recibidas a la vez para diagnóstico por microscopía.

Se empleó el *Kit MidiParasep® Solvent Free* de 50 mL (Apacor, Wokingham, UK) (Figura 18).



**Figura 18.** Sistema de concentración y filtrado de heces *MidiParasep® Solvent Free* de 50 mL (Apacor, Wokingham, UK) (Modificado de: Apacor, s.f.).

Se comienza con el homogenizado de todo el material fecal con 8 mL de solución salina al 0,9% en la cámara de mezcla del *kit*. La mezcla manual se completa con 10 segundos de vórtex.

Posteriormente, se procede a la filtración del contenido mediante centrifugación durante 5 minutos a 2500 rpm. Se descarta el sobrenadante y se mantiene el precipitado obtenido en la punta del cono de sedimentación. Este sedimento se transfiere a microtubos de 1,5 mL que se conservan a -80°C hasta su posterior análisis molecular.

### 3.7. ANÁLISIS MOLECULAR

#### 3.7.1. Extracción y purificación de ADN

Para llevar a cabo técnicas de biología molecular, es necesario comenzar con la obtención del material genético de la muestra. La extracción y purificación de ADN parasitario a partir de heces desempeña un reto adicional al de otras muestras, debido a la mayor presencia de inhibidores, como polisacáridos complejos, sales biliares, lípidos y urato, que pueden dificultar la amplificación de las dianas e, incluso, impedir por completo el desarrollo de la PCR. A esto se suma la resistencia de la pared de los ooquistes/quistes de algunos parásitos que dificultan su lisis para obtener el material génico (Hawash, 2014).

Para llevar a cabo esta extracción se empleó el ensayo comercial *QIAamp® Fast DNA Stool Mini kit* (QIAGEN, Hilden, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante con algunas modificaciones (Li et al., 2003; Mirsepasi et al., 2014). Este *kit* cuenta con un tampón de lisis *InhibitEX®* en formato líquido, que separa eficazmente el ADN de los inhibidores de la muestra. El procedimiento de lisis y posterior extracción se basa en el empleo de tampones y procesos de centrifugación en columna, las cuales presentan un entramado de sílice en su interior, que les confiere una estructura clave para extraer el ADN del medio. Los inhibidores y contaminantes se eliminan mediante pasos de lavado y, finalmente, el ADN puro se eluye de la columna.

Como paso previo a la extracción de ADN, se procede a la redisolución de cualquier precipitado en el *buffer InhibitEX®*, sometiéndolo a 50°C hasta que el medio torne transparente macroscópicamente.

Se añade 1 mL de *buffer InhibitEX®* en nuestros concentrados fecales y tras mezclar mediante 1 minuto de vórtex, se realiza una incubación a 95°C durante 10 minutos en termobloque, intercalando, cada 5 minutos, 15 segundos de vórtex. Es importante cerrar fuertemente los tubos de muestras para evitar que se derrame contenido fecal durante esta incubación. Este procedimiento, previo al proceso de extracción, tiene como objetivo debilitar el quiste de *Giardia intestinalis* para facilitar la posterior obtención del ADN.

Tras atemperar la mezcla final, se centrifuga durante 3 minutos a 13.000 rpm, descartando el precipitado y empleando 350 µL del sobrenadante para realizar la extracción del ADN.

El proceso de extracción y purificación de ADN se realizó de forma automática en el equipo *QIAcube Automated DNA/RNA Isolation Purification System* (QIAGEN, Hilden, Alemania). Se

incluyó rutinariamente un control de extracción con agua ultrapura (grado-PCR) en cada lote de muestras procesado. Los reactivos empleados fueron suministrados por el *kit* comercial (a excepción del etanol 100%), incluyendo, Proteinasa K (degradación de proteínas), tampón de lisis *buffer* AL (rotura de las membranas plasmáticas y celulares), etanol absoluto (potencia la adherencia de los ácidos nucleicos a las columnas de sílice), tampones de lavado *buffer* AW1 y *buffer* AW2 y tampón de elución *buffer* ATE. El ADN final extraído y purificado se eluyó en un volumen final de 200  $\mu$ L y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para los subsecuentes análisis moleculares de identificación y caracterización.

### 3.7.2. PCR a tiempo real: qPCR

#### 3.7.2.1. Identificación molecular de *Giardia intestinalis*

Como confirmación de la microscopía y para estimar la carga parasitaria de *Giardia intestinalis* se empleó la técnica de qPCR semicuantitativa dirigida frente a un fragmento específico de 62 pb del gen codificante para *ssu* ARNr 18S (*ssu* ADNr), componente estructural y funcional de la subunidad pequeña ribosomal 40S, complejo encargado de la síntesis proteica, el cual tiene una función clave en el reconocimiento del ARNm y en la alineación del ARNt durante la traducción.

La elección de este marcador molecular para el diagnóstico de *G. intestinalis* se debe a que se trata de un gen muy conservado, con escasas mutaciones acumuladas a lo largo del tiempo, lo que permite el uso de cebadores universales. Además, es un gen multicopia, con disposición repetitiva a lo largo del genoma, lo que nos permite disponer de concentraciones altas iniciales de ADN previa a la amplificación, garantizando una buena sensibilidad de la técnica molecular (Dacal et al., 2020).

La sonda y los cebadores empleados en el análisis se muestran en la Tabla 5 (Verweij et al., 2003).

**Tabla 5.** Oligonucleótidos empleados en la identificación de *G. intestinalis* por qPCR.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Referencia
Sonda	FAM-CCCGCGGCGGTCCCTGCTAG-BHQ1	
Gd-80F	GACGGCTCAGGACAACGGTT	Verweij et al., 2003
Gd-127R	TTGCCAGCGGTGTCCG	

La sonda consta en su extremo 5' del fluoróforo FAM con emisión a  $\lambda = 517$  nm, mientras que en el extremo 3' presenta el inhibidor *Black Hole Quencher 1* (BHQ1) (Yang et al., 2009; Herráez, 2012).

La mezcla de reacción incluye por cada muestra:

- 1,25  $\mu$ L del cebador 0,5  $\mu$ M *forward primer* Gd-80F
- 1,25  $\mu$ L del cebador 0,5  $\mu$ M *reverse primer* Gd-127R
- 0,5  $\mu$ L de la sonda 0,4  $\mu$ M *TaqMan probe dual-labeled* (FAM–BHQ1)
- 12,5  $\mu$ L de *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, California, EE.UU.) que contiene:
  - *AmpliTaq Gold® DNA Polimerase*
  - Agua ultrapura (grado-PCR)
  - Desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP) con desoxiuridina trifosfato (dUTP)
  - Uracil-ADN glicosilasa (UDG) (enzima que previene la reamplificación de productos de PCR remanentes al eliminar cualquier uracilo incorporado en amplicones monocatenarios o bicatenarios mediante la hidrólisis de enlaces uracilo-glucosídicos del ADN que generan sitios apirimídicos sobre los cuales no es posible realizar la replicación por la ADN polimerasa) (Longo et al., 1990)
  - Referencia *ROX™* (referencia interna para normalizar la fluorescencia emitida, corrige las fluctuaciones fluorescentes debidas a cambios de concentración o volumen)
  - Tampón
- 6,5  $\mu$ L de agua ultrapura (grado-PCR)

La solución se mezcló suavemente, pipeteando hacia arriba y hacia abajo varias veces, y los 22  $\mu$ L se dispensaron en tubos de 200  $\mu$ L para PCR con tapa y pared delgada, que se mantuvieron en gradillas refrigeradas para tubos de PCR. Finalmente, se añadieron 3  $\mu$ L de ADN molde en cada tubo de PCR, obteniendo un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L.

Para la amplificación del ADN se empleó un protocolo estandarizado de amplificación *TaqMan* bajo las condiciones de reacción mostradas en la Tabla 6. La amplificación y detección se realizaron en el equipo *Corbett Rotor-Gen™ 6.000 qPCR cycler* (Qiagen Corbett, Hilden, Alemania). Para el análisis de datos se utilizó la versión 2.3.1 (Build 49) del software *Rotor-Gen™ 6.000 Series*.

**Tabla 6.** Perfil térmico y tiempos de la qPCR de *G. intestinalis*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Referencia
Incubación	55	2 min	
Activación ADN polimerasa y desnaturalización ADN	95	15 min	
Desnaturalización	95	15 s	Verweij et al., 2003
Hibridación de los cebadores	60	1 min	
Elongación	72	30 s	
Extensión final	-	-	

La etapa de incubación inicial es necesaria para la actividad de la enzima UDG, la cual escinde cualquier material que contenga dUTP, eliminando contaminaciones. La temperatura de 95°C posterior reduce sustancialmente la actividad de esta enzima.

De forma rutinaria, en cada proceso de qPCR se incluyó un control positivo (ADN de *G. intestinalis*) y un control negativo (agua esterilizada para PCR).

### 3.7.3. PCR convencional

Para llevar a cabo la caracterización molecular se realizaron técnicas de PCR convencional dirigidas frente a genes hipervariables entre subtipos o genotipos/subgenotipos, según el caso, con su posterior secuenciación.

Las especificaciones de cada PCR convencional se detallan en apartados posteriores, con las siguientes consideraciones en común:

La preparación de las mezclas de reacción se llevó a cabo en tubos de 1,5 mL de microcentrífuga empleándose los componentes expuestos a continuación, cuyas cantidades se especificarán en su apartado correspondiente:

- Cebadores específicos para cada reacción (Invitrogen, California, EE.UU.)
- PCR *Master Mix: 5x MyTAQ™ Reaction Buffer* que contiene 15mM MgCl<sub>2</sub> y 5 mM dNTPs (Bioline GmbH, Luckenwalde, Alemania)
- dNTPs en exceso: 10 mM *dNTPs Mix* (Invitrogen, California, EE.UU.)

- ADN polimerasa: 5U/ $\mu$ L MyTAQ™ DNA polymerase (2,5 U) (Bioline GmbH, Luckenwalde, Alemania)
- Agua ultrapura (grado-PCR)

Cada mezcla de reacción se procesó de forma equivalente, mezclando su contenido suavemente, pipeteando hacia arriba y hacia abajo varias veces, y dispensando el volumen total en tubos de 200  $\mu$ L para PCR con tapa y pared delgada, que se mantuvieron en gradillas refrigeradas para tubos de PCR hasta adicionar las cantidades correspondientes de ADN molde.

El proceso de amplificación se realizó en los termocicladores *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Massachusetts, EE.UU.) o *C1000 Touch Thermal Cycler* (Bio-Rad, California, EE.UU.). Todos los productos de amplificación obtenidos al finalizar las PCR se conservaron a 4°C.

Posteriormente, para valorar visualmente la amplificación de los aislados, se emplearon geles de agarosa al 2%. Para comenzar con la elaboración de los geles, se preparó una dilución de trabajo 1/20 a partir de una solución tampón 10x Tris-Borato-EDTA (TBE): 89 mM de Tris borato, 2 mM EDTA, pH 8,3  $\pm$ 1. La mezcla obtenida se almacenó a temperatura ambiente.

Por cada electroforesis, se añaden 100 mL de 0,5x TBE a una botella de vidrio de borosilicato, donde se disuelven 2 g de agarosa en polvo *D5 agarose gel* (Condalab, Madrid, España) mediante la aplicación de calor en microondas ( $\approx$  5 minutos). Una vez obtenida la disolución, se deja enfriar a temperatura ambiente y, cuando se mantenga tibia ( $\approx$  60°C), se añaden 3  $\mu$ L del marcador *Pronasafe™* (Condalab, Madrid, España), homogenizando por agitación suave. La mezcla se deposita en un el sistema de cubetas *Sub-Cell GT Horizontal Electrophoresis System* (Bio-Rad, California, EE.UU.), que consiste en un molde y un peine que proporciona los pocillos de muestras. El número de muestras por electroforesis dependerá del número de pocillos del peine (15-30 muestras por electroforesis). Tras  $\approx$  30 minutos a temperatura ambiente se solidifica la solución obteniéndose el gel listo para cargar los productos amplificados.

Un volumen de 18  $\mu$ L de los productos de PCR se mezcla con una gota ( $\approx$  1,5  $\mu$ L) de tampón de carga *6x DNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.) o similar, el cual proporciona un aumento de densidad de las muestras que se depositan en el fondo de los pocillos elaborados en el gel y nos permite visualizar la migración del ADN. El primer pocillo de cada fila se carga con 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular o *DNA ladder* tal como *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.) o similar, que nos ayuda

a inferir el tamaño (número de pb) de nuestro ADN amplificado. Por cada gel, se empleó un control positivo (ADN del protista a estudio) y un control negativo (agua ultrapura (grado-PCR)).

El gel cargado se sumerge en una cubeta con una solución de 0,5x TBE que actúa como conductor y se aplica un campo eléctrico de  $\approx 120$  V durante 50 min conectándolo a la fuente *PowerPac Basic Power Supply* (Bio-Rad, California, EE.UU.).

Para revelar el resultado se empleó el equipo *DNR MiniBis Pro transilluminator* (312nm) (DNR Bio-imaging, Jerusalén, Israel). El sistema cuenta con una cámara CMOS de 16 bits y 1,3 megapíxeles que permite, gracias al *software Gel-Capture*, observar la imagen a tiempo real del gel irradiado con UV y ajustar parámetros como exposición y brillo, siendo posible, además, realizar capturas fotográficas. En la Figura 19 se observa un ejemplo de imagen obtenida con este transiluminador. El grosor de las bandas está relacionado con la cantidad de fragmentos de ADN del mismo tamaño obtenido. Este tamaño puede ser inferido a partir de su comparativa con las bandas observadas en el marcador de peso molecular.



**Figura 19.** Imagen de un gel de agarosa cargado con ADN amplificado obtenida a partir del equipo *DNR MiniBis Pro transilluminator* (312 nm) (DNR Bio-imaging, Jerusalén, Israel).

\*Muestras con ADN amplificado de  $\approx 600$  pb pertenecientes al *barcoding ssu* ADNr de *Blastocystis* sp.

### 3.7.3.1. Caracterización molecular de *Giardia intestinalis*

El *ssu* ADNr de *Giardia intestinalis*, como marcador molecular, se trata de una región genética conservada que carece de secuencias divergentes entre un genotipo y otro, imposibilitando la opción de caracterización molecular del parásito. Es por ello que, tras la detección de este gen y semicuantificación en términos de ciclo umbral (Ct), se realizaron técnicas de PCR convencional empleando otros marcadores genéticos con mayor especificidad. Estas PCR tenían como diana genes monocopia de *G. intestinalis*, con alta diversidad, que nos permiten obtener el genotipo y

subgenotipo de cada aislado. El carácter monocopia de estas dianas provoca que estas técnicas presenten una baja sensibilidad, necesitando de una concentración de ADN molde considerable para obtener buenos resultados, es decir, se necesita de una carga parasitaria relativamente alta de inicio para obtener resultados consistentes en la caracterización molecular. Específicamente, se detectaron secuencias parciales de genes codificantes de la enzima Glutamato deshidrogenasa (*gdh*) y de la proteína estructural  $\beta$ -giardina (*bg*), llevándose a cabo un estudio de Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST).

### 3.7.3.1.1. *Glutamato deshidrogenasa*

La actividad enzimática de Glutamato deshidrogenasa (GDH) en *Giardia intestinalis* está relacionada con el metabolismo de los hidratos de carbono, aminoácidos y la asimilación del amoníaco. Juega un papel importante en la producción de alanina y en la oxidación de NAD(P)H, manteniendo el volumen fisiológico del parásito (Yee & Dennis, 1992; Paget et al., 1993; Park et al., 1998). Se ha comprobado que el estudio de este gen es útil para la caracterización molecular de *G. intestinalis*, pudiendo identificar de este análisis tanto el genotipo como los diferentes subgenotipos (Read et al., 2004).

En este caso, se amplificó un fragmento de 432 pb del gen codificante para la enzima GDH mediante una PCR convencional semianidada; esta PCR consiste en concatenar dos PCR convencionales que comparten uno de los cebadores. En una primera PCR se obtiene un amplicón que será el ADN molde para la segunda PCR. Para ello, se emplean dos cebadores en la primera PCR manteniendo uno de ellos en la segunda PCR que se combina con otro cebador. En este caso, se empleó un único cebador *reverse* (*gdhi\_R*) en ambas PCR y dos cebadores *forward*, *gdhe\_F* en la primera PCR como cebador externo y *gdhi\_F* en la segunda PCR como cebador interno (Read et al., 2004). Las secuencias de estos oligonucleótidos se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Oligonucleótidos empleados en la detección de *gdh* de *G. intestinalis*.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Referencia
gdhe_F	TCAACGT <b>Y</b> A <b>A</b> Y <b>C</b> G <b>Y</b> GG <b>Y</b> TTCCGT	Read et al., 2004
gdhi_F	CAGTACACCTC <b>Y</b> GCTCTCGG	
gdhi_R	GTT <b>R</b> TCCTTGACATCTCC	

**Rojo:** nucleótidos degenerados (R: A/G ; Y: C/T)

Los cebadores empleados son degenerados, ya que presentan dos posibles nucleótidos en una misma posición (resaltados en rojo en la Tabla 7); esto es necesario para conseguir la correcta hibridación en los distintos genotipos y subgenotipos de *G. intestinalis*, que presentan variabilidad en sus secuencias.

La mezcla de reacción de la primera PCR consiste en:

- 1,25  $\mu$ L de *forward primer* 10  $\mu$ M *gdhe\_F* (500 nM)
- 1,25  $\mu$ L de *reverse primer* 10  $\mu$ M *gdhi\_R* (500 nM)
- 5  $\mu$ L de *PCR Master Mix*
- 0,5  $\mu$ L de ADN polimerasa
- 0,5 dNTPs
- 11,5  $\mu$ L de agua

Para la segunda PCR se emplearon iguales volúmenes, reemplazando *forward primer gdhe\_F* por 10  $\mu$ M *gdhi\_F* (500 nM). El volumen de ADN molde fue de 5  $\mu$ L para las dos PCR, consiguiendo un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L.

Para la amplificación se emplearon los tiempos y temperaturas de reacción descritos en la Tabla 8, idénticos en ambas PCR (primera y segunda de la PCR semianidada).

**Tabla 8.** Perfil térmico y tiempos de PCR convencional para el gen *gdh* de *G. intestinalis*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Referencia
Activación ADN polimerasa y desnaturalización ADN	95	3 min	
Desnaturalización	95	30 s	Read et al., 2004
Hibridación de los cebadores	55	30 s	
Elongación	72	1 min	
Extensión final	72	7 min	
Mantenimiento	4	$\infty$	

### 3.7.3.1.2. $\beta$ -giardina

La proteína estructural  $\beta$ -giardina (*bg*) está asociada al citoesqueleto de *Giardia intestinalis*. Una de sus funciones es formar parte de la superficie de membrana del disco ventral de los

trofozoítos, interaccionando con otras proteínas del citoesqueleto, como los microtúbulos en las microcintas o puentes cruzados, manteniendo la integridad de este disco ventral (Macarisin et al., 2012, Elmendorf et al., 2003).

La alta heterogeneidad del gen codificante para *bg* hace posible la tipificación y subtipificación del genotipo A de *G. intestinalis* en AI, AII y AIII, aunque no consigue diferenciar entre los diferentes subgenotipos del genotipo B (Cacciò et al., 2002; Lalle et al., 2005).

Para amplificar el gen codificante para *bg* se realizó una PCR anidada con un fragmento de 511 pb de longitud como diana final. Este tipo de proceso consiste en llevar a cabo dos PCR consecutivas; en la primera se emplean dos cebadores externos y, sobre el producto de la primera reacción, se realiza una segunda PCR usando cebadores internos diferentes que flanquean una región central de este amplicón (Cacciò et al., 2002; Lalle et al., 2005). Las secuencias de los cuatro oligonucleótidos usados en esta PCR anidada se muestran en la Tabla 9, siendo los cebadores externos G7\_F y G759\_R y los internos G99\_F y G609\_R.

**Tabla 9.** Oligonucleótidos empleados en la detección de *bg* de *G. intestinalis*.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Referencia
G7_F	AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGC	
G759_R	GAGGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC	Cacciò et al., 2002; Lalle et al., 2005
G99_F	GAACGAACGAGATCGAGGTCCG	
G609_R	CTCGACGAGCTTCGTGTT	

La mezcla de reacción de la primera PCR consiste en:

- 1 µL de 10 µM *forward primer* G7\_F (200 nM)
- 1 µL de 10 µM *reverse primer* G759\_R (200 nM)
- 5 µL de *PCR Master Mix*
- 0,5 µL de ADN polimerasa
- 0,5 dNTPs
- 12 µL de agua

Para la segunda PCR, se incrementó el volumen de agua a 14  $\mu$ L y se reemplazaron los cebadores externos por los internos, 10  $\mu$ M *forward primer* G99\_F (200nM) y 10  $\mu$ M *reverse primer* G609\_R (200nM).

En la primera PCR se usaron 5  $\mu$ L de ADN molde y en la segunda PCR se emplearon 3  $\mu$ L de amplicón, obteniendo en ambas un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L.

Las condiciones de PCR establecidas se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Perfil térmico y tiempos de PCR convencional para el gen *bg* de *G. intestinalis*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Referencia
Activación ADN polimerasa y desnaturalización ADN	95	7 min	
Desnaturalización	95	30 s	Cacciò et al., 2002; Lalle et al., 2005
Hibridación de los cebadores	65/55*	30 s	
Elongación	72	1 min	
Extensión final	72	7 min	
Mantenimiento	4	$\infty$	

\*65°C para la primera PCR y 55°C para la segunda PCR.

### 3.7.3.2. Identificación y caracterización molecular de *Blastocystis* sp.

El *ssu* ARNr 18S de *Blastocystis* sp. procede de un gen conservado, pero, a diferencia de lo que ocurría en el caso de *Giardia intestinalis*, éste engloba una región con secuencia hipervariable entre los diferentes subtipos y resulta útil para realizar caracterización molecular. Es por lo que, con una PCR convencional directa, podemos obtener un producto amplificado útil para secuenciar y realizar la tipificación de este protista.

Para este análisis, se utilizó un fragmento diana de 600 pb del gen *ssu* ADNr, siguiendo el protocolo desarrollado por Scicluna y colaboradores (Scicluna et al., 2006).

La identificación y las secuencias de los cebadores quedan reflejados en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Oligonucleótidos empleados en la detección de *Blastocystis* sp.

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Referencia
RD5	ATCTGGTTGATCCTGCCAGT	Scicluna et al., 2006
BhRDr	GAGCTTTTAACTGCAACAACG	

La mezcla de reacción de la PCR consistía en:

- 1,25  $\mu$ L de 10  $\mu$ M *forward primer* RD5 (500 nM)
- 1,25  $\mu$ L de 10  $\mu$ M *reverse primer* BhRDr (500 nM)
- 5  $\mu$ L de *PCR Master Mix*
- 0,5  $\mu$ L de ADN polimerasa
- 0,5 dNTPs
- 11,5  $\mu$ L de agua

Se añadieron a la mezcla de reacción 5  $\mu$ L de ADN molde consiguiendo un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L.

El proceso de PCR se detalla en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Perfil térmico y tiempos de PCR convencional frente a *ssu* ADNr de *Blastocystis* sp.

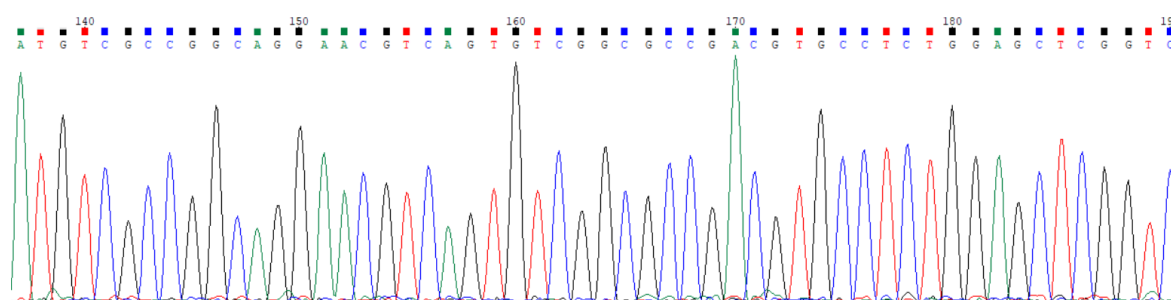
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Referencia
Activación ADN polimerasa y desnaturalización ADN	95	3 min	Scicluna et al., 2006
Desnaturalización	94	1 min	
Hibridación de los cebadores	59	1 min	
Elongación	72	1 min	
Extensión final	72	2 min	
Mantenimiento	4	$\infty$	

#### 3.7.4. Secuenciación Sanger

Para determinar la secuencia de nucleótidos de los marcadores moleculares obtenidos en las PCRs convencionales, se llevó a cabo una secuenciación Sanger.

Esta técnica fue desarrollada por Frederick Sanger en 1977 (Sanger et al., 1977). Se denomina secuenciación por terminador fluorescente y consiste en realizar una amplificación añadiendo a los componentes de la mezcla de reacción didesoxinucleótidos (ddNTP), ddNTPs que carecen del hidroxilo terminal en el extremo 3´, lo que desencadena el fin de la elongación, ya que la ADN polimerasa es incapaz de añadir nuevos nucleótidos a la cadena.

Estos ddNTPs se encuentran marcados por diferentes fluoróforos para cada nucleótido en su extremo 5´ (FAM para citosina, JOE para adenina, TAMRA para guanina y ROX para timina). Al final de la amplificación, lograremos cadenas de diferente longitud en función de la posición en la que se haya incorporado el ddNTP y, por tanto, haya desencadenado la terminación de la elongación. Las secuencias se separan por tamaño gracias a una electroforesis capilar, empleando un láser de argón para excitar los fluorocromos. El resultado final consiste en un electroferograma o cromatograma con diferentes picos de emisión que nos determinan la posición de cada nucleótido en la secuencia, comenzando con el nucleótido que se corresponde con el fragmento de tamaño más pequeño y sus consecutivos (Figura 20) (García-Sancho, 2010).



**Figura 20.** Cromatograma visualizado en *Chromas 2.6.6* (Technelysium, Brisbane, Australia).

La secuenciación se llevó a cabo con los dos cebadores internos para cada gen a estudio, empleando el sistema *BigDye Terminator* (Applied Biosystems, California, EE.UU.) en el secuenciador de ADN automatizado *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.).

Por cada aislado, se obtuvieron cromatogramas de ambos cebadores, en direcciones *forward* y *reverse*, que se visualizaron gracias al programa *Chromas 2.6.6* (Technelysium, Brisbane, Australia) (Ejemplo en Figura 20).

Posteriormente, se empleó el software *MEGA-X 11 v11.0.13 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)*, para alinear ambas secuencias y obtener una secuencia consenso, gracias al algoritmo *ClustalW* de alineamiento múltiple (Kumar et al., 2018) (Figura 21). En el caso de no

conseguirlo por baja calidad de alguna de las secuencias, se completó el estudio con sólo una de ellas.



**Figura 21.** Alineamiento de secuencias realizado con el algoritmo *ClustalW* del programa *MEGA-X 11 v11.0.13 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)*.

La búsqueda de mutaciones y coinfecciones se llevó a cabo analizando los resultados de ambos programas, que permitieron alinear nuestras secuencias con secuencias de referencia y visualizar mutaciones y dobles picos en los cromatogramas.

Con esta última etapa experimental, se pretende completar la caracterización molecular de los protistas, determinando el subtipo/alelo o genotipo/subgenotipo, según el caso, la presencia de SNPs e incluso la coexistencia de diferentes subtipos, alelos, genotipos o subgenotipos.

#### 3.7.4.1. *Giardia intestinalis*

En la caracterización molecular de *Giardia intestinalis*, se realizó un estudio de Tipificación Multilocus de Secuencias (*Multilocus Sequence Typing*, MLST), técnica de epidemiología molecular que permite la tipificación parasitaria mediante la identificación de polimorfismos tras la amplificación y secuenciación de genes que difieren en secuencia entre cada genotipo/subgenotipo, en el presente trabajo, *gdh* y *bg*.

En primer lugar, la identificación del parásito se concretó mediante el alineamiento local de las secuencias consenso de cada aislado en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information* (NCBI)) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), empleando BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, TBLASTn para nucleótidos). Se consideró una identificación válida cuando existía una correlación  $\geq 98\%$  con las secuencias obtenidas en BLAST (Camacho et al., 2009).

Una vez asegurado que nuestro aislado se corresponde con *G. intestinalis*, mediante el *software* MEGA-X 11 v11.0.13 se alineó cada secuencia a estudio con las secuencias de referencia de la base de datos pública GenBank que se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Secuencias de referencia de GenBank empleadas para la tipificación de *G. intestinalis*.

GENOTIPO	SUBGENOTIPO	Secuencias <i>gdh</i> *	Secuencias <i>bg</i> *
A	I	<a href="#">L40509</a>	<a href="#">AY655702</a>
	II	<a href="#">L40510</a>	<a href="#">AY072723</a>
	III	<a href="#">EU637582</a>	<a href="#">AY072724</a>
B	III	<a href="#">AF069059</a>	<a href="#">AY072727</a>
	IV	<a href="#">L40508</a>	

\*Las secuencias de referencia completas de *gdh* y *bg* quedan detalladas en el Anexo II.

Con el análisis de las secuencias y cromatogramas es posible obtener el genotipo y subgenotipo, además de estudiar la presencia de polimorfismos. Se consideró la posible coinfección de varios subgenotipos cuando se localizaron 3 o más dobles picos en el cromatograma que se identificaban por secuencia con dos subgenotipos diferentes.

#### 3.7.4.2. *Blastocystis* sp.

Para el estudio de *Blastocystis* sp., se evaluaron las secuencias de *ssu* ADNr, empleando la base de datos pública *Public databases for molecular typing and microbial genome diversity of Blastocystis sp.* (PUBMLST *Blastocystis*) (<http://pubmlst.org/Blastocystis/>) desarrollada por Rune Stensvold y Graham Clark (Stensvold & Clark, 2016b). Mediante la opción *Blastocystis typing* > *Sequence query* se obtiene información del subtipo y alelo de *Blastocystis* sp. al que pertenece la secuencia a estudio.

Los *locus* empleados como referencia para nuestro trabajo se corresponden con un fragmento de la secuencia completa de *ssu* ADNr, denominada *18S\_rRNA\_barcode* en PUBMLST *Blastocystis*. Estas secuencias tienen aproximadamente 350 pb y muestran divergencias entre distintos subtipos y alelos, con variaciones que, en algunos casos, pueden reducirse a un único nucleótido entre dos alelos dentro de un mismo subtipo (Stensvold, 2013).

Se consideró una identificación correcta cuando existía una correlación  $\geq 98\%$  con la secuencia de referencia de la base de datos, teniendo en cuenta que la aparición de dos o más mutaciones puntuales con respecto a la secuencia de referencia podría indicar que el organismo a estudio represente un nuevo alelo dentro de un subtipo conocido (Stensvold & Clark, 2016b).

### 3.7.5. Estudio de cambios aminoacídicos

En el estudio genético de *Giardia intestinalis*, una vez detectada la presencia de SNPs en nuestras secuencias, se llevó a cabo un análisis de la posible implicación de estos polimorfismos en las proteínas resultantes.

#### 3.7.5.1. Glutamato deshidrogenasa

La traducción de los genes de referencia de GenBank empleados en el estudio de *gdh*, presentan los siguientes identificativos: [AAB00474](#) (proteína derivada de la traducción del gen L40510, AII), [AAD54621](#) (AF069059, BIII) y [AAB00475](#) (L40508, BIV).

Como enzima completa de referencia para facilitar la localización de las mutaciones observadas en nuestras secuencias, se empleó la secuencia de referencia de GenBank [XP\\_001707257](#) cuyas características quedan plasmadas en la Tabla 14, obtenidas a partir de la herramienta *Interpro* (EMBL-EBI, Hinxton, UK; <https://www.ebi.ac.uk/Interpro/>).

**Tabla 14.** Secuencia de referencia de GenBank XP\_001707257: proteína completa *NADP-specific glutamate dehydrogenase* [*Giardia intestinalis*].

MPAQTIEELIAVIKQRDGHMTEFRQAVEEVVDSLKVIFEREPKYIPIFERMLEPERVIIFRVPWMDDAGRI  
 NVNRGFRVQYNSALGPYKGLRFHPSVNLKFLGFEQILKNSLTTLPMGGGKGGSDFDPKGKSDN  
 EVMRFCQSEFMTELQRHVGADTDVPAGDIGVGAREIGYLYGOYKRLRNEFTGVLTKGNV/KWGGSFIRPE  
 ATGYGAVYFLEEMCKDNNTVIRGKNVLLSGSGNVAQFACEKLIQLGAKVLTFSDSNGTIVDKDGFNEE  
 KLAHLMYLNKNEKGRVSEFKDKYPSVAYYEGKKPWECFEGQVDCIMPCATQNEVSGDDATRLVGLGL  
 KFVAEGANMPSTAEAVHVYHAKGVMYGPAKASNAGGVSVSGLEMSQNSVRLQWTAEEVDQKLRGIM  
 RGIFVACRDTAKKYGHPKNYQMGANIAGFLKVADSMIEQGCV

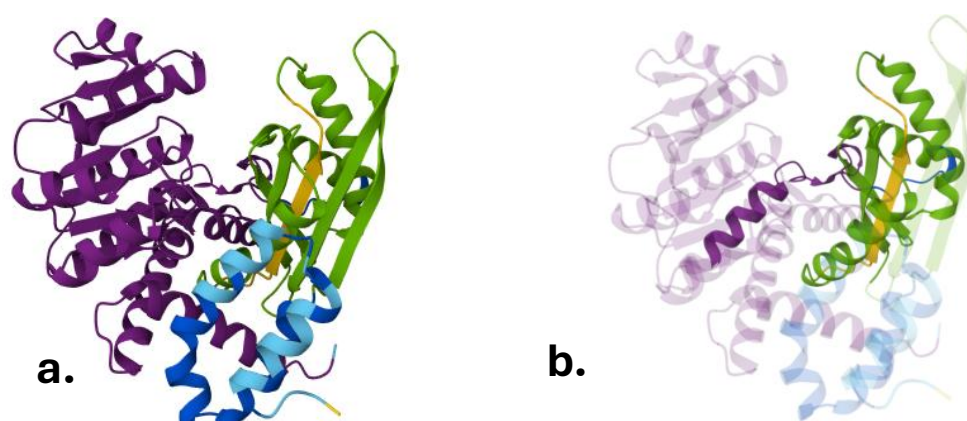
**Destacado:** centro activo; **Rojo:** lisina conservada; **Verde:** Dominio de dimerización; **Morado:** Dominio de unión al cofactor Nicotin Adenin Dinucleótido (NAD(P)+); **Subrayado:** región a estudio debido a la PCR convencional empleada frente a *gdh*.

De los 229 aminoácidos de las proteínas AAB00474 (AII), AAB00475 (BIV) y AAD54621 (BIII), los analizados en este estudio fueron 131 y se disponen entre las posiciones 86 y 216 de la secuencia completa de referencia XP\_001707257 que está formada por 449 aminoácidos. Este tramo se encuentra subrayado sobre la secuencia anterior de la Tabla 14.

Remarcado en amarillo se muestran los residuos que conforman el centro activo de la enzima; compuesto por 14 aminoácidos que ocupan las posiciones de la 119 a la 132 de XP\_001707257. Contiene una región rica en glicina (G) y un residuo de lisina central (K) conservado (marcado en rojo en la Tabla 14), que está implicado en la actividad catalítica enzimática, la cual consiste en una reacción reversible de desaminación oxidativa.

Encontramos dos dominios imprescindibles para que la enzima sea funcional. La región de dimerización, que se extiende entre los aminoácidos 54 y 181 (verde en la Tabla 14), es un dominio estructural clave que media la interacción entre subunidades del ensamblaje hexamérico final (Park et al., 1998). Esta interacción es crucial para la función enzimática, ya que problemas en la oligomerización pueden afectar a la estabilidad, actividad catalítica y regulación de la enzima. El segundo dominio, que engloba los aminoácidos del 192 al 448, se trata del dominio de unión al NAD(P)<sup>+</sup>, cofactor de la reacción enzimática (morado en la Tabla 14).

La estructura terciaria de GDH se encuentra conformada por estructuras secundarias alfa hélice ( $\alpha$ -hélice), lámina beta ( $\beta$ -lámina) y diferentes giros sin estructura secundaria definida. En la Figura 22 se visualiza esta estructura obtenida de la base de datos de *AlphaFold* (EMBL-EBI, Hinxton, UK; <https://AlphaFold.ebi.ac.uk/>) (Jumper et al., 2021).



**Figura 22.** (a.) Estructura terciaria de GDH obtenida de *AlphaFold* (<https://AlphaFold.com/>) (b.) y remarcando la región diana a estudio (131 aminoácidos). Referencia: AF-A0A0F6PNH3-F1. El dominio de unión al cofactor NAD(P)<sup>+</sup> aparece en morado, el dominio de dimerización se muestra en verde, englobando al centro activo (amarillo) que está formado principalmente por una  $\beta$ -lámina.

### 3.7.5.2. $\beta$ -giardina

La traducción de los genes de referencia de GenBank empleados en el estudio de *bg*, AY072723 como subgenotipo All y AY072727 como genotipo B, presentan los identificativos [AAL67658](#) y [AAL67662](#), respectivamente.

La secuencia completa de referencia de la proteína BG con el identificador de GenBank [XP\\_001705425](#), fue la empleada como referencia para la localización de las mutaciones a estudio. Las características de su secuencia obtenidas a partir de *Interpro* (EMBL-EBI, Hinxton, UK; <https://www.ebi.ac.uk/Interpro/>) se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Secuencia de referencia de GenBank XP\_001705425: proteína completa Beta-Giardina [*Giardia intestinalis*].

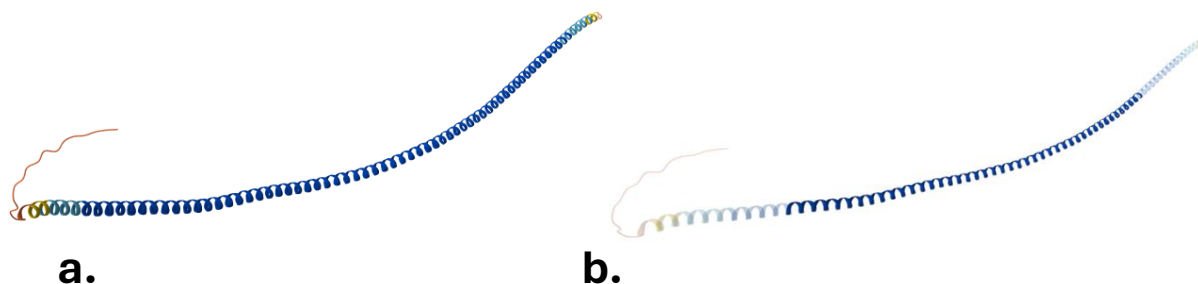
MSMFTSTRTLTQTMDKPDDLRSATETAVKLSNMNQRVSRFHDKMENEIEVRRVDDDDTRVKMIKDAIA  
 HLDRLIQTESRKRQASFEDIREEVKKSADNMYLTIKEEIDTMAANFRKSLAEMGDTLNNVETNLQNQIAI  
 HNDIAIALRKEALKSLNDLETGIATENAERKKMYDQLNEKVAEGFARISAAIEKETIARERAVSAATTEALT  
 NTKLVEKCVNEQLENVASEIRAIQEEIDREKAERKEAEDKIVNTLEDVVSKIQGGLSMVTKH

**Verde:** Dominio amino-terminal (HEAD) con estructura no helicoidal; **Morado:** Dominio carboxi-terminal (ROD) con estructura helicoidal; **Subrayado:** región a estudio debido a la PCR convencional empleada frente a *bg*.

Los 157 aminoácidos estudiados, según los cebadores de PCR empleados, se encuentran subrayados en la secuencia anterior de la Tabla 15, y engloban del residuo 54 al 210 de la secuencia completa de referencia XP\_001705425, la cual está conformada por 272 aminoácidos en total.

La estructura tridimensional de esta proteína BG se basa fundamentalmente en dos dominios, el amino-terminal (HEAD, marcado en verde en la Tabla 15 y anaranjado en la Figura 23) con  $\approx 30$  aminoácidos de longitud, que muestra una estructura no helicoidal; y el dominio carboxi-terminal (ROD, marcado en morado en la Tabla 15 y predominantemente azul en la Figura 23) que cuenta con  $\approx 250$  aminoácidos y presenta una estructura principalmente  $\alpha$ -helicoidal ( $\alpha$ -hélice) con formación de hélices superenrolladas (*coil*) (Holberton et al., 1988). La estructura final es

fundamental para garantizar la integridad estructural del citoesqueleto del parásito, además de jugar un papel importante en su patogenicidad.



**Figura 23.** (a.) Estructura terciaria de BG obtenida de *AlphaFold* (<https://AlphaFold.com/>) (b.) y remarcando la región diana a estudio (157 aminoácidos). Referencia: AF-P15518-F1.

### 3.7.6. Análisis filogenético

Con la intención de hacer un análisis más profundo de los aislados, se elaboró un estudio de las relaciones evolutivas de cada secuencia de nucleótidos obtenida a partir de la secuenciación Sanger. Para ello, además de las secuencias de este trabajo se emplearon otras secuencias relacionadas recabadas de GenBank. En los siguientes subapartados se detallan las características de dichas secuencias según el protista a estudio.

Este análisis se llevó a cabo con el programa *MEGA-X 11 v11.0.13* realizando una representación gráfica mediante árboles filogenéticos de cada uno de los protistas y genes. Específicamente se empleó el método de agrupamiento de vecinos o, en inglés, *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987), árbol aditivo donde la longitud de sus ramas indica las distancias entre las secuencias que relacionan, según las diferencias o semejanzas entre éstas. Para el cálculo de estas distancias evolutivas se utilizó el modelo de acúmulo de sustituciones más adecuado, seleccionado a partir de *MEGA-X* según criterios de información Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC). Se representaron los árboles a escala.

El soporte estadístico se llevó a cabo mediante 1000 simulaciones o réplicas de *Bootstrap*, para asociar un intervalo de confianza a cada árbol creado (Felsenstein, 1985). Los valores en porcentaje de *Bootstrap* se plasmaron en cada punto de bifurcación de las ramas de los árboles.

Los valores de *Bootstrap* por encima de 95% garantizan un alto respaldo estadístico, siendo deseable un valor superior al 80%. Valores muy inferiores representan un soporte estadístico bajo, por lo que, en aquellos árboles filogenéticos en los que alguna de las ramas obtuvo un valor de soporte estadístico inferior a 80, se modificó a un árbol condensado, donde las ramas de baja

significancia se eliminan. En este tipo de árbol se enfatiza en los patrones de ramificación o topología del árbol, pero sin que la longitud de las ramas sea proporcional a la cantidad de sustituciones de nucleótidos.

### 3.7.6.1. *Blastocystis* sp.

Para el estudio evolutivo del *ssu* ADNr de *Blastocystis* sp. se emplearon, además de las secuencias obtenidas en este estudio, los *18S\_rRNA\_barcode* correspondientes a ST1 [alelo 2](#) y [75](#), ST2 [alelo 10](#) y [68](#), ST3 [alelo 35](#) y [136](#), ST4 [alelo 90](#) y [94](#), ST5 [alelo 18](#), ST6 [alelo 124](#) y [125](#), ST7 [alelo 40](#), [104](#) y [137](#) y ST9 [alelo 120](#), descargados de la base de datos PUBMLST *Blastocystis*.

Como grupo externo se utilizó la secuencia de referencia [AY730405](#) de *ssu* ADNr de *Dientamoeba fragilis*.

### 3.7.6.2. *Giardia intestinalis*

#### 3.7.6.2.1. *Glutamato deshidrogenasa*

Se incluyeron en este análisis las secuencias de referencia empleadas como molde en el análisis de secuenciación de *gdh*. Un total de 392 pb que se corresponden con los nucleótidos entre las posiciones 84 y 476 de L40509 (AI), L40510 (AII) y L40508 (BIV) y el tramo 48-440 de AF069059 (BIII).

Se añadieron secuencias correspondientes a otros genotipos asociados a animales, realizando el análisis sobre los nucleótidos entre las posiciones 84 y 476 de estas secuencias, [U60984](#) como genotipo C y [U60986](#) como genotipo D, representantes del género *Giardia* aisladas de perros, [U47632](#) como genotipo E aislado de ungulados domésticos y, por último, [AF069057](#) como genotipo F derivado de un gato.

Se empleó como grupo externo la secuencia de *gdh* de *Spironucleus vortens* [AF533883](#) (el tramo del nucleótido 87 al 479), flagelado dentro del Orden Diplomonadida como *Giardia intestinalis*.

#### 3.7.6.2.2. $\beta$ -giardina

En el análisis filogenético de las secuencias de *bg* se incluyeron las secuencias de referencia anteriormente descritas para el estudio MLST de *Giardia intestinalis*, AY072723 (AII), AY072724 (AIII) y AY072727 (B), específicamente se estudiaron 474 pb correspondientes a los nucleótidos entre las posiciones 111 y 585 de estas secuencias. Además, se añadieron secuencias de

genotipos zoonóticos, [AY545646](#) como genotipo C (tramo 19-493 nucleotídico) y [AY545647](#) genotipo D (tramo 111-585 nucleotídico) aislados de perros, [AY072729](#) como genotipo E1 (tramo 111-585 nucleotídico) derivado de heces humanas, [AY545650](#) como genotipo E11 (tramo 19-458 nucleotídico) y [AY647264](#) como genotipo F (tramo 111-585 nucleotídico).

En este caso no se pudo emplear ningún grupo externo al tratarse BG de una proteína estructural única de *G. intestinalis*.

### 3.8. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

Para el análisis de la anamnesis, patologías y datos de interés asociados al episodio clínico activo por el que el paciente remitía la muestra de heces al servicio de Microbiología y Parasitología del hospital, se empleó la plataforma *GestLab* (Clinisys, Alicante, España) Sistema de Información de Laboratorio (SIL) que documenta las pruebas analíticas y microbiológicas realizadas, y los programas *Mizar* (Orion Clinic) y Sistema de Información Ambulatorio (SIA) *ABUCASIS* de la Agencia Valenciana de Salud (AVS), empleados para gestionar los historiales médicos de los pacientes, conectando la información de atención primaria y especializada.

Los datos sociodemográficos recabados fueron sexo, edad, país de nacimiento y la constancia de viajes recientes al extranjero (1-2 meses previos a la remisión de la muestra), siempre manteniendo el anonimato del paciente sin aportar ningún dato identificativo.

Se documentaron los siguientes síntomas y signos por los que el paciente acudía a consulta médica: diarrea aguda, diarrea crónica, estreñimiento, dolor abdominal, náuseas, vómitos, dispepsia o epigastralgia, meteorismo o flatulencias, heces de consistencia o apariencia anormal (heces tipo 1, 2, 5, 6 o 7 en la escala de heces de Bristol (Parés et al., 2009), con presencia de moco y/o sangre o con alteración del color con respecto al tono marrón fisiológico), incontinencia fecal o urgencia deposicional, proctalgia o rectorragia, prurito anal, fiebre, prurito generalizado, pérdida de peso, astenia y eosinofilia (considerando eosinofilia cuando se observa una elevación de eosinófilos en sangre periférica por encima del 4%).

La existencia de pacientes que remitieron muestras de heces sin clínica asociada, fue debido a la realización de exámenes de salud en la población por diferentes motivos, como estudio por presentar familiares cercanos o convivientes con parásitos en heces, posibles transmisores de enteropatógenos debido a la implicación en manipulación de alimentos, exámenes de salud por procedencia de países con alta prevalencia parasitaria, analíticas alteradas que apuntan a posible parasitación (Ej: eosinofilia) o estudios por tratamientos inmunosupresores severos.

Además, se estudiaron las coinfecciones parasitarias observadas mediante microscopía óptica y se anotó la presencia de otras afectaciones gastrointestinales (no infecciosas) que pudiesen explicar la clínica, si existían patologías alérgicas y/o inmunosupresión. Se consideraron inmunodeprimidos los pacientes que presentaron condiciones o tratamientos reconocidos por comprometer la inmunidad, conforme a criterios del CDC para individuos “moderada o severamente inmunocomprometidos” (CDC, 2025). Esto incluye receptores de trasplantes en tratamiento inmunosupresor, pacientes con neoplasias hematológicas activas, personas con VIH mal controlado o avanzado, y otros sujetos bajo tratamiento inmunosupresor prolongado.

### 3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para llevar a cabo el análisis estadístico se empleó el programa *IBM® SPSS® Statistics V25.0* (Armonk, Nueva York, EE.UU.).

La mayor parte de las variables estudiadas fueron categóricas, por lo que la prueba estadística mayoritariamente empleada fue la de Chi-cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ). En aquellas tablas de contingencia en las que se compararon únicamente dos grupos independientes y en alguna de las celdas existían datos con valor inferior a 5, se utilizó la prueba exacta de Fisher (F) en lugar de  $\chi^2$ .

En el caso de obtener significación estadística ( $p < 0,05$ ) mediante las pruebas  $\chi^2$  o F, se realizaron comparaciones múltiples o por pares corrigiendo los valores de significancia mediante el método de Benjamini-Hochberg, ajustando el umbral de significancia para evitar errores de Tipo I. El grado de asociación entre las variables se calculó mediante la V de Cramer (V), interpretándose un valor de 0–0,3 como asociación débil, de 0,3–0,5 como asociación media o moderada, y valores  $\geq 0,5$  como asociación fuerte. En los casos que existiese aplicabilidad, para establecer la relación binaria entre dos variables, se calculó la razón de probabilidades (en inglés *Odds Ratio*, OR) con un intervalo de confianza del 95% (IC95).

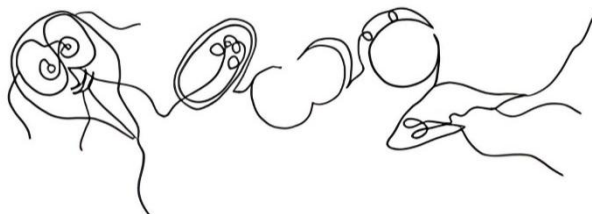
Por otro lado, cuando en el análisis estadístico se disponía de una variable cuantitativa, se evaluó si los datos de esta variable seguían una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk (W). Si se rechaza la hipótesis de normalidad, para comparar la igualdad de distribución entre dos grupos independientes, se empleó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (U) y, para más de dos grupos, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (H). En el caso de reportar la existencia de significancia estadística ( $p < 0,05$ ), se determinó a qué nivel se establecían estas diferencias gracias a comparaciones entre parejas *post hoc*.

Por otro lado, si al analizar una variable cuantitativa se aceptó la hipótesis de normalidad mediante W, el análisis estadístico se realizó sobre la media de los datos. En primer lugar, mediante la prueba de Levene (F) se evaluó la homogeneidad de varianzas y, finalmente, para dos grupos independientes, se empleó la prueba t de Student (T-test, T).

Además, se llevó a cabo un análisis de la qPCR para la identificación de *Giardia intestinalis*, estudiando la tasa de éxito en la secuenciación mediante curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) estableciendo el umbral de discriminación en un 95% de especificidad.



## 4. RESULTADOS





#### 4.1. MUESTRAS Y POBLACIÓN A ESTUDIO

En el periodo comprendido entre el 1 de junio de 2017 y el 30 de agosto de 2019 se analizaron un total de 8437 muestras de heces correspondientes a 6987 pacientes.

##### 4.1.2. Análisis de rutina con microscopía óptica: prevalencia parasitaria

Mediante microscopía óptica, se observaron formas parasitarias en 983 heces (11,6%) de las 8437 recibidas en el Servicio de Microbiología y Parasitología del H.U.P. La Fe, identificándose 566 (6,7%) aislados de *Blastocystis* sp. y 217 (2,6%) de *Giardia intestinalis*. Se consiguieron seleccionar 332 (58,7%) muestras con *Blastocystis* sp. para realizar estudio molecular. En el caso de *G. intestinalis*, 172 (79,3%) muestras pudieron ser remitidas al ISCIH para identificación y caracterización molecular. Las pérdidas se debieron a que el volumen de heces recibido solo fue suficiente para diagnóstico clínico, sin remanente para los estudios moleculares posteriores (< 200 mg).

Para el cálculo real de la prevalencia, se eliminaron aquellas muestras de heces con aislamientos repetidos (mismo protista intestinal) dentro del mismo episodio clínico, considerando un nuevo episodio cuando el lapso entre una muestra y otra fue de 6 meses o más. En total, se documentaron 7361 episodios clínicos con 839 muestras positivas (11,4%). La mayor prevalencia documentada fue para *Blastocystis* sp. con 470 aislados (6,4%), seguido de *G. intestinalis* detectada en 203 heces (2,8%) y *E. nana* con 179 positivos (2,4%); existiendo una prevalencia muy inferior para el resto de los parásitos (Tabla 16).

Un 5,0% (n=353) de los 6987 pacientes totales, presentaron varios episodios clínicos, remitiendo diferentes muestras de heces al laboratorio durante los dos años de estudio, donde en 128 (36,3%) se observaron formas parasitarias en más de una ocasión.

De los 128 pacientes que padecieron varias infecciones parasitarias, en 20 pacientes se repitió el aislamiento del mismo o de los mismos parásitos después de 6 meses del primer episodio clínico; en 12 ocasiones *Blastocystis* sp. volvió a aislarse, se confirmaron 4 pacientes con reinfecciones o persistencia crónica de *G. intestinalis* y se repitió el aislamiento en 6 pacientes de *Endolimax nana* y en uno de *Entamoeba coli*.

Los valores detallados de prevalencia de todos los parásitos observados por microscopía se muestran en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Prevalencia parasitaria obtenida por microscopía óptica (N=7361).

Parásito	Número de aislados	%
<i>Blastocystis</i> sp.	470	6,4
<i>Giardia intestinalis</i>	203	2,8
<i>Endolimax nana</i>	179	2,4
<i>Dientamoeba fragilis</i>	34	0,5
<i>Entamoeba coli</i>	22	0,3
<i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	10	0,1
Otras <i>Entamoebas</i>	26	0,3
<i>Enterobius vermicularis</i> *	11	0,1
<i>Cryptosporidium</i> sp.†	6	0,08
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	0,01
<i>Taenia saginata</i>	1	0,01

\*Detección por microscopía en heces, no se muestran resultados de estudio por Test de Graham

†Detección mediante tinción Ziehl-Neelsen modificada

#### 4.1.2.1. Coinfecciones

En cuanto a los casos de multiparasitismo detectado, en 113 heces de las 839 positivas (13,5%) se observaron dos o más parásitos diferentes por microscopía óptica, siendo un 85,8% (n=97) biparasitismo y el resto, triparasitismo, sin ningún caso en el que se observase coexistencia de más de 3 parásitos. La principal coinfección fue de *Blastocystis* sp. y *Endolimax nana* en 58 de las 113 muestras (51,3%), observando, además, en 3 de estos pacientes, *Giardia intestinalis*, en 1 *D. fragilis* y en 8 alguna de las diferentes especies de *Entamoeba*.

En 24 ocasiones (21,2%) se observó *Blastocystis* sp. junto con *G. intestinalis*, encontrando, a su vez, en 2 de estos pacientes *E. nana* y en otro *D. fragilis*.

#### 4.1.3. Análisis sociodemográfico

##### 4.1.3.1. Muestras y población

La edad media de los 7361 pacientes fue de  $30,5 \pm 25,0$  años. Se establecieron 3 grupos de edad, siguiendo criterios demográficos comúnmente empleados para definir etapas de vida con

características biológicas, sociales y de vulnerabilidad diferentes: niños/as (0-14 años), adultos (15-64 años) y ancianos/as ( $\geq 65$  años). La distribución de pacientes para cada grupo fue de 40,7% (n=2996) niños/as, 47,0% (n=3461) adultos y 12,3% (n=904) ancianos/as.

En cuanto al sexo, el 54,1% (n=3982) fueron mujeres y los restantes 45,9% pacientes (n=3379), hombres.

Las muestras recibidas de cada Centro de Salud y Consultorios Médicos, divididos en las diferentes zonas de Valencia, se muestran en la Tabla 17. Se recogieron un mayor número de muestras procedentes de la zona norte (61,3%, n=4510) con respecto a la zona sur (22,3%, n=1642). Cabe destacar el elevado número de pacientes de otras Áreas de Salud de Valencia y residentes de fuera de la Comunidad Valenciana (16,4%, n=1209).

**Tabla 17.** Distribución de muestras de heces recibidas por zonas de salud.

Zonas	Centros de Salud y Consultorios Médicos correspondientes	N	%
Norte	Campanar	770	10,5
	Just Ramírez	759	10,3
	Trinitat	889	12,1
	Miguel Servet + Azucena (Benicalap)	849	11,5
	Salvador Allende	783	10,6
	Juan XXIII	460	6,2
	Total de Norte	4510	61,3
Sur	Albal	306	4,2
	Alcácer	236	3,2
	Catarroja	553	7,5
	Massanassa	189	2,6
	Silla	330	4,5
	Beniparrell	28	0,4
	Total de Sur	1642	22,3
	Hospital La Fe	75	1,0
	Otros hospitales	1134	15,4
	Total de otras zonas	1209	16,4

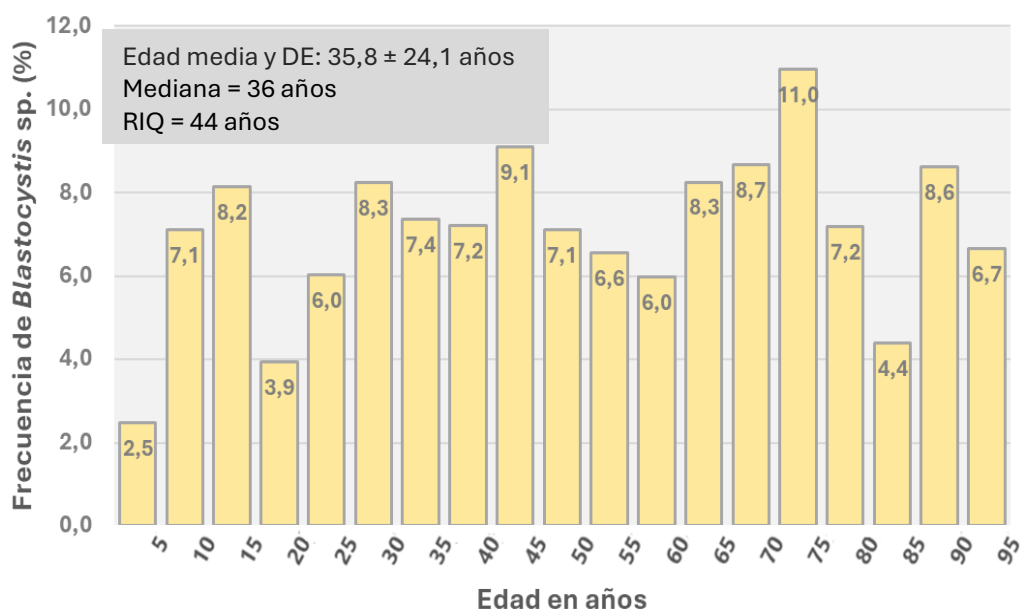
La proporción de muestras recibidas según la estación del año fue superior en verano (21 de junio al 21 de septiembre) con un 28,3% (n=2080), seguido de primavera (21 de marzo a 20 de junio)

con un 26,5% (n=1953), otoño (22 de septiembre al 21 de diciembre) con 23,6% (n=1741) e invierno (22 de diciembre al 20 de marzo) con un 21,6% (n=1587).

#### 4.1.3.2. *Blastocystis* sp.

La edad media de los pacientes con *Blastocystis* sp. fue de  $35,8 \pm 24,1$  años, mientras que la edad media de los pacientes sin este protista fue menor,  $30,2 \pm 25,1$  años. La distribución de la edad no cumplía con la normalidad ( $W(7361) = 0,154$ ;  $p < 0,001$ ), siendo más coherente en este caso analizar los datos de mediana y rango intercuartílico (RIQ) de ambos grupos; 36 años (RIQ: 44 años) para el grupo de pacientes con *Blastocystis* sp. y 26 años (RIQ: 43 años) para los individuos sin el protista. Finalmente, mediante U de Mann-Whitney, se determinó que existían diferencias en la distribución de la edad entre ambos grupos ( $U(1) = 1.873.502,5$ ;  $p < 0,001$ ).

Como queda reflejado en la Figura 24, la mayor tasa de positivos la encontramos en el rango de edad que comprende los 70-75 años con un 11,0% (n=24/219) de pacientes con *Blastocystis* sp.



**Figura 24.** Frecuencia de *Blastocystis* sp. según rangos de edad.

DE: Desviación estándar; RIQ: Rango intercuartílico.

En el estudio por grupos de edad, se observó una menor prevalencia de *Blastocystis* sp. en niños/as (4,9%) en comparación con adultos (7,1%) y ancianos/as (8,5%) (Tabla 18), con diferencias significativas entre los tres grupos, con una asociación débil ( $\chi^2(2) = 20,134$ ;  $p < 0,001$ ;  $V = 0,052$ ). El análisis por pares entre grupos determinó que las diferencias se encontraban entre niños/as con adultos ( $p = 0,001$ ) y ancianos/as ( $p < 0,001$ ), pero no entre estos dos últimos.

**Tabla 18.** Distribución de la edad en los pacientes con *Blastocystis* sp.

Grupos de edad	N	Número de positivos (%)
Niños/as (0-14 años)	2996	148 (4,9)
Adultos (15-64 años)	3461	245 (7,1)
Ancianos/as (≥65 años)	904	77 (8,5)
<b>Total</b>	<b>7361</b>	<b>470</b>

En cuanto al sexo, la proporción de pacientes con aislamientos de *Blastocystis* sp. y aquellos sin él, fue similar para hombres y mujeres ( $\chi^2$  (1) = 1,374; p=0,241), con un 6,7% (228/3379) de mujeres positivas y un 6,1% (242/3982) de hombres.

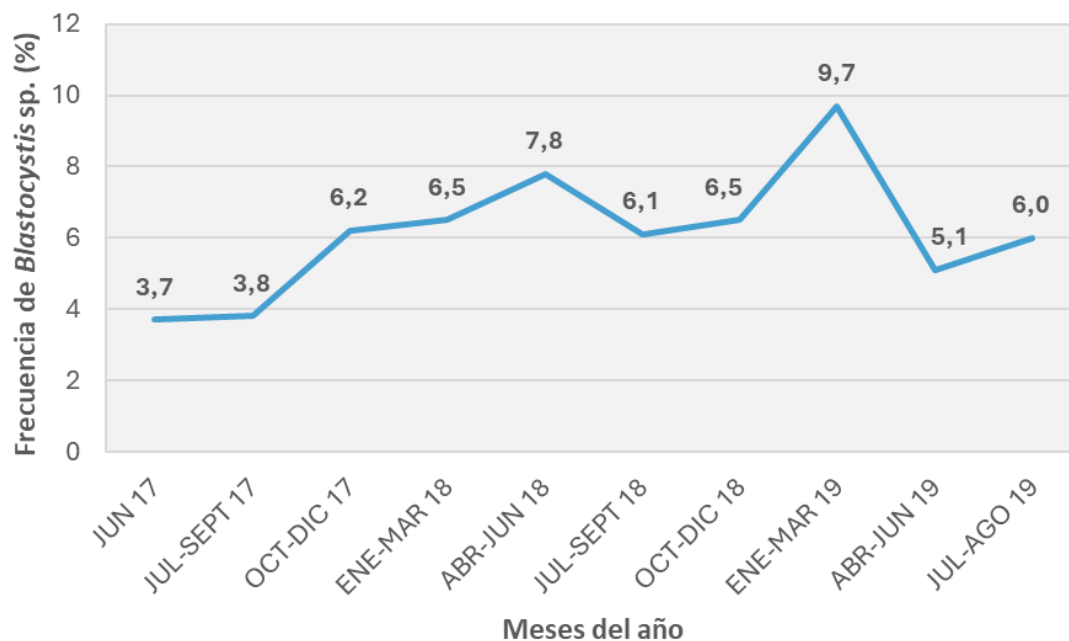
La distribución de muestras positivas por zonas y Centros de Salud se muestra en la Tabla 19.

**Tabla 19.** Prevalencia de *Blastocystis* sp. por zonas de salud.

Zonas	Centros de Salud y Consultorios Médicos correspondientes	N	Positivos (%)
Norte	Campanar	770	53 (6,9)
	Just Ramírez	759	<b>71 (9,3)</b>
	Trinitat	889	54 (6,1)
	Miguel Servet + Azucena (Benicalap)	849	47 (5,5)
	Salvador Allende	783	<b>66 (8,4)</b>
	Juan XXIII	460	26 (5,7)
	Total de Norte	4510	317 (7,0)
Sur	Albal	306	13 (4,2)
	Alcácer	236	11 (4,7)
	Catarroja	553	30 (5,4)
	Massanassa	189	8 (4,2)
	Silla	330	19 (5,8)
	Beniparrell	28	2 (7,1)
	Total de Sur	1642	83 (5,0)
	Hospital La Fe	75	2 (2,7)
	Otros hospitales	1134	68 (6,0)
	Total de otras zonas	1209	70 (5,8)

El número de muestras totales recibidas del norte de la ciudad es superior a las del sur (4510 frente a 1642 muestras) obteniéndose una mayor proporción de *Blastocystis* sp. en la zona norte (7,0% frente a 5,0%), con diferencias significativas en el porcentaje de aislamientos de *Blastocystis* sp. entre muestras que proceden de una zona y otra ( $\chi^2 (1) = 7,716$ ;  $p=0,005$ ; OR = 1,42; IC 95%= 1,108-1,821; V=0,035). Además, en el análisis estadístico por Centros de Salud y Consultorios Médicos también se evidenció la asociación significativa entre el lugar de procedencia de la muestra y la tasa de positivos de *Blastocystis* sp. ( $\chi^2 (13) = 26,664$ ;  $p=0,014$ ; V=0,060). En particular, se observó una proporción significativamente mayor de pacientes con *Blastocystis* sp. en el CAP Salvador Allende (junto con el Consultorio Médico de Arquitecto Tolsá) (8,4%, 66/783;  $p=0,013$ ) y en el CAP Just Ramírez (junto con el Consultorio de Tendetes) (9,3%, 71/759;  $p<0,001$ ), en comparación con el resto de centros (resaltados en la Tabla 19).

La frecuencia de *Blastocystis* sp. según los años a estudio sufre de un aumento gradual desde un 4,9% (86/1756) en 2017, pasando por un 6,7% (225/3342) en 2018, hasta alcanzar un 7,0% (159/2263) en el año 2019 ( $\chi^2 (2) = 8,731$ ;  $p=0,013$ ), obteniendo un pico máximo de hasta un 9,7% (82/849) en los meses de enero a marzo de 2019 (Figura 25).



**Figura 25.** Evolución temporal de la frecuencia de *Blastocystis* sp.

Sin embargo, en cuanto a la estacionalidad, el número de muestras positivas se mantuvo constante durante todas las estaciones del año ( $\chi^2 (3) = 7,086$ ;  $p=0,069$ ) (Tabla 20), aunque con un ligero repunte en los meses de invierno (7,5%, 119/1587), a expensas del pico máximo encontrado en los meses de enero a marzo de 2019.

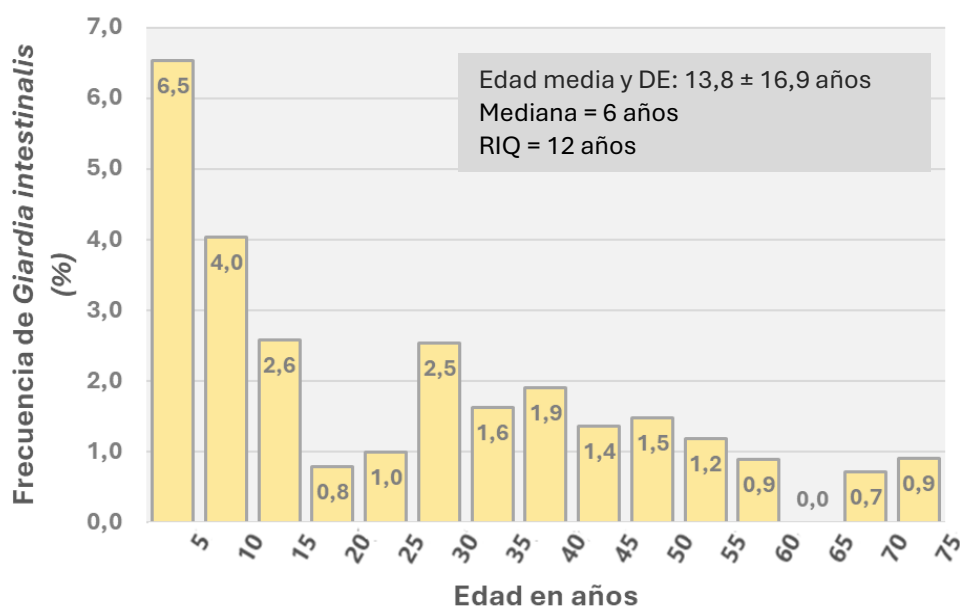
**Tabla 20.** Distribución de *Blastocystis* sp. según la estación del año.

Estación del año	N	Número de positivos (%)
Primavera	1953	120 (6,1)
Verano	2080	113 (5,4)
Otoño	1741	118 (6,8)
Invierno	1587	119 (7,5)
<b>Total</b>	<b>7361</b>	<b>470 (6,4)</b>

#### 4.1.3.3. *Giardia intestinalis*

La edad media de los pacientes con *Giardia intestinalis* fue de  $13,8 \pm 16,9$  años y la de los pacientes no parasitados fue de  $31,0 \pm 25,0$  años. La mediana y rango intercuartílico (RIQ) de los pacientes con *G. intestinalis* fue de 6 años, RIQ: 12 años, mientras la que de los pacientes sin *Giardia* fue de 28 años, RIQ: 44 años. Debido a que la edad no seguía la normalidad ( $W(7361) = 0,154$ ;  $p < 0,001$ ), mediante U de Mann-Whitney, se determinó que existían diferencias significativas en la distribución de edad de ambos grupos ( $U(1) = 107.179$ ;  $p < 0,001$ ).

La frecuencia de *G. intestinalis* según rangos de edad se muestra en la Figura 26.



**Figura 26.** Frecuencia de *G. intestinalis* según rangos de edad.

DE: Desviación estándar; RIQ: Rango intercuartílico.

Tal y como queda representado en esta Figura 26, la mayor frecuencia observada fue de 6,5% (n=98/1498), correspondiéndose con los niños/as con rango de edad entre 0-5 años, siendo este valor considerablemente superior al resto de franjas representadas. Tras el descenso observado a los 15 años, existe un ligero repunte de casos en los adultos, siendo superior a la prevalencia en ancianos/as, lo que genera una tendencia de gráfica bimodal con pico a los 0-5 años y a los 26-30 años (Figura 26).

El porcentaje de positivos fue mayor en niños/as que en adultos y ancianos/as (5,1%, 1,4% y 0,4%, respectivamente) (Tabla 21). Las diferencias en la prevalencia de *G. intestinalis* entre grupos de edad resultaron significativas, aunque con una asociación débil ( $\chi^2 (2) = 103,265$ ;  $p < 0,001$ ;  $V = 0,118$ ). La frecuencia de *G. intestinalis* fue superior en niños/as con respecto a adultos y ancianos/as ( $p < 0,001$ ) y en adultos frente a ancianos/as ( $p = 0,023$ ).

**Tabla 21.** Distribución de la edad en los pacientes con *G. intestinalis*.

Grupos de edad	N	Número de positivos (%)
Niños/as (0-14 años)	2996	152 (5,1)
Adultos (15-64 años)	3461	47 (1,4)
Ancianos/as ( $\geq 65$ años)	904	4 (0,4)
<b>Total</b>	<b>7361</b>	<b>203 (2,8)</b>

Por otro lado, un mayor porcentaje de hombres (3,3%, 112/3379) presentaron *G. intestinalis* frente a las mujeres (2,3%, 91/3982) ( $\chi^2 (1) = 7,222$ ;  $p = 0,007$ ;  $OR = 1,47$ ;  $V = 0,031$ ). Sin embargo, cuando analizamos el sexo según los grupos de edad propuestos, este análisis estadístico varía, encontrando una proporción de mujeres y hombres con *G. intestinalis* muy similar en todos los casos ( $p > 0,05$ ). En niños/as de 0-5 años (grupo con mayor frecuencia de *G. intestinalis*, 6,5%), un 58,2% (57/98) fueron varones ( $\chi^2 (1) = 1,064$ ;  $p = 0,302$ ). En los adultos, la mayor prevalencia se encontró en el grupo de 26 a 30 años (2,5%), siendo, dentro de este rango de edad, más común en mujeres que en hombres, aunque sin diferencias significativas entre ambos (3,6% [7/193] de mujeres frente a 0,8% [1/121] de hombres,  $F: p = 0,158$ ).

La proporción de muestras positivas para *G. intestinalis* fue similar entre las zonas norte y sur de Valencia (2,7%, 121/4510 y 3,2% 53/1642, respectivamente) ( $\chi^2 (1) = 1,300$ ;  $p = 0,254$ ) y no se estableció ninguna diferencia significativa en la prevalencia del parásito según el Centro de Salud o Consultorio Médico del que procedía la muestra ( $\chi^2 (13) = 12,922$ ;  $p = 0,454$ ) (Tabla 22).

**Tabla 22.** Prevalencia de *Giardia intestinalis* por zonas de salud.

Zonas	Centros de Salud y Consultorios Médicos correspondientes	n	Positivos (%)
Norte	Campanar	770	22 (2,9)
	Just Ramírez	759	28 (3,7)
	Trinitat	889	22 (2,5)
	Miguel Servet + Azucena (Benicalap)	849	23 (2,7)
	Salvador Allende	783	16 (2,0)
	Juan XXIII	460	10 (2,2)
	Total de Norte	4510	121 (2,7)
Sur	Albal	306	5 (1,6)
	Alcácer	236	11 (4,7)
	Catarroja	553	17 (3,1)
	Massanassa	189	6 (3,2)
	Silla	330	13 (3,9)
	Beniparrell	28	1 (3,6)
	Total de Sur	1642	53 (3,2)
Hospital La Fe		75	3 (4,0)
Otros hospitales		1134	26 (2,3)
Total de otras zonas		1209	29 (2,4)

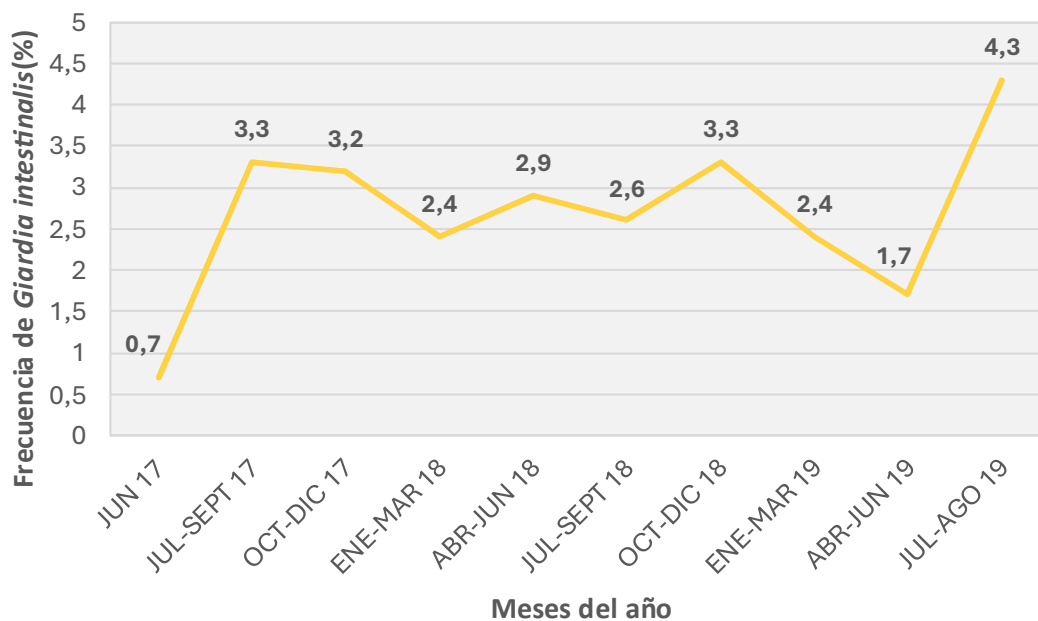
El número de muestras positivas para *G. intestinalis* se mantuvo constante todos los meses del año, sin asociación estadística a ninguna estación concreta ( $\chi^2 (3) = 6,124$ ;  $p=0,106$ ) (Tabla 23).

**Tabla 23.** Distribución de *G. intestinalis* según la estación del año.

Estación del año	N	Número de positivos (%)
Primavera	1953	40 (2,0)
Verano	2080	66 (3,2)
Otoño	1741	55 (3,2)
Invierno	1587	42 (2,6)
<b>Total</b>	<b>7361</b>	<b>203 (2,8)</b>

Además, la frecuencia de este parásito fue muy similar en los tres años de estudio, 2,8% en 2017 y 2018 ( $n=50/1756$  para 2017 y  $n=95/3342$  para 2018) y 2,6% ( $58/2263$ ) en el año 2019 ( $\chi^2 (2) =$

0,463;  $p=0,794$ ). Sin embargo, se observa un claro repunte en los meses de julio y agosto de 2019 (4,3%, 23/533) (Figura 27).



**Figura 27.** Evolución temporal de la frecuencia de *G. intestinalis*.

## 4.2. ANÁLISIS MOLECULAR

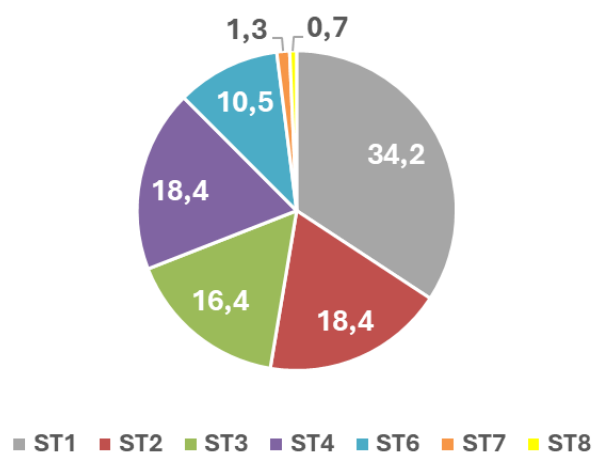
### 4.2.2. *Blastocystis* sp.

#### 4.2.2.1. Identificación y caracterización molecular: variabilidad genética

Se analizaron mediante PCR convencional 332 aislados positivos por microscopía, obteniendo 106 resultados negativos (31,9%) y 23 (6,9%) positivos débiles, con bandas muy tenues en la electroforesis, lo que indica cantidad insuficiente de ADN para obtener una caracterización molecular concluyente. Los 203 productos amplificados restantes se secuenciaron para determinar los subtipos y las mutaciones presentes.

La baja calidad de 23 cromatogramas no permitió la identificación del subtipo, por lo que, finalmente, se consiguieron caracterizar 180 aislados de *Blastocystis* sp. (88,7%, 180/203). Tras eliminar muestras duplicadas dentro de un mismo episodio clínico (< 6 meses), en los que, además, se caracterizó el mismo subtipo/alelo de *Blastocystis* sp. por paciente, se identificaron 152 aislados de *Blastocystis* sp., correspondientes a 152 pacientes diferentes. En 109 muestras se analizaron secuencias consenso y en 43 solo se estudió una de las secuencias obtenidas.

La prevalencia por subtipo fue de 34,2% para ST1 (52/152), seguido de ST2 y ST4 (18,4%, 28/152), ST3 (16,4%, 25/152), ST6 (10,5%, 16/152), ST7 (1,3%, 2/152) y ST8 (0,7%, 1/152) (Figura 28).



**Figura 28.** Frecuencia en porcentaje de los subtipos de *Blastocystis* sp.

La mayor frecuencia alélica se observó en el subtipo 6, detectándose 5 alelos diferentes además de varias coinfecciones de dos alelos del mismo subtipo por muestra (Tabla 24). Cabe destacar un aislado que, aunque se identifica con el subtipo 6, acumula hasta 9 mutaciones con respecto a la secuencia de referencia ST6-Alelo 122 (*18S\_rRNA\_barcode* de <http://pubmlst.org/Blastocystis/>). Se realizó una búsqueda en la base de datos NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y la secuencia con mayor correlación que se obtuvo presentó el número de identificación [MK934340](https://pubmlst.org/Blastocystis/) (ST6-Alelo 122) con un 100% de cobertura y un 98,1% de identidad, correspondiéndose esta discrepancia con las 9 mutaciones descritas a nivel del *18S\_rRNA\_barcode* (Tabla 24) junto con G493T y C502G (Ref: MK934340). Se identificó nuestro aislado como ST6-Alelo indeterminado al no correlacionarse con ningún alelo establecido hasta la fecha, pudiendo incluso tratarse de un nuevo subtipo.

Esta hipervariabilidad de alelos también la encontramos dentro de ST2 y 3, con 4 alelos distintos cada uno, junto con diferentes asociaciones entre éstos, como se muestra en la Tabla 24.

En cuanto a la diversidad genética, los SNPs obtenidos se encontraron en un aislado de ST2-Alelo 11 que mostró la mutación G92R (Referencia: Alelo 11, *18S\_rRNA\_barcode*) y en un ejemplar de ST3-Alelo 34 donde se observó la mutación G334K (Referencia: Alelo 34, *18S\_rRNA\_barcode*).

Por otro lado, los subtipos menos variables genéticamente fueron el subtipo 1 y subtipo 4. Todos los ST1 se correspondieron con el alelo 4 (n=52), mientras que 27 de los 28 ST4 fueron alelo 42, sin ninguna mutación puntual en ambos subtipos.

**Tabla 24.** Diversidad genética hallada en *Blastocystis* sp.

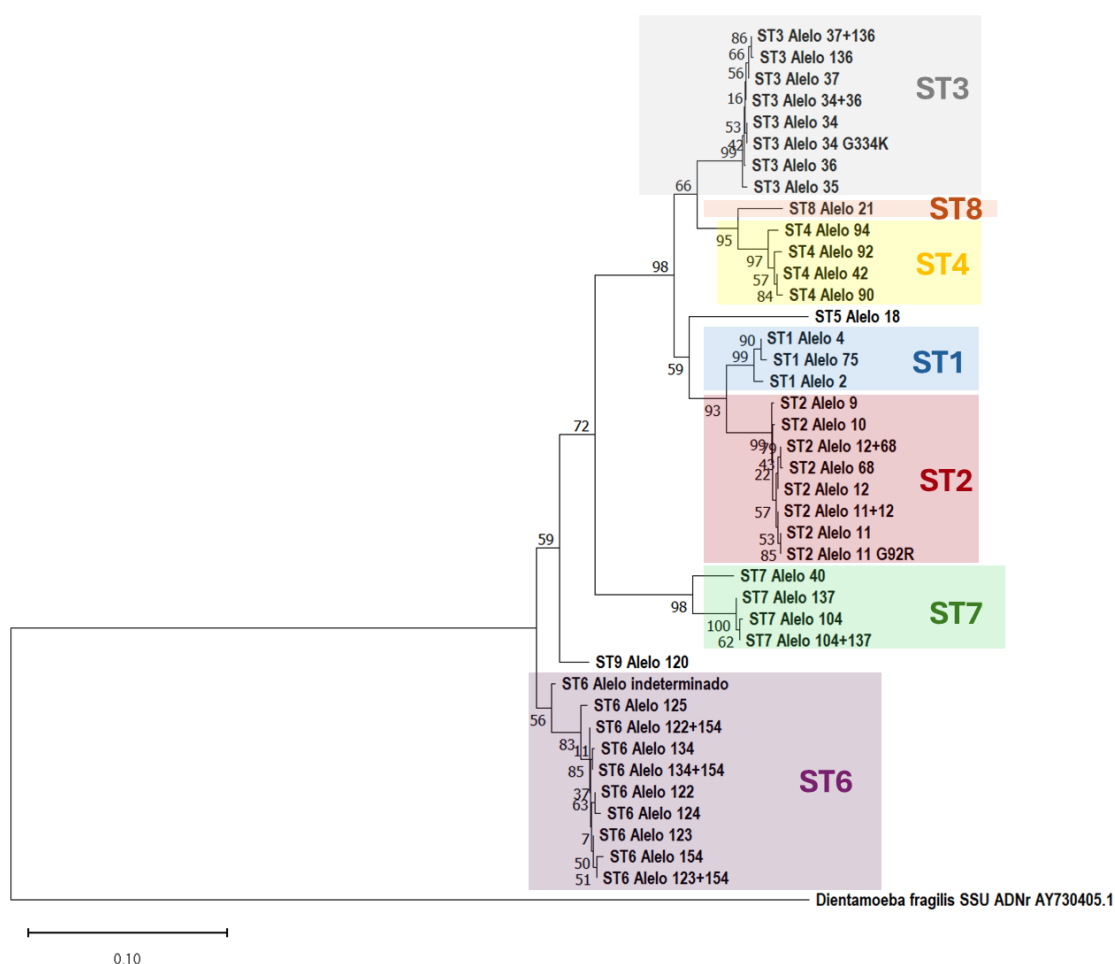
Subtipo	Alelo	N	Referencia de <i>18S_rRNA_barcode</i>	SNPs (n*)
ST1	4	52	<a href="#">Alelo 4</a>	-
	9	1	<a href="#">Alelo 9</a>	-
ST2	11	10	<a href="#">Alelo 11</a>	G92R (1)
	12	12	<a href="#">Alelo 12</a>	-
	11 + 12	4	<a href="#">Alelo 12</a>	A74R (4)
	12 + 68	1	<a href="#">Alelo 12</a>	A155W (1)
ST3	34	19	<a href="#">Alelo 34</a>	G334K (1)
	36	3	<a href="#">Alelo 36</a>	-
	34 + 36	1	<a href="#">Alelo 34</a>	T154W (1)
	37	1	<a href="#">Alelo 37</a>	-
	37 + 136	1	<a href="#">Alelo 37</a>	A153R (1)
ST4	42	27	<a href="#">Alelo 42</a>	-
	92	1	<a href="#">Alelo 92</a>	-
ST6	123	5	<a href="#">Alelo 123</a>	-
	134	3	<a href="#">Alelo 134</a>	-
	154	2	<a href="#">Alelo 154</a>	-
	122 + 154	2	<a href="#">Alelo 122</a>	G64R, T74Y (2)
	123 + 154	2	<a href="#">Alelo 123</a>	T74Y (2)
	134 + 154	1	<a href="#">Alelo 134</a>	G64R (1)
	Indeterminado	1	<a href="#">Alelo 122</a>	G64T, T65C, T82C, T103A, A125G, G126T, C130A, G131T, ins145Y (1)
ST7	99	1	<a href="#">Alelo 99</a>	-
	104 + 137	1	<a href="#">Alelo 104</a>	G103R (1)
ST8	21	1	<a href="#">Alelo 21</a>	-

K: T/G ; R: A/G ; W: A/T ; Y: C/T ; n\*= número de aislados que presentan la mutación.

En la Tabla 24, las mutaciones mostradas en aquellas muestras con coinfección de dos alelos se corresponden con las específicas de cada uno de los alelos y, por tanto, en las que diferencian unos de otros. Las secuencias de referencia completas de cada alelo se indican en el Anexo III.

#### 4.2.2.1.1. Análisis filogenético

En el análisis evolutivo de todas las secuencias de *Blastocystis* sp. observamos una agrupación consistente de los diversos aislados dentro de cada subtipo, donde cada ST forma un clado monofilético distinto, indicando grupos genéticamente cohesivos (Figura 29). El subtipo ST4 presenta una mayor relación con ST8, con un nodo común con valor de soporte de 95. Estos dos subtipos se agrupan en un clado mayor con ST3. Lo mismo ocurre entre ST1 y ST2, que forman otro clado con ST5 (Figura 29).

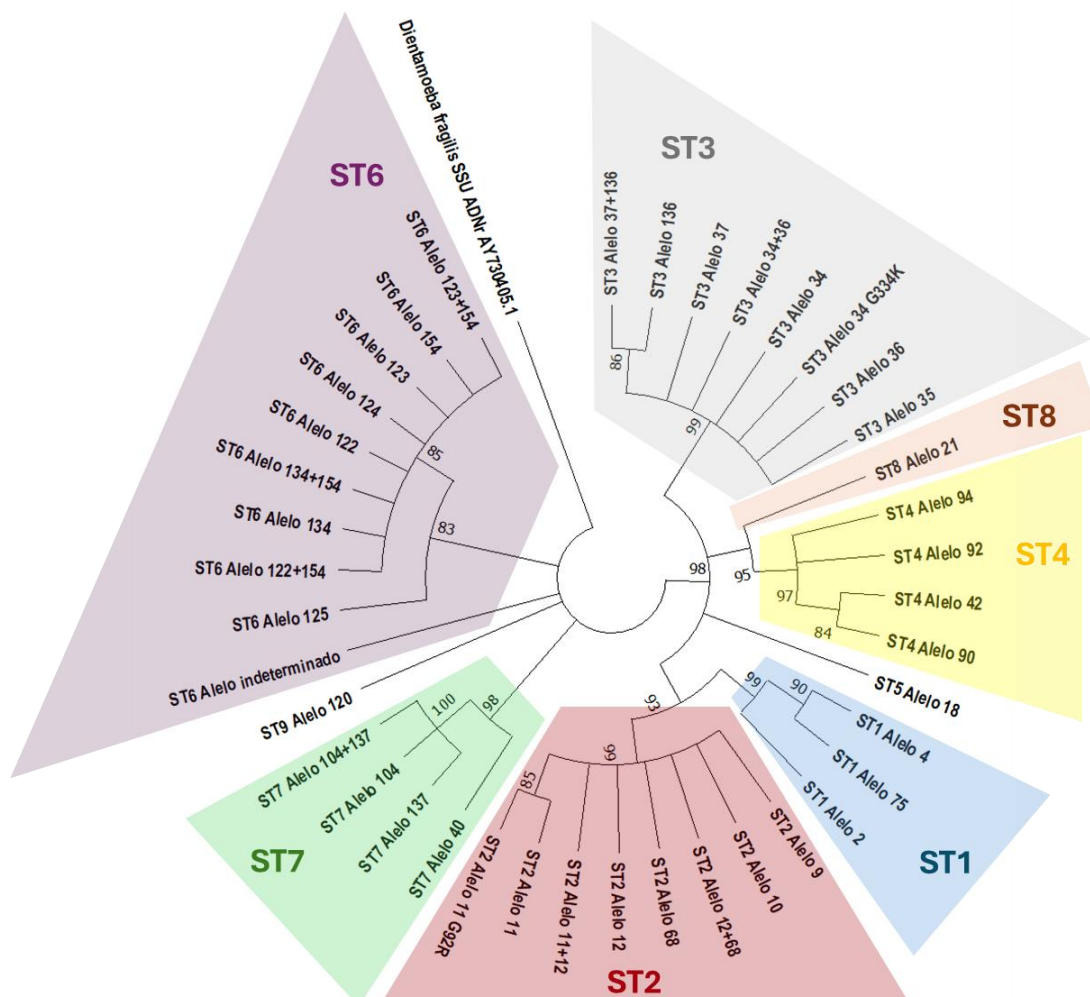


**Figura 29.** Relaciones evolutivas obtenidas a partir del método *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) sobre 350 pb de diferentes secuencias de *18S\_rRNA\_barcode* de *Blastocystis* sp. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el modelo Kimura 2-parametros. Como grupo externo se añade la secuencia equivalente de *ssu* ADNr de *Dientamoeba fragilis*.

Cabe destacar la diferenciación entre el alelo indeterminado de ST6 y el resto de las secuencias ST6 que quedan agrupadas (Figura 29).

Debido al análisis de únicamente 350 pb correspondientes al *18S\_rRNA\_barcode* empleado en la identificación de los subtipos y alelos de *Blastocystis* sp., el número de nucleótidos que divergen entre cada secuencia es bajo, por lo que la longitud de las ramas del árbol filogenético es muy pequeña.

Si simplificamos el gráfico anterior mediante el estudio único de su topología y la eliminación de aquellas ramas con baja significación estadística (valores de *Bootstrap* menores de 80%), se puede observar claramente la separación entre ST6-Alelo indeterminado y el resto de los alelos ST6 (Figura 30).



**Figura 30.** Árbol condensado eliminando aquellas ramas con valores de *Bootstrap* inferiores al 80% en el árbol filogenético *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) de *18S\_rRNA\_barcode* de *Blastocystis* sp.

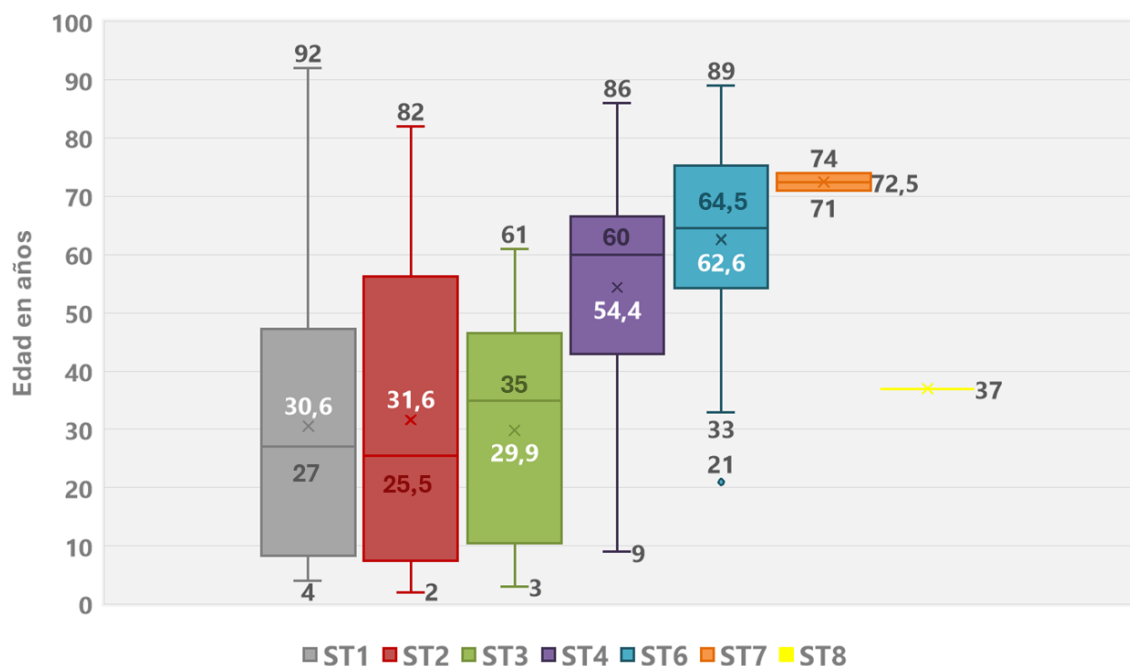
#### 4.2.2.2. Estudio sociodemográfico según subtipado

En los análisis estadísticos sobre subtipos llevados a cabo en los siguientes apartados se excluyeron las muestras correspondientes a los subtipos ST7 y ST8 debido al escaso número de casos obtenidos ( $n < 5$ ).

##### 4.2.2.2.1. Edad y sexo

Mediante la prueba de Shapiro-Wilk se observó que la edad no seguía una distribución normal en nuestros datos ( $W(152) = 0,936$ ;  $p < 0,001$ ), por lo que para resolver si existen diferencias en los años de los pacientes entre los diferentes subtipos, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Este análisis reveló que existían distribuciones de edad diferentes entre subtipos ( $H(4) = 35,868$ ;  $p < 0,001$ ). Las comparaciones múltiples *post hoc* indicaron que la mediana de edad en los subtipos ST4 y ST6 difería significativamente del resto de subtipos (ST1, ST2 y ST3) ( $p < 0,005$  en todas las comparativas por pares).

El análisis de la distribución de la edad según subtipos se muestra en la Figura 31.



**Figura 31.** Distribución de los diferentes subtipos de *Blastocystis* sp. según la edad en años de los pacientes.

x: Media de edad en años; \_\_: Mediana de edad en años.

La edad media y mediana de ST4 y ST6 es muy superior al resto de subtipos (Figura 31). Solo un paciente con ST4 presentó menos de 14 años (9 años) (3,6%, 1/28), siendo el resto considerados adultos y ancianos/as, con una edad mínima de 21 años. En el caso de los pacientes con ST6, todos fueron clasificados como adultos y ancianos/as, siendo la edad mínima de 21 años. Por otro lado, todos los pacientes con ST3 fueron niños/as y adultos, sin ningún anciano, con una edad máxima de 61 años (Figura 31 y Tabla 25).

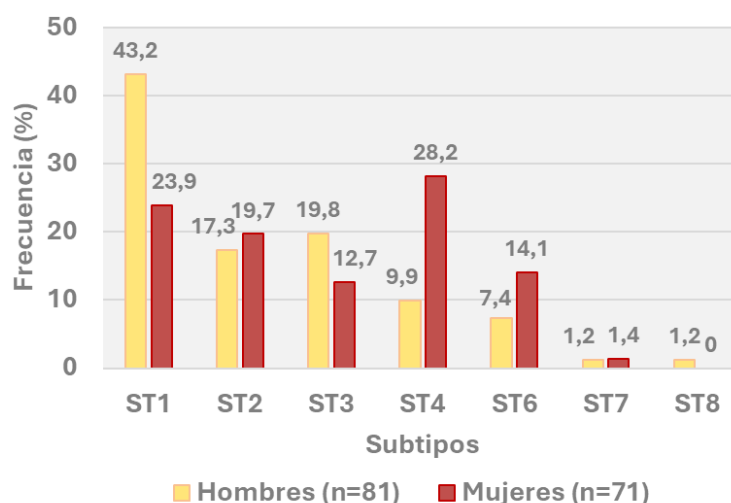
Se comprobó estadísticamente una distribución desigual de los grupos de edad en función del subtipo, con una asociación de magnitud media ( $\chi^2(8) = 36,466$ ;  $p < 0,001$ ;  $V = 0,350$ ). El porcentaje de niños/as fue significativamente inferior en los pacientes con ST4 con respecto a los pacientes con ST1, ST2 ( $p = 0,001$  para ambos) y ST3 ( $p = 0,012$ ). Por otro lado, en los pacientes con ST6 la proporción de ancianos/as fue superior a la de los pacientes con ST1 ( $p = 0,012$ ) y ST2 ( $p = 0,032$ ). Esta desigualdad estadística en el porcentaje de ancianos/as, también se observó entre ST4 y ST1 ( $p = 0,041$ ), con un porcentaje superior de pacientes ancianos/as con ST4 (Tabla 25).

**Tabla 25.** Distribución de los pacientes según grupo de edad y subtipo de *Blastocystis* sp.

Subtipo (n)	Niños/as (0-14 años) (%)	Adultos (15-64 años) (%)	Ancianos/as ( $\geq 65$ años) (%)
ST1 (52)	22 (42,3)	23 (44,2)	7 (13,5)
ST2 (28)	12 (42,9)	12 (42,9)	4 (14,3)
ST3 (25)	8 (32,0)	17 (68,0)	0*
ST4 (28)	1 (3,6)	17 (60,7)	10 (35,7)
ST6 (16)	0*	8 (50,0)	8 (50,0)
ST7 (2)	0	0	2 (100,0)
ST8 (1)	0	1 (100,0)	0
<b>Total (152)</b>	<b>43 (28,3)</b>	<b>78 (51,3)</b>	<b>31 (20,4)</b>

\*No se emplean en las comparaciones múltiples por su proporción igual a 0.

En las mujeres, el subtipo más frecuente fue ST4 (28,2%, 20/71) y en hombres ST1 (43,2%, 35/81). La frecuencia de subtipos no fue la misma para hombres y mujeres, existiendo una asociación estadísticamente significativa de magnitud media entre el sexo y subtipo detectado ( $\chi^2(4) = 13,840$ ;  $p = 0,008$ ;  $V = 0,305$ ). Se observó una frecuencia significativamente mayor de ST1 en hombres (43,2% frente al 23,9% [17/71] en mujeres,  $p = 0,011$ ) y de ST4 en mujeres (28,2% frente al 9,9% [8/81] en hombres,  $p = 0,004$ ) (Figura 32).



**Figura 32.** Distribución de los subtipos de *Blastocystis* sp. según género.

**4.2.2.2. Movimiento migratorio y movilidad internacional**

Un 21,7% (n=33) de los 152 pacientes había nacido fuera de España, principalmente en América del Sur y Centroamérica (12,5%, n=19) y África (7,2%, n=11). Por otro lado, un 11,8% (n=18) de los pacientes relataba viajes recientes al extranjero previos a la recogida de muestras de heces. La distribución de los subtipos según lugar de nacimiento y viajes se muestra en la Tabla 26.

**Tabla 26.** Distribución de los subtipos según lugar de nacimiento y viajes recientes.

		ST1 (%)	ST2 (%)	ST3 (%)	ST4 (%)	ST6 (%)	ST7 (%)	ST8 (%)
Lugar de nacimiento (n)	España (119)	41 (34,4)	22 (18,5)	13 (10,9)	27 (22,7)	13 (10,9)	2 (1,7)	1 (0,8)
	América (Centro/Sur) (19)	6 (31,6)	4 (21,0)	7 (36,8)	0	2 (10,5)	0	0
	África (11)	4 (36,4)	2 (18,2)	4 (36,4)	1 (9,1)	0	0	0
	Asia (1)	0	0	1 (100,0)	0	0	0	0
	Desconocido (2)	1 (50,0)	0	0	0	1 (50,0)	0	0
Viajes recientes (n)	América (Centro/Sur) (10)	6 (60,0)	3 (30,0)	1 (10,0)	0	0	0	0
	África (6)	3 (50,0)	0	2 (33,3)	1 (16,7)	0	0	0
	Asia (2)	1 (50,0)	0	0	0	1 (50,0)	0	0
N = 152								
N=18								

A pesar de que no se observaron diferencias en cuanto a subtipos y viajes ( $\chi^2(4) = 4,973$ ;  $p=0,290$ ), cabe destacar que un 19,2% (10/52) de los pacientes con ST1 había realizado alguna salida al extranjero previa a la consulta médica. Este porcentaje fue superior al del resto de subtipos (ST2: 10,7% [3/28], ST3: 12,0% [3/25], ST4: 3,6% [1/28] y ST6: 6,2% [1/16]). El único paciente con ST6 que había viajado (específicamente a Tailandia) presentó el aislado ST6-Alelo indeterminado.

Por otro lado, la distribución de subtipos varió según el lugar de nacimiento ( $\chi^2(4) = 15,439$ ;  $p=0,004$ ;  $V=0,322$ ). Las comparaciones múltiples mostraron diferencias estadísticas respecto a la nacionalidad y la presencia de ST3, los pacientes extranjeros presentaron una mayor proporción de ST3 con respecto a los pacientes españoles (36,4% [12/33] y 10,9% [13/119], respectivamente) ( $p=0,001$ ). Por el contrario, se dio una mayor frecuencia de pacientes nacidos en España con ST4 (22,7%, 27/119), con respecto a los nacidos en otros países (3,0%, 1/33) ( $p=0,009$ ).

Todos los ST3 aislados de pacientes españoles ( $n=13$ ) fueron alelo 34, con una coinfección de alelo 34 y 36, y ninguno de ellos había salido al extranjero recientemente. Los restantes alelos de ST3 (36, 37 y 37 + 136) se detectaron en pacientes de América, África y Asia.

El único paciente con ST4 que había nacido fuera de España, específicamente en Guinea Ecuatorial y, que además refería un viaje reciente a su país de origen, presentaba el único alelo 92 observado en nuestras muestras, siendo el resto de ST4 detectados alelo 42 (96,4%, 27/28).

#### **4.2.2.2.3. Distribución geográfica**

En el CAP de Campanar es donde se aisló una mayor diversidad de subtipos, hasta 6 (ST1, ST2, ST3, ST4, ST6 y ST7). En 3 Centros de Salud del norte, Campanar, Salvador Allende y Juan XXIII, ST1 fue el predominante, mientras que en CAP de Trinitat y en los centros de Benicalap, ST4 se encontró con mayor frecuencia (63,6%, 7/11 y 38,5%, 5/13, respectivamente) y en el CAP de Just Ramírez ST2 fue el predominante (29,2%, 7/24).

De los Centros de Salud del sur, en Catarroja es donde mayor diversidad de subtipos se observó, con un aislamiento de ST8 (6,7%, 1/15) y una proporción idéntica entre ST1 y ST3 (33,3%, 5/15) y ST4 con ST6 (13,3%, 2/15). Respecto a los CAP de Albal, Alcácer, Massanassa y Silla, se disponen de pocas muestras para cada subtipo, lo que no permite inferir asociaciones; no obstante, ST1, ST2 y ST4 son lo que mayor proporción representan en conjunto.

Se observó una asociación estadística de magnitud media entre el subtipo aislado y el Centro de Salud del que procedía la muestra ( $\chi^2(44) = 74,847$ ;  $p=0,003$ ;  $V=0,354$ ); existiendo una mayor

frecuencia de pacientes con ST4 en CAP de Trinitat con respecto a ST1 (25,0%, 7/28 y 1,9%, 1/52, respectivamente; p=0,003) (resaltado en la Tabla 27).

En la Tabla 27 se representa la distribución de los subtipos de *Blastocystis* sp. según la localización geográfica de cada CAP y sus Consultorios Auxiliares correspondientes.

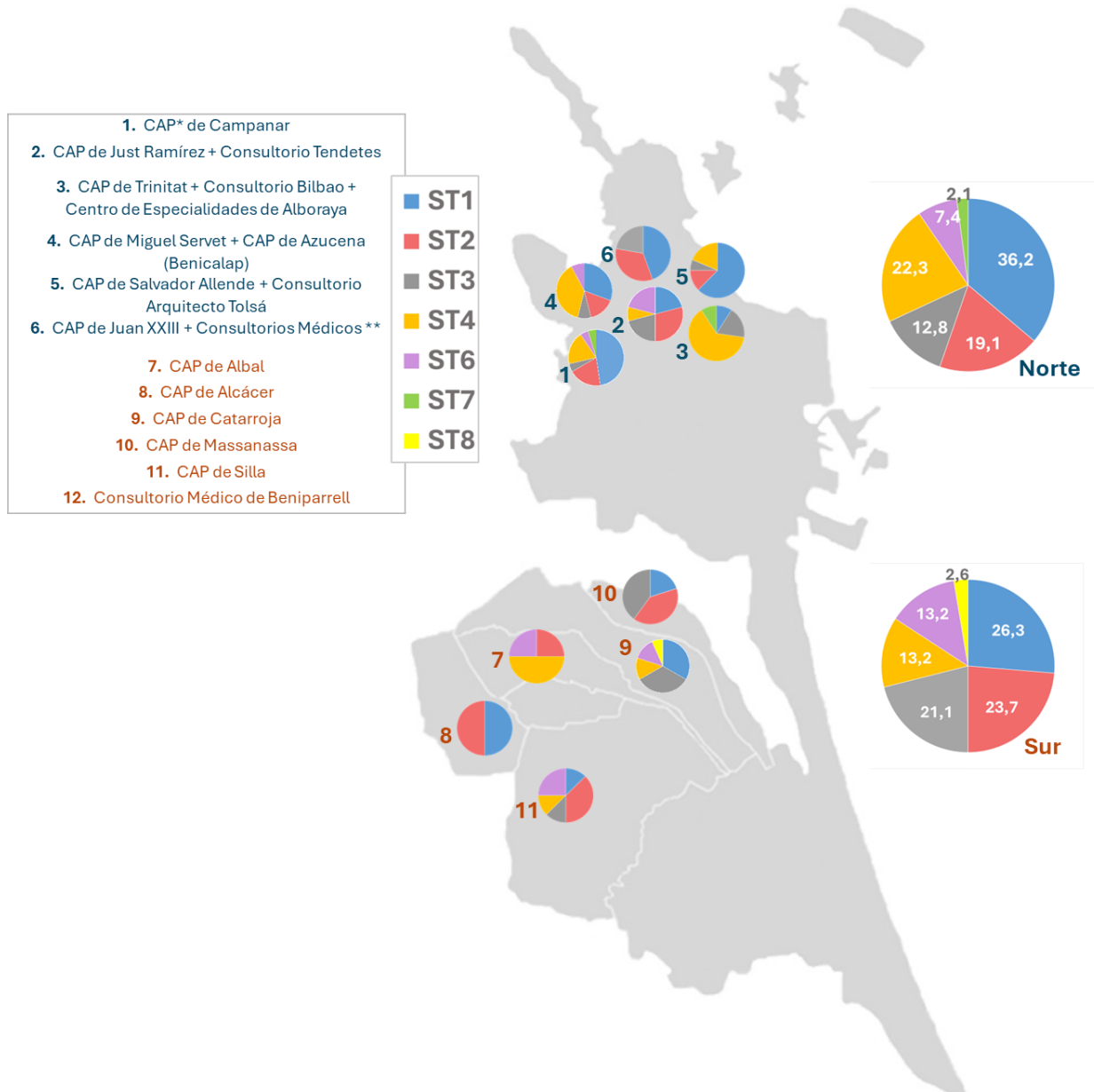
**Tabla 27.** Prevalencia de los subtipos de *Blastocystis* sp. por Centros de Salud.

Zonas	Centros de Salud y Consultorios Médicos (n)	ST1 (%)	ST2 (%)	ST3 (%)	ST4 (%)	ST6 (%)	ST7 (%)	ST8 (%)
Norte	Campanar (21)	10 (19,2)	4 (14,3)	1 (4,0)	4 (14,3)	1 (6,2)	1 (50,0)	0
	Just Ramírez (24)	5 (9,6)	7 (25,0)	5 (20,0)	2 (7,1)	5 (31,2)	0	0
	Trinitat (11)	<b>1 (1,9)</b>	0*	2 (8,0)	<b>7 (25,0)</b>	0*	1 (50,0)	0
	Miguel Servet + Azucena (Benicalap) (13)	4 (7,7)	2 (7,1)	1 (4,0)	5 (17,9)	1 (6,2)	0	0
	Salvador Allende (16)	10 (19,2)	2 (7,1)	1 (4,0)	3 (10,7)	0*	0	0
	Juan XXIII (9)	4 (7,7)	3 (10,7)	2 (8,0)	0*	0*	0	0
Sur	Albal (4)	0*	1 (3,6)	0*	2 (7,1)	1 (6,2)	0	0
	Alcácer (6)	3 (5,8)	3 (10,7)	0*	0*	0*	0	0
	Catarroja (15)	5 (9,6)	0*	5 (20,0)	2 (7,1)	2 (12,5)	0	1 (100)
	Massanassa (5)	1 (1,9)	2 (7,1)	2 (8,0)	0*	0*	0	0
	Silla (8)	1 (1,9)	3 (10,7)	1 (4,0)	1 (3,6)	2 (12,5)	0	0
	Beniparrell (0)*	0	0	0	0	0	0	0
H.U.P. La Fe (0)*		0	0	0	0	0	0	0
Otros hospitales (20)		8 (15,4)	1 (3,6)	5 (20,0)	2 (7,1)	4 (25,0)	0	0
Total		52	28	25	28	16	2	1

\*No se emplean en las comparaciones múltiples por su proporción igual a 0.

En cuanto a los diferentes alelos, su distribución fue muy homogénea entre los diferentes centros y ambas zonas; a reseñar que todos los ST2 alelo 11+12 (n=4) se localizaron en la zona norte, en 4 Centros de Salud diferentes.

En la Figura 33 se representa la proporción de subtipos por Centro de Salud y zonas norte y sur.



**Figura 33.** Distribución de los subtipos de *Blastocystis* sp. según los Centros de Atención Primaria y Consultorios Médicos que atiende el Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

\*CAP: Centro de Atención Primaria; \*\* Consultorios Médicos de Borbotó, Benifaraig, Poble Nou, Carpesa y Marco Merenciano.

Tras agrupar los centros en las dos zonas propuestas, norte y sur, no se relacionó ningún subtipo a ninguna de ambas zonas ( $\chi^2(4) = 4,425$ ;  $p=0,352$ ), observándose que ST1 predomina en ambas. El ST4 prevalece sobre ST2 y ST3 en la zona norte (22,3%, 21/94; 19,1%, 18/94 y 12,8%, 12/94, respectivamente), mientras que, en la zona sur, ST4 se encuentra en igual proporción que ST6 (13,2%, 5/38), quedando por detrás de ST2 y ST3 (23,7%, 9/38; y 21,0%, 8/38, respectivamente).

En cuanto a la distribución de la población extranjera entre la zona norte y sur, un 84,4% (27/32) de pacientes con nacionalidad distinta a la española residía en el norte de la ciudad, representando el 28,7% (27/94) de la población a estudio de esta zona; sin encontrarse asociación estadística entre pacientes extranjeros y una zona u otra ( $\chi^2(1) = 3,570$ ;  $p=0,059$ ).

#### 4.2.2.3. Estudio de la clínica asociada según subtipo

En la Tabla 28 se muestran los síntomas reportados en pacientes con *Blastocystis* sp.

**Tabla 28.** Sintomatología de los pacientes con *Blastocystis* sp. subtipados (N=152).

Síntomas	N	%
Diarrea aguda	33	21,7
Diarrea crónica	33	21,7
Estreñimiento	14	9,2
Dolor abdominal	44	28,9
Náuseas	11	7,2
Vómitos	15	9,9
Dispepsia/epigastralgia	14	9,2
Meteorismo/flatulencias	15	9,9
Heces de consistencia o apariencia anormal	9	5,9
Incontinencia fecal o urgencia deposicional	5	3,3
Proctalgia y/o rectorragia	7	4,6
Prurito anal	17	11,2
Pérdida de peso	11	7,2
Fiebre	4	2,6
Prurito generalizado	9	5,9
Astenia	9	5,9
Asintomático	37	24,3

Un 75,7% de los 152 pacientes presentaron clínica, siendo el síntoma más frecuente el dolor abdominal (28,9%, n=44) seguido de diarrea crónica y aguda en igual proporción (n=33, 21,7%). La sintomatología según subtipos y el análisis estadístico detallado se muestra en la Tabla 29.

**Tabla 29.** Sintomatología de los pacientes según subtipos de *Blastocystis* sp.

Síntomas (n)	ST1 n=52 (%)	ST2 n=28 (%)	ST3 n=25 (%)	ST4 n=28 (%)	ST6 n=16 (%)	ST7 n=2 (%)	ST8 n=1 (%)	P valor <sup>1</sup>
Diarrea aguda (33)	10 (19,2)	8 (28,6)	3 (12,0)	8 (28,6)	4 (25,0)	0	0	0,531
Diarrea crónica (33)	12 (23,1)	2 (7,1)	6 (24,0)	9 (32,1)	3 (18,8)	0	1 (100)	0,236
Estreñimiento (14)	3 (5,8)	2 (7,1)	2 (8,0)	5 (17,9)	2 (12,5)	0	0	0,468
Dolor abdominal (44)	18 (34,6)	10 (35,7)	9 (36,0)	4 (14,3)	3 (18,8)	0	0	0,224
Náuseas (11)	3 (5,8)	4 (14,3)	3 (12,0)	1 (3,6)	0*	0	0	0,309
Vómitos (15)	1 (1,9)	4 (14,3)	3 (12,0)	5 (17,9)	2 (12,5)	0	0	0,168
Dispepsia/epigastralgia (14)	3 (5,8)	2 (7,1)	3 (12,0)	4 (14,3)	2 (12,5)	0	0	0,711
Meteorismo/flatulencias (15)	4 (7,7)	1 (3,6)	3 (12,0)	5 (17,9)	1 (6,2)	0	1 (100)	0,402
Heces de consistencia o aparición anormal (9)	2 (3,8)	2 (7,1)	1 (4,0)	0*	4 (25,0)	0	0	<b>0,013</b>
Incontinencia fecal o urgencia deposicional (5)	1 (1,9)	1 (3,6)	0*	1 (3,6)	2 (12,5)	0	0	0,255
Proctalgia/rectorragia (7)	4 (7,7)	0*	1 (4,0)	1 (3,6)	1 (14,3)	0	0	0,624
Fiebre (4)	2 (3,8)	1 (3,6)	0*	1 (3,6)	0*	0	0	0,814
Prurito generalizado (9)	2 (3,8)	1 (3,6)	1 (4,0)	3 (10,7)	2 (12,5)	0	0	0,528
Prurito anal (17)	6 (11,5)	4 (14,3)	4 (16,0)	2 (7,1)	0*	1 (50,0)	0	0,489
Pérdida de peso (11)	3 (5,8)	0*	3 (12,0)	2 (7,1)	2 (12,5)	0	1 (100)	0,397
Astenia (9)	1 (1,9)	1 (3,6)	3 (12,0)	2 (7,1)	1 (14,3)	1 (50,0)	0	0,440
Asintomático (37)	15 (28,8)	6 (21,4)	8 (32,0)	3 (10,7)	4 (25,0)	1 (50,0)	0	0,361

<sup>1</sup> Prueba Chi-cuadrado; \*No se emplean en las comparaciones múltiples por su proporción igual a 0.

En este estudio sobre la posible relación entre los subtipos y el tipo de síntoma se observó una asociación estadísticamente significativa, aunque débil entre subtipo y la presencia de heces de consistencia o apariencia anormal ( $\chi^2 (4) = 12,619$ ;  $p=0,013$ ;  $V=0,291$ ) (resaltado en la Tabla 29), con una mayor proporción de pacientes con este síntoma y ST6, con respecto a los que no presentaron esta sintomatología (44,4% [4/9] frente a 8,6% [12/140];  $p=0,001$ ).

A pesar de que no se observó aval estadístico para determinar si la presencia o ausencia de síntomas se debe al azar o a la presencia de un determinado subtipo ( $\chi^2 (4) = 4,345$ ;  $p=0,361$ ), cabe destacar que la mayor proporción de individuos asintomáticos se encontraba en los pacientes con ST3 (32,0%, 8/25), mientras que la mayor tasa de sintomáticos se dio en los pacientes con ST4 (89,3%, 25/28).

Aunque la proporción de pacientes asintomáticos en el grupo de niños/as, adultos o ancianos/as fue similar ( $\chi^2 (2) = 4,865$ ;  $p=0,088$ ), sí que se encontró algún síntoma de forma predominante en un grupo de edad u otro. La proporción de diarrea crónica en ancianos/as fue superior al resto (45,2% [14/33] frente a 9,3% [4/43] en niños/as;  $p=0,001$  y 19,2% [15/78] en adultos;  $p=0,009$ ) ( $\chi^2 (2) = 14,207$ ;  $p=0,001$ ;  $V=0,306$ ), el dolor abdominal se dio más en niños/as que en adultos (44,2%, 19/43 y 20,5%, 16/78, respectivamente;  $p=0,018$ ) ( $\chi^2 (2) = 7,553$ ;  $p=0,023$ ;  $V=0,223$ ) y todos los pacientes con rectorragia o proctalgia fueron adultos ( $\chi^2 (2) = 6,962$ ;  $p=0,031$ ;  $V=0,214$ ).

En cuanto al sexo, se observaron diferencias en la proporción de pacientes asintomáticos entre hombres y mujeres, el 33,3% de los hombres (27/81) fueron asintomáticos frente al 14,1% de las mujeres (10/71) ( $\chi^2 (1) = 7,612$ ;  $p=0,006$ ;  $V=0,224$ ). El único síntoma que se observó de forma predominante en un sexo u otro fue la incontinencia fecal/urgencia deposicional, que se dio exclusivamente en mujeres ( $n=5$ ) ( $F: p=0,021$ ;  $V=0,197$ ).

Si analizamos los síntomas sistémicos de fiebre, pérdida de peso y astenia, estos siempre iban acompañados de algún otro síntoma gastrointestinal (con excepción de 1 solo paciente que presentaba pérdida de peso sin causa aparente). Sin embargo, en un 55,5% (5/9) de los pacientes con prurito generalizado, este se presentaba como único síntoma. No se consiguió establecer una relación estadística entre el subtipo y la presencia de sintomatología sistémica ( $\chi^2 (4) = 5,790$ ;  $p=0,215$ ).

Sin embargo, sí que se observaron diferencias en cuanto a la edad de los pacientes y la presencia de síntomas sistémicos ( $\chi^2 (2) = 7,696$ ;  $p=0,021$ ;  $V=0,225$ ), siendo significativamente mayor el número de ancianos/as con enfermedad sistémica que de niños/as (32,3%, 10/31 y 7,0%, 3/43, respectivamente;  $p=0,014$ ).

Un elevado número de pacientes, el 32,9% (n=50), padecían de alguna enfermedad alérgica de base, tales como reacciones alérgicas alimentarias, rinitis, dermatitis, conjuntivitis, asma o bronquitis alérgica. Además, un 27,6% (n=42) mostraban afectaciones crónicas de la piel del tipo dermatitis atópica, eccemas o psoriasis, siendo el 45,2% (n=19) de estos pacientes alérgicos.

Se estableció una relación entre el subtipo y la existencia de enfermedad alérgica ( $\chi^2(4) = 11,494$ ;  $p=0,022$ ;  $V=0,278$ ), con una frecuencia superior de pacientes alérgicos con ST6 (22,4%, 11/49), con respecto a los no alérgicos (5,0%, 5/100) ( $p=0,001$ ). Por otro lado, no hubo diferenciación en función de subtipo y afectaciones dermatológicas crónicas ( $\chi^2(4) = 2,125$ ;  $p=0,713$ ).

A 100 pacientes (65,8%) se les realizó analítica sanguínea con determinación de eosinófilos, encontrándose en un 29,0% (n=29) la presencia de eosinofilia. Un 10,3% (3/29) de estos pacientes presentaban infección por algún helminto y un 24,1% (7/29) padecía de alguna enfermedad alérgica, condiciones que podrían desencadenar este aumento de eosinófilos; mientras que el 65,5% (19/29) de los pacientes restantes no presentaron ninguna otra causa que explicase la eosinofilia, más que la presencia de *Blastocystis* sp. Un 44,8% (13/29) de los pacientes con eosinofilia eran asintomáticos. No se observó relación entre ningún subtipo y la presencia o ausencia de eosinofilia ( $\chi^2(4) = 3,510$ ;  $p=0,476$ ).

El 10,5% (n=16) de los pacientes presentó algún tipo de inmunocompromiso. El 50,0% (n=8) de estos pacientes había sido sometido a un trasplante encontrándose en tratamiento inmunosupresor, un 12,5% (n=2) padecía alguna neoplasia hematológica, un paciente (6,2%) presentaba VIH mal controlado y el restante 31,2% (n=5) estaba bajo tratamiento inmunosupresor por otras causas. Además de no existir una mayor prevalencia de síntomas en los pacientes con inmunosupresión, se reportó lo contrario, existía una mayor proporción de pacientes asintomáticos inmunodeprimidos que del resto de la población (un 50,0% [8/16] de inmunodeprimidos no presentaron ningún síntoma, frente al 21,3% [29/136] de la población inmunocompetente) ( $\chi^2(1) = 6,392$ ;  $p=0,011$ ;  $OR=3,69$ ;  $IC95=1,275-10,675$ ;  $V=0,205$ ). El 87,5% (7/8) de estos pacientes inmunodeprimidos y asintomáticos fueron trasplantados pulmonares.

La distribución de los subtipos fue desigual entre la población inmunodeprimida e inmunocompetente ( $\chi^2(4) = 9,840$ ;  $p=0,043$ ;  $V=0,257$ ). Un 31,3% (5/16) de los pacientes inmunodeprimidos presentaron ST6, siendo este valor significativamente superior al de pacientes inmunocompetentes con ST6 (8,3%, 11/133) ( $p=0,005$ ). Además, un 60,0% (3/5) de estos pacientes con inmunosupresión y ST6 eran asintomáticos, correspondiéndose con cribados realizados a pacientes trasplantados pulmonares.

Un 17,1% de los pacientes (26/152) padecían de otra condición gastrointestinal además de la presencia de *Blastocystis* sp., presentando un 8,5% (n=13) intolerancias y/o alergias alimenticias (a los disacáridos, fructosa, lactosa, proteína de la vaca o al gluten), un 3,9% (n=6) padecían diverticulosis, un 3,3% (n=5) sufrían de Síndrome de Intestino irritable, un 0,7% (n=1) tenía el Síndrome de vómitos cíclicos crónicos y otro 0,7% disbiosis intestinal. No se observó asociación entre ninguna de estas patologías y la presencia de ningún subtipo ( $\chi^2 (4) = 1,404$ ;  $p=0,844$ ).

Hubo más prevalencia de diarrea crónica entre los pacientes con alguna condición gastrointestinal además de la presencia de *Blastocystis* sp. (38,5% [10/26] en pacientes con alguna otra enfermedad digestiva y 18,2% [23/126] en pacientes solo con *Blastocystis* sp.) ( $\chi^2 (1) = 5,178$ ;  $p=0,023$ ; OR=2,799; IC95=1,126-6,955; V=0,185), existiendo un 2,8 más de probabilidad de sufrir diarrea crónica cuando se padecía de afectaciones gastrointestinales con *Blastocystis* sp. que cuando únicamente se observaba *Blastocystis* sp. Específicamente, los pacientes con colon irritable desarrollaron con más frecuencia esta sintomatología con respecto a los que solo presentaban el protista (80,0% [4/5] frente a 18,2% [23/126], respectivamente;  $p=0,005$ ).

A su vez, hubo más pacientes con meteorismo o flatulencias entre el grupo con otras condiciones gastrointestinales con respecto al grupo sin éstas (23,1% [6/26] y 7,1% [9/126], respectivamente) ( $\chi^2 (1) = 6,152$ ;  $p=0,013$ ; OR=3,90; IC95=1,251-12,154; V=0,201), presentando 3,9 veces más probabilidad de sufrir esta sintomatología al coexistir ambas patologías. Dentro de los pacientes con diverticulosis se encontró un número significativamente mayor de pacientes con meteorismo/flatulencias (66,7%, 4/6), que sin esta sintomatología ( $p=0,049$ ); por otro lado, en los pacientes sin ninguna afectación gastrointestinal además de presentar *Blastocystis* sp., se observó un número mayor de pacientes sin meteorismo/flatulencias (92,9%, 117/126) que con este síntoma ( $p=0,013$ ).

Se obtuvo una proporción equiparable de pacientes asintomáticos en el grupo con otras condiciones gastrointestinales y en el que estaban ausentes ( $\chi^2 (1) = 0,445$ ;  $p=0,505$ ).

En el estudio coproparasitológico mediante microscopía óptica en heces, se detectó una coinfección con algún otro protista intestinal en un 22,4% (n=34) de los pacientes, predominantemente con *Endolimax nana* (9,2%, 14/152), seguido de *G. intestinalis* (8,6%, 13/152), *Entamoeba* sp. (no *histolytica/dispar*) (2,6%, 4/152) y *Dientamoeba fragilis* (2,0%, 3/152). Se observó que existía una mayor incidencia de diarrea crónica y dolor abdominal cuando coexistían *E. nana* y *Blastocystis* sp. que en ausencia del primer protista ( $\chi^2 (1) = 11,390$ ;  $p=0,001$ ; OR=6,027; IC95=1,920-18,914; V=0,274, en el caso de diarrea crónica) ( $\chi^2 (1) = 5,960$ ;  $p=0,015$ ;

OR=3,778; IC95=1,227-11,632; V=0,198, para dolor abdominal) (un 57,1% [8/14] de los pacientes con *E. nana* y *Blastocystis* sp. presentaban diarrea crónica y dolor abdominal, frente al 18,1% [25/138] de los pacientes con *Blastocystis* sp. sin *E. nana* y diarrea crónica, y al 26,1% [36/138] de pacientes con *Blastocystis* sp. y dolor abdominal).

El paciente con ST6-Alelo indeterminado presentaba afectaciones sistémicas con lesiones cutáneas eritematosas extensas, prurito generalizado y asma eosinofílica. En cuanto a ST7, uno de los pacientes sufría de prurito anal y astenia, y el segundo se trataba de un paciente asintomático que remitía la muestra fecal por la detección de eosinofilia. Por último, el paciente con ST8, padecía rinitis alérgica, diverticulosis crónica y acudía por diarrea crónica de 3 meses de evolución, distensión abdominal, meteorismo y pérdida de peso.

### **4.2.3. *Giardia intestinalis***

#### **4.2.3.1. Identificación y caracterización molecular: variabilidad genética**

De los 172 ADN extraídos positivos por microscopía para *Giardia intestinalis* se detectaron 164 *ssu* ADNr (95,3%) mediante qPCR. Los ciclos umbral de amplificación (Ct) oscilaron entre 16,0 y 36,1 con una media de 27,8.

A partir de estos 164 extraídos, se realizó PCR convencional dirigida a los marcadores moleculares de *gdh* y *bg*. A pesar de que en 40 muestras (24,4%) el Ct fue superior a 30, se decidió incluir todas las muestras en el estudio para determinar la tasa de éxito en el genotipado con cargas parasitarias bajas.

En el caso de *gdh*, se lograron 52 positivos que fueron sometidos a secuenciación Sanger. En 11 de estos amplicones, el cromatograma no cumplía la calidad necesaria para poder obtener el genotipo, de tal forma que a partir de *gdh* se consiguió el genotipo y subgenotipo de 41 *G. intestinalis* (tasa de éxito: 25,0%, 41/164). Se trabajó con 35 secuencias consenso y en 6 ocasiones se empleó únicamente una de ambas secuencias.

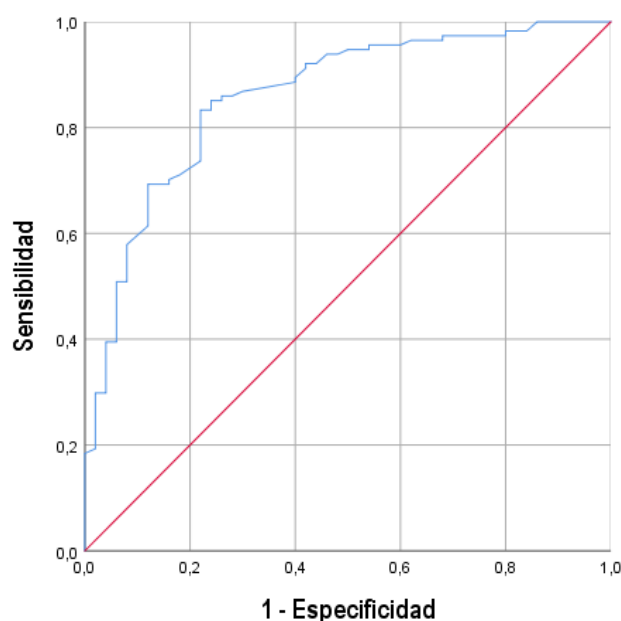
Para *bg*, los positivos por PCR convencional fueron 25, y de ellos 2 se etiquetaron como no tipables por baja calidad de las secuencias, obteniendo, finalmente, 23 genotipados (tasa de éxito: 14,0%, 23/164). En 19 muestras se emplearon secuencias consenso y en 4 una única secuencia.

En 14 aislados de *G. intestinalis* se consiguió determinar el genotipo mediante ambos genes, existiendo consenso en prácticamente todos los resultados, a excepción de una muestra que fue subgenotipada como All por *gdh* y como AllI por *bg*.

En 9 ocasiones la PCR para *gdh* resultó negativa o bien la secuenciación no fue exitosa; sin embargo, a partir de *bg* se pudo establecer el genotipo. Por el contrario, en 27 muestras *bg* no sirvió para la caracterización molecular y fue a partir de *gdh* como se pudo obtener el genotipo/subgenotipo.

En total, se obtuvo caracterización molecular de 50 aislados de *G. intestinalis* (tasa de éxito: 30,5%, 50/164), correspondientes a 50 pacientes diferentes. El valor promedio de Ct obtenido en la qPCR *ssu* ADNr de estos 50 aislados genotipados fue de 23,9 (16,0-33,0), mientras que en los 114 aislados que no se pudieron caracterizar fue de 29,3 (21,0-36,1).

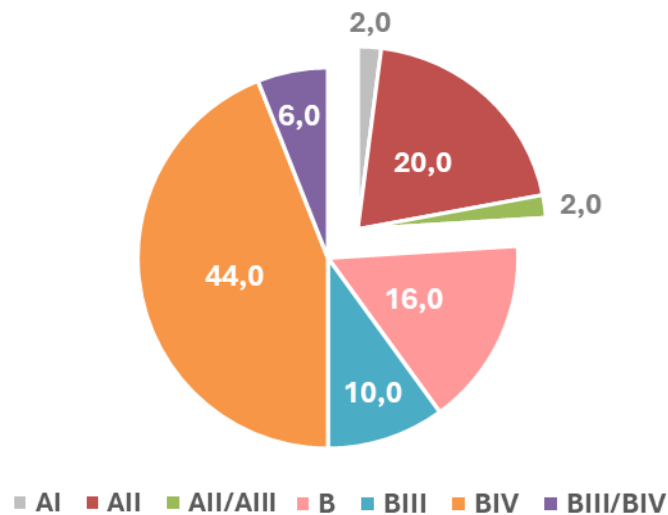
Finalmente, en función de la tasa de éxito de la secuenciación, se estableció un punto de corte según valores de Ct obtenidos en la qPCR frente a *ssu* ADNr de *G. intestinalis*. Mediante la curva ROC (AUC: 0,859) con un umbral de discriminación mínimo del 95% de especificidad, se obtuvo que el Ct con valor de 29,8 presentaba un 96,0% de especificidad (Figura 34). Si seleccionamos este Ct como Ct máximo para realizar cualquier PCR convencional, se evitaría realizar 94 procesos de PCR (47 frente a *gdh* y 47 frente a *bg*), de los que, en este estudio, sólo 2 reportaron asignación de genotipo o subgenotipo, que se perderían como falsos negativos.



**Figura 34.** Curva ROC para determinar la tasa de éxito de secuenciación en función de valores de Ct obtenidos en la qPCR frente a *ssu* ADNr de *G. intestinalis*.

En cuanto a los resultados, el genotipo mayoritario fue el B, con un 76,0% (38/50) de prevalencia, siendo un 44,0% BIV (22/50), un 10,0% BIII (5/50) y un 6,0% (3/50) BIII/BIV como subgenotipo ambiguo o coinfección. En un 16,0% (8/50) de las muestras únicamente se logró obtener el genotipo B sin conseguir el subgenotipo (Figura 35).

Los 12 (24,0%) aislados de *G. intestinalis* restantes se caracterizaron con el genotipo A, siendo un 20,0% AII (10/50), un 2,0% AI (1/50) y en una ocasión se obtuvo un subgenotipo discordante AII/AIII (2,0%, 1/50) (Figura 35).



**Figura 35.** Frecuencia en porcentaje de los genotipos y subgenotipos de *G. intestinalis*.

#### 4.2.3.1.1. *Glutamato deshidrogenasa*

En el análisis de las mutaciones presentes en el *locus gdh*, que queda detallado en la Tabla 30, se puede observar un alto nivel de polimorfismo, principalmente en los subgenotipos BIII y BIV.

En el caso de BIII, ninguno de los 5 aislados obtenidos presentó una secuencia idéntica entre sí, aunque cabe destacar la presencia en todas ellas de mutaciones en la posición 309 (Referencia: [AF069059](#)), donde la citosina presente en la secuencia de referencia se intercambia por un doble pico citosina/timina (Y) (40,0%, 2/5) o por timina (60,0%, 3/5). Además, otras dos mutaciones se repetían en diferentes secuencias de BIII, C87Y/T y T147C/Y (con un 50,0% (1/2) de mutaciones ambiguas Y en ambas posiciones). En total, se observaron hasta 14 SNPs distintos, existiendo entre 1 y 5 por secuencia, y siendo todas transiciones (C ↔ T o A ↔ G), con un 41,2% (7/17) de mutaciones ambiguas (Y o R) (Tabla 30).

**Tabla 30.** Diversidad genética hallada en el gen *gdh* de *G. intestinalis*.

Genotipo	Subgenotipo	GenBank ref.	n	SNPs	Id.
A	AI	<a href="#">L40509</a>	1	-	1
	AII	<a href="#">L40510</a>	5	-	2
			1	T473A	3
			1	C250T	4
			1	T161Y	5
			1	C233T	6
			1	G249R	7
B	BIII	<a href="#">AF069059</a>	1	C87Y, C309Y, C351Y	8
			1	C309T	9
			1	C87T, T147C, G150A, C309T	10
			1	C69T, C106T, C124T, C309T, C336T	11
			1	T147Y, T237Y, C309Y, C354R	12
	BIV	<a href="#">L40508</a>	8	-	13
			1	A281R	14
			1	G180A	15
			1	T183C, T265Y, C361T, T387C, C396T, C411T, C423T, C432T, C468Y	16
			4	T183C, T387C, C396T, C423T	17
			7	T183Y, T387Y, C396Y, C423Y	18
BIII/BIV	<a href="#">L40508</a>	1	C123Y, <b>T135Y</b> , T183C, G186R, <b>C255T</b> , <b>C273T</b> , T312Y, <b>C345Y</b> , <b>T366C</b> , C372Y, <b>T387Y</b> , <b>A438R</b>	19	
		1	<b>T135Y</b> , T183Y, <b>C255Y</b> , <b>C273Y</b> , C345Y, <b>T366Y</b> , <b>T387Y</b> , C396Y, C423Y, <b>A438R</b>	20	
		1	<b>T135Y</b> , <b>C255Y</b> , <b>C273Y</b> , <b>T366Y</b> , <b>T387C</b> , C423Y, <b>A438R</b>	21	

R: A/G ; Y: C/T ; **destacadas**: posiciones en las que difieren los dos subgenotipos; GenBank ref.: Referencia de GenBank; Id. Número identificativo para su estudio filogenético posterior.

En cuanto a BIV, únicamente un 36,4% (8/22) presentó la misma secuencia que la de referencia ([L40508](#)), acumulando las 14 muestras restantes entre 1 y 9 SNPs por secuencia, y siendo diferentes entre sí un 35,7% (5/14) de éstas. En 7 de las 22 secuencias de BIV (31,8%), se presentaron las mismas mutaciones T183Y, T387Y, C396Y y C423Y. Además, otras 4 (18,2%) secuencias tenían mutaciones en estas mismas posiciones, pero sin dobles picos (T183C, T387C, C396T y C423T). En otra muestra se mantuvieron los mismos SNPs anteriores, pero añadiendo 5 mutaciones más (T265Y, C361T, C411T, C432T, C468Y). La proporción de mutaciones ambiguas (Y o R) en las secuencias de BIV fue de un 56,4% (31/55).

Si analizamos las 3 coinfecciones o genotipo ambiguo BIII/BIV, las 3 secuencias diferían entre sí, y se vuelven a observar SNPs en posiciones compartidas con las de BIV en ausencia de BIII, como T183C/Y, T387C/Y, C396Y y C423Y. En este caso, el 83,4% (26/31) de las mutaciones fueron ambiguas (Y o R).

Respecto al genotipo A, reseñar que en un 50,0% de los 10 aislados AII se localizó una mutación diferente por cada aislado, 4 transiciones y una transversión (purina ↔ pirimidina) (T473A, Referencia: [L40510](#)), con un 40,0% (2/5) de mutaciones ambiguas (Y o R) (Tabla 30).

#### **4.2.3.1.1.1. Análisis filogenético**

El estudio evolutivo de las secuencias de *gdh* se muestra en la Figura 36.

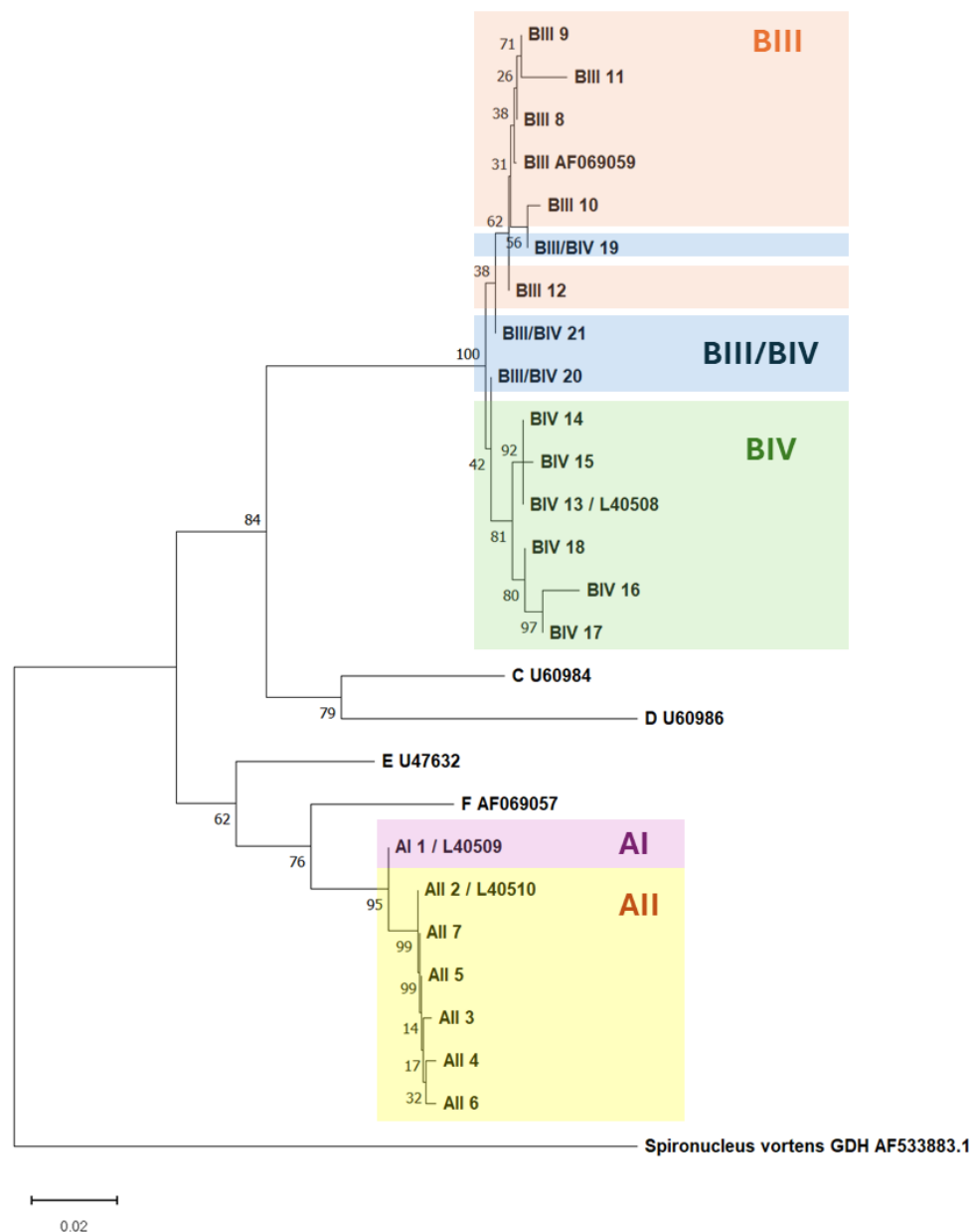
La longitud de las ramas que diferencian unas secuencias de otras es corta debido a las pequeñas variaciones nucleotídicas entre unas y otras.

El genotipo A se encuentra más próximo filogenéticamente a los genotipos zoonóticos E y F, mientras que el genotipo B tiene una relación evolutiva más cercana con los genotipos C y D.

Además, existe una clara división de los subgenotipos dentro de cada genotipo en diferentes grupos independientes, tanto de AII con AI, como de BIII y BIV, con valores de *Bootstrap* de 95 y 100% respectivamente.

Dentro de BIV encontramos todos los valores de soporte por encima del 80% demostrando una alta confiabilidad en estas ramificaciones. Sin embargo, los resultados son ambiguos para aquellas secuencias con posible coinfección de BIII/BIV, englobando dos de ellos dentro del posible grupo de BIII (BIII/BIV 19 y BIII/BIV 21) y otro como BIV (BIII/BIV 20), aunque con unos valores de *Bootstrap* muy bajos, lo que demuestra características genéticas mixtas o

intermedias entre estos dos subgenotipos. A su vez, los valores de *Bootstrap* obtenidos para la jerarquización de BIII son inferiores al 80%, muchos de ellos incluso por debajo del 50%.

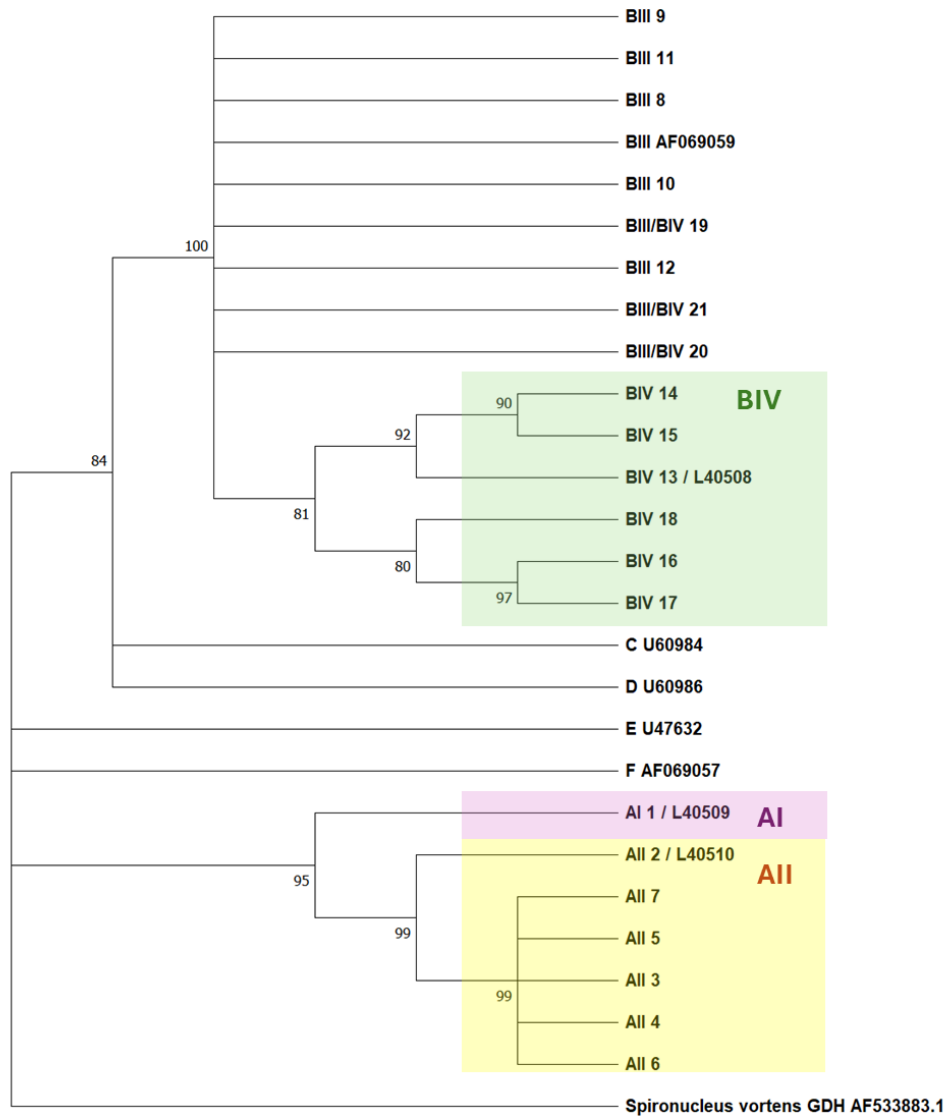


**Figura 36.** Relaciones evolutivas obtenidas a partir del método *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) sobre 392 pb de diferentes secuencias del gen codificante para la enzima NADP Glutamato Deshidrogenasa (*gdh*) de *G. intestinalis*.

Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el modelo Tamura Nei + G. Como grupo externo se añade la secuencia de *gdh* de *Spironucleus vortens*.

Se realizó un estudio de la topología del árbol suprimiendo las ramas con bajo valor estadístico (Figura 37), donde con una significancia estadística alta (*Bootstrap* por encima del 80%), dentro del genotipo B solo podemos predecir la existencia de un grupo que engloba a todos los

subgenotipos BIV, quedando los subgenotipos BIII y BIII/BIV como ramas independientes externas a este grupo (Figura 37). Por otro lado, la agrupación dentro del genotipo A en los dos subgenotipos (AI y AII), muestran un alto respaldo estadístico.



**Figura 37.** Árbol condensado eliminando aquellas ramas con valores de *Bootstrap* inferiores al 80% en el árbol filogenético *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) de *gdh*.

**4.2.3.1.1.2. Cambios aminoacídicos**

A partir de las mutaciones en las secuencias de ADN de cada genotipo/subgenotipo asignado por *gdh*, se estudiaron los posibles efectos sobre las proteínas resultantes.

Para el subgenotipo AII asignado por *gdh*, las mutaciones observadas con respecto a la secuencia de referencia L40510 implican los cambios de aminoácidos a nivel proteico que se muestran en la Tabla 31.

**Tabla 31.** Polimorfismo de un solo nucleótido en el subgenotipo All asignado por *gdh*.

Secuencia de referencia del gen: L40510	Secuencia de referencia de la proteína: AAB00474	Secuencia de referencia de la proteína completa: XP_001707257
SNP	Cambios aminoacídicos en la proteína	Cambios aminoacídicos en la proteína
T473A	L158Q	L216Q
C250T	R84C	R142C
T161Y	L54P	L112P
C233T	S78F	S136F
G249R	M83I	M141I

En el subgenotipo BIII, un único SNP se corresponde con una mutación no sinónima, lo que conlleva la sustitución de la leucina presente en la posición 36 de la proteína de referencia (AAD54621) por fenilalanina (Tabla 32).

**Tabla 32.** Polimorfismo de un solo nucleótido en el subgenotipo BIII asignado por *gdh*.

n	Nucleótidos en las posiciones de la secuencia de referencia AF069059										
	C 69	C 87	C 106	C 124	T 147	G 150	T 237	C 309	C 336	C 351	G 354
1		Y						Y		Y	
1								T			
1		T			C	A		T			
1	T		T <sup>1</sup>	T				T	T		
1					Y		Y	Y			R

Proteína de referencia: [AAD54621](#). <sup>1</sup>p.L36F

Proteína de referencia: [XP\\_001707257](#). <sup>1</sup>p.L106F

En la traducción a proteína de las secuencias del subgenotipo BIV, se determinaron 3 SNPs que implicaban cambios en la secuencia aminoacídica (Tabla 33).

En una secuencia se observó la sustitución de una glutamina por arginina en la posición 94 de la proteína, y en otra se intercambió una fenilalanina por leucina en la posición 89 (Referencia: AAB00475). En esta última secuencia, además, se produjo una sustitución nucleotídica (Q121\*,

Ref: AAB00475) que implicaba la terminación en la traducción, al tratarse en la transcripción de un codón STOP.

**Tabla 33.** Polimorfismo de un solo nucleótido en el subgenotipo BIV asignado por *gdh*.

n	Nucleótidos en las posiciones de la secuencia de referencia L40508										
	G 180	T 183	T 265	A 281	C 361	T 387	C 396	C 411	C 423	C 432	C 468
1	A										
1				R <sup>1</sup>							
1		C	Y <sup>2</sup>		T <sup>3</sup>	C	T	T	T	T	Y
4		C				C	T		T		
7		Y				Y	Y		Y		

Proteína de referencia: [AAB00475](#)

Proteína de referencia: [XP\\_001707257](#)

<sup>1</sup>p.Q94R

<sup>1</sup>p.Q152R

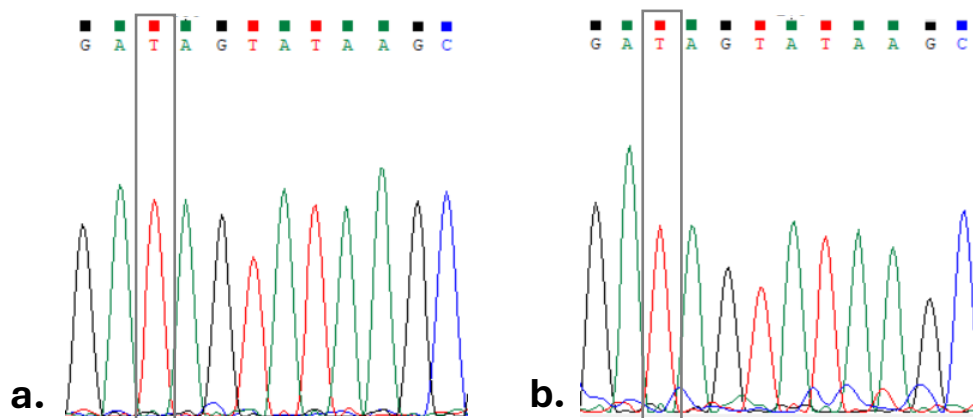
<sup>2</sup>p.F89L

<sup>2</sup>p.F147L

<sup>3</sup>p.Q121\* (codón STOP)

<sup>3</sup>p.Q179\* (codón STOP)

A pesar de que la mutación C361T (Ref: L40508) podría tener una gran repercusión en la proteína resultante, los picos en el cromatograma de ambas secuencias (*forward* y *reverse*) fueron robustos y no ejercían dudas en la veracidad de la existencia de este polimorfismo (Figura 38).



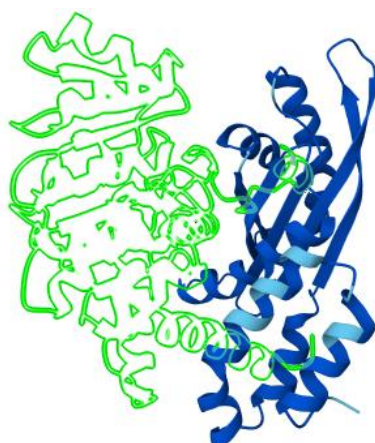
**Figura 38.** Mutación C361T (Ref: L40508) en secuencias (a.) *forward* y (b.) *reverse* de un aislado de *G. intestinalis* BIV.

La secuencia proteica obtenida de la traducción de esta secuencia nucleotídica mutada se muestra en la Tabla 34.

**Tabla 34.** Secuencia primaria obtenida de la traducción de la secuencia nucleotídica de un aislado de BIV con las mutaciones no sinónimas T265C y C361T (Ref. L40508).

GPYKGGLRFHPSVNLKILKFLGFEQILKNSLTTLPMGGGKGGSD FDPK GKSDNEVMRFCQSLMTELRR  
 HVGADTDVPAGDIGVGGREIGYLFG(**STOP**)

Este codón STOP produce un acortamiento de la proteína, eliminando completamente la región de unión al cofactor NAD(P)+, tal y como queda representado en la Figura 39.



**Figura 39.** Mediante *AlphaFold* se muestra transparente y con bordes verde la estructura tridimensional perdida derivada de la mutación C361T (Ref. L40508) en la proteína completa de referencia: AF-A0A0F6PNH3-F1.

Por último, ningún SNP detectado en la coinfección BIII/BIV resultó en modificaciones en la secuencia proteica (Tabla 35).

**Tabla 35.** Polimorfismo de un solo nucleótido en el subgenotipo BIII/BIV asignado por *gdh*.

n	Nucleótidos en las posiciones de la secuencia de referencia L40508													
	C 123	T 135	T 183	G 186	C 255	C 273	T 312	C 345	T 366	C 372	T 387	C 396	C 423	A 438
1	Y	Y	C	R	T	T	Y	Y	C	Y	Y			R
1		Y	Y		Y	Y		Y	Y		Y	Y	Y	R
1		Y			Y	Y			Y		C		Y	R

Cabe destacar que ninguno de los cambios aminoacídicos de este apartado modificó el centro activo enzimático, viéndose principalmente afectado el dominio de dimerización.

4.2.3.1.2. *β-giardina*

En el análisis del *locus bg* se obtuvieron los SNPs representados en la Tabla 36.

Tabla 36. Diversidad genética hallada en el gen <i>bg</i> de <i>G. intestinalis</i> .					
Genotipo	Subgenotipo	GenBank ref.	n	SNPs	Id.
A	AII	<a href="#">AY072723</a>	2	-	1
			1	C435Y, 568delA	2
	AIII	<a href="#">AY072724</a>	1	-	3
			1	-	4
			1	A183G, <b>C309T</b> , T425A, C564T	5
			2	<b>C165T, C309T, C324T, C393T, T471C</b>	6
			1	<b>C165T, C309T, C324T, C393T, A464G, T471C</b>	7
			1	<b>C165T</b> , G267A, G268A, <b>C309T, C324T, C393T, T471C</b>	8
			1	<b>C309T</b> , C540T	9
			1	C450T	10
B	-	<a href="#">AY072727</a>	1	G159A, <b>C165T</b> , A274R, <b>C309T, C324T, C393T, T471C</b>	11
			1	G159A, <b>C165T, C309T, C324T, C393T</b> , A412G, <b>T471C</b>	12
			1	G159A, <b>C165T, C309T, C324T, C393T</b> , C423Y, <b>T471C</b>	13
			2	G159A, <b>C165T, C309T, C324T, C393T, T471C</b>	14
			1	G159A, <b>C165T, C309T, C324T, T383Y, C393T, T471C</b>	15
			1	G159A, <b>C165T, T173Y, C309T, C324T, C393T, T471C</b>	16
			2	G159R, <b>C165T, C309T, C324T, C393T, T471C</b>	17
			1	G159R, <b>C165T, G289R, C309T, C324T, C393T, A464R, T471C</b>	18
			1	T143Y, <b>C165T, C309T, C324T, C393T, T471C</b>	19

R: A/G ; Y: C/T ; **destacadas**: mutaciones más prevalentes; GenBank ref.: Referencia de GenBank; Id. Número identificativo asignado a cada secuencia para su estudio filogenético posterior.

Se estudió el tramo que comprende los nucleótidos entre las posiciones 111 y 585 (474 pb) de las secuencias de referencia AY072723, AY072724 y AY072727, encontrándose una elevada heterogeneidad alélica en el genotipo B.

De las 19 muestras con genotipo B, 16 (84,2%) diferían entre sí y 18 (94,7%) de la secuencia de referencia ([AY072727](#)). En total, se observaron hasta 24 SNPs diferentes, donde solo uno (T425A) se correspondió con una transversión, por tanto, el 95,8% de los SNPs fueron transiciones. Además, el 9,4% (10/106) del total de mutaciones fueron mutaciones ambiguas (Y o R).

Muchos de los SNPs detectados se comparten entre los diferentes aislados; encontramos un 89,5% (17/19) que presentan la mutación C309T (Referencia: [AY072727](#)), las mutaciones C165T, C324T, C393T y T471C aparecieron en un 78,9% (15/19) de las secuencias y, por último, en la posición 159 se observaron sustituciones de guanina por adenina en 9 ocasiones (47,4%) o por un doble pico adenina/guanina en 3 secuencias (15,8%) (Tabla 36).

Con respecto al genotipo A, en el subgenotipo All únicamente se encontró en una secuencia la delección de adenina en la posición 568 (Referencia: [AY072723](#)) junto al SNP C435Y; mientras que el único subgenotipo AIII fue idéntico a la secuencia de referencia ([AY072724](#)) (Tabla 36).

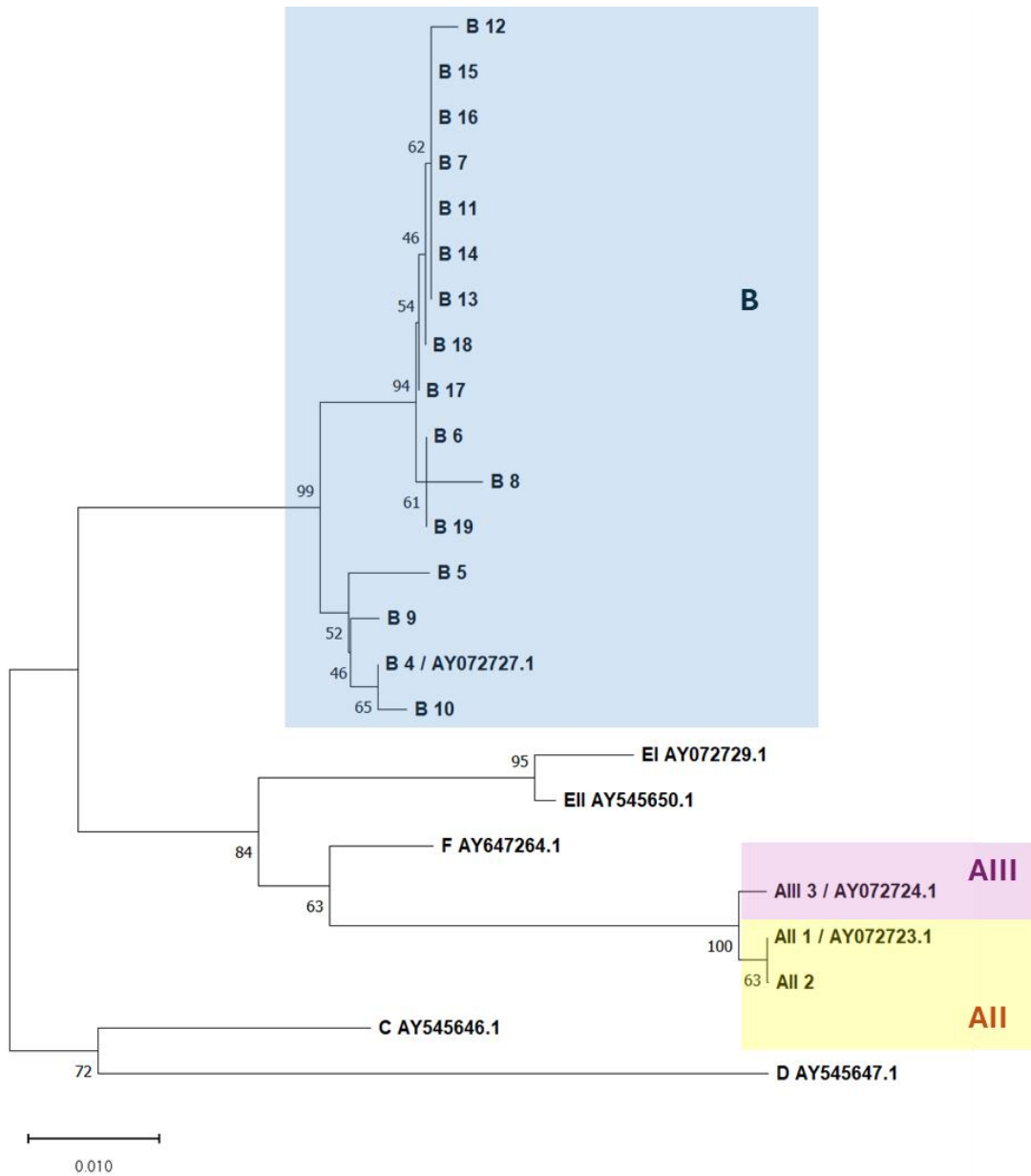
#### **4.2.3.1.2.1. Análisis filogenético**

El estudio evolutivo de las secuencias *bg* mediante *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) se muestra en la Figura 40.

Al igual que en el análisis de *gdh*, el genotipo A se muestra más próximo filogenéticamente a los genotipos E y F que al genotipo B. En este caso, los genotipos C y D aparecen agrupados pero separados del resto de genotipos.

En cuanto a los subgenotipos, dentro del genotipo A se observa una correcta división para cada subgenotipo AIII y All, con un elevado respaldo estadístico (*Bootstrap* 100%).

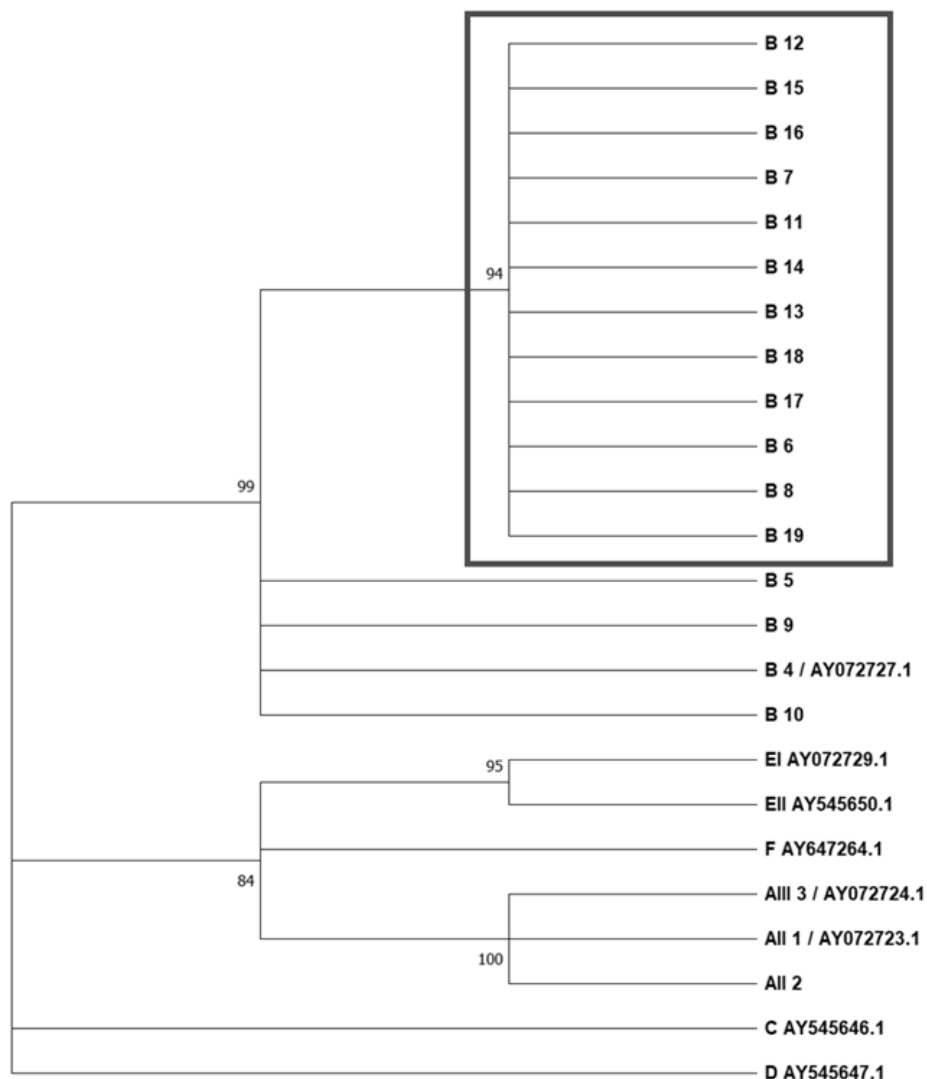
En el caso del genotipo B, podemos observar una posible división en dos clados, uno de ellos está formado por las secuencias de B que acumulan escasas mutaciones con respecto a la secuencia de referencia AY072727 (B4 sin mutaciones, B5 con las mutaciones A183G, C309T, T425A, C564T, B9 con dos mutaciones C309T, C540T y B10 con la única mutación C450T), y, en el otro lado, encontramos las restantes 12 secuencias que comparten las mutaciones C165T, C309T, C324T, C393T, T471C (B6-B8, B11-B19).



**Figura 40.** Relaciones evolutivas obtenidas a partir del método *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) sobre 474 pb de diferentes secuencias del gen codificante para la proteína estructural  $\beta$ -giardina (*bg*) de *G. intestinalis*.

Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el modelo Tamura Nei + G. Debido a que se trata de una proteína única de *G. intestinalis* no se añade grupo externo.

Eliminando las ramas del árbol filogenético con valores de *Bootstrap* por debajo de 80%, con una elevada significancia estadística (99%) podemos separar las 12 secuencias de B6-8 y B11-19 con un nodo común (remarcado en la Figura 41) del resto de secuencias de B (B4, B5, B9 y B10).

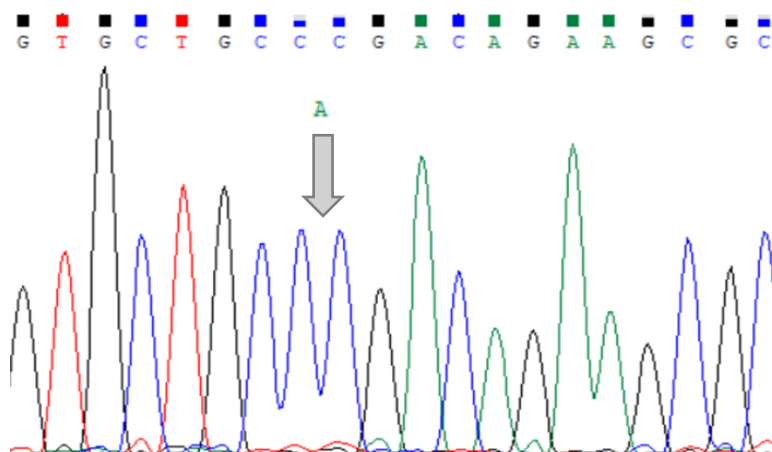


**Figura 41.** Árbol condensado eliminando aquellas ramas con valores de *Bootstrap* inferiores al 80% en el árbol filogenético *Neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) de *bg* de *G. intestinalis*.

#### 4.2.3.1.2.2. Cambios aminoacídicos

En el análisis de mutaciones en las secuencias de *bg*, se encontraron SNPs en aislados caracterizados como subgenotipo All y como genotipo B. Varios de estos polimorfismos se corresponden con cambios aminoacídicos en las proteínas resultantes.

Uno de los dos polimorfismos localizados en el subgenotipo All asignado por *bg*, C435Y (Ref: AY072723), es una mutación sinónima. Sin embargo, la delección de adenina en la posición 568 (Figura 42) cambia totalmente el marco de lectura generando una gran cantidad de modificaciones en la secuencia proteica.



**Figura 42.** Deleción de adenina en la posición 568 (Ref: AY072723) mostrada en la secuencia *forward* del aislado de *G. intestinalis* que acumula esta mutación.

En la Tabla 37 se muestran los cambios de aminoácidos detectados en este estudio debido al tramo que engloba nuestra PCR, sin embargo, podrían alargarse hasta el final de la secuencia.

**Tabla 37.** Polimorfismo de un solo nucleótido en el subgenotipo All asignado por *bg*.

Secuencia de referencia del gen: AY072723	Secuencia de referencia de la proteína: AAL67658	Secuencia de referencia de la proteína completa: XP_001705425
SNP	Cambios aminoacídicos en la proteína	Cambios aminoacídicos en la proteína
568delA	T190R	T205R
	T191Q	T206Q
	E192K	E207K
	A193R	A208R
	L194S	L209S

Por otro lado, en el genotipo B obtenido a partir de *bg*, 9 de los polimorfismos de un solo nucleótido detectados producían cambios de aminoácidos (Tabla 38).

**Tabla 38.** Polimorfismo de un solo nucleótido en el genotipo B asignado por *bg*.

N	Nucleótidos en las posiciones de la secuencia de referencia AY072727																				
	T 143	G 159	C 165	T 173	A 183	G 267	G 268	A 274	G 289	C 309	C 324	T 383	C 393	A 412	C 423	T 425	C 450	A 464	T 471	C 540	C 564
1					G					T						A <sup>8</sup>					T
1			T							T	T		T								C
2		A	T							T	T	Y <sup>6</sup>	T								C
1			T			A	A <sup>3</sup>			T	T		T								C
1										T											T
1																	T				
1		A	T					R <sup>4</sup>		T	T		T								C
1		A	T							T	T		T	G <sup>7</sup>							C
1		A	T							T	T		T		Y						C
2		A	T							T	T		T								C
1		A	T							T	T	Y <sup>6</sup>	T								C
1		A	T	Y <sup>2</sup>						T	T		T								C
2		R	T							T	T		T								C
1		R	T					R <sup>5</sup>		T	T		T					R <sup>9</sup>			C
1	Y <sup>1</sup>		T							T	T		T								C

Proteína de referencia: [AAL67662](#)

<sup>1</sup>p.I48T

<sup>2</sup>p.L58P

<sup>3</sup>p.E90K

<sup>4</sup>p.I92V

<sup>5</sup>p.A97T

<sup>6</sup>p.I128T

<sup>7</sup>p.S138G

<sup>8</sup>p.L142H

<sup>9</sup>p.K155R

Proteína de referencia: [XP\\_001705425](#)

<sup>1</sup>p.I63T

<sup>2</sup>p.L73P

<sup>3</sup>p.E105K

<sup>4</sup>p.I107V

<sup>5</sup>p.A112T

<sup>6</sup>p.I143T

<sup>7</sup>p.S153G

<sup>8</sup>p.L157H

<sup>9</sup>p.K170R

**4.2.3.1.3. Comparativa Glutamato deshidrogenasa y  $\beta$ -giardina**

En la Tabla 39 se realizó una comparativa de los dos *locus*, *gdh* y *bg*, en las 14 muestras en las que se había obtenido genotipo/subgenotipo a partir de ambos.

**Tabla 39.** Diversidad molecular en genotipo/subgenotipo de aquellos amplificados de *G. intestinalis* con resultado de secuenciación tanto de *gdh* como de *bg*.

Geno- tipo	Sub- geno tipo	<i>gdh</i>		<i>bg</i>		
		n	SNPs (id. de <i>gdh</i> )	n	SNPs (id. de <i>bg</i> )	
A	AII	1	-	1	C435Y, 568delA (AII 2)	
		1	G249R (AII 7)	1	-	
	AIII/ AIII	1	AII sin SNPs (AII 2)	1	AIII sin SNPs (AIII 3)	
B	BIII	1	C87Y, C309Y, C351Y (BIII 8)	1	<b>C309T</b> , C540T (B 9)	
		3	-	(BIV 13)	1	G159A, <b>C165T</b> , <b>C309T</b> , <b>C324T</b> , <b>C393T</b> , <b>T471C</b> (B 14)
				1	G159A, <b>C165T</b> , A274R, <b>C309T</b> , <b>C324T</b> , <b>C393T</b> , <b>T471C</b> (B 11)	
	1			G159A, <b>C165T</b> , T173Y, <b>C309T</b> , <b>C324T</b> , <b>C393T</b> , <b>T471C</b> (B 16)		
	BIV	2	T183C, T387C, C396T, C423T (BIV 17)	1	G159A, <b>C165T</b> , <b>C309T</b> , <b>C324T</b> , <b>C393T</b> , <b>T471C</b> (B 14)	
				1	<b>C165T</b> , <b>C309T</b> , <b>C324T</b> , <b>C393T</b> , <b>T471C</b> (B 6)	
	BIII/ BIV	3	T183Y, T387Y, C396Y, C423Y (BIV 18)	1	G159R, <b>C165T</b> , G289R, <b>C309T</b> , <b>C324T</b> , <b>C393T</b> , A464R, <b>T471C</b> (B 18)	
				1	G159R, <b>C165T</b> , <b>C309T</b> , <b>C324T</b> , <b>C393T</b> , <b>T471C</b> (B 17)	
				1	T143Y, <b>C165T</b> , <b>C309T</b> , <b>C324T</b> , <b>C393T</b> , <b>T471C</b> (B 19)	
	BIII/ BIV	1	C123Y, T135Y, T183C, G186R, C255T, C273T, T312Y, C345Y, T366C, C372Y, T387Y, A438R (BIII/BIV 19)	1	A183G, <b>C309T</b> , T425A, C564T (B 5)	
1				T135Y, T183Y, C255Y, C273Y, C345Y, T366Y, T387Y, C396Y, C423Y, A438R (BIII/BIV 20)		

R: A/G ; Y: C/T ; **destacadas**: mutaciones más prevalentes en *bg*; Id: identificativo.

Subrayar las mutaciones C165T, C324T, C393T, T471C (Referencia: [AY072727](#)) que se repiten en todas las secuencias del *locus bg* genotipo B identificados como BIV por *gdh*, estando ausentes en las coinfecciones BIII/BIV o en el aislado BIII. Este resultado coincide con lo obtenido en el análisis filogenético de *bg*, donde las muestras con estas mutaciones (B6-8 y B11-19) se separan del resto. En la Tabla 39 podemos observar esta separación, donde B4, B5 y B9 (id. de *bg*), se asignan por *gdh* como BIII/BIV los dos primeros y como BIII el último, mientras que B6, B11, B14 y B16-19 (id. de *bg*) se alinean con BIV.

Por otro lado, la mutación C309T en el gen *bg* se localizó en todas las muestras con genotipo B, tanto BIII como BIV asignado por *gdh*, con excepción de una muestra con coinfección BIII/BIV en la que no se detectó esta sustitución.

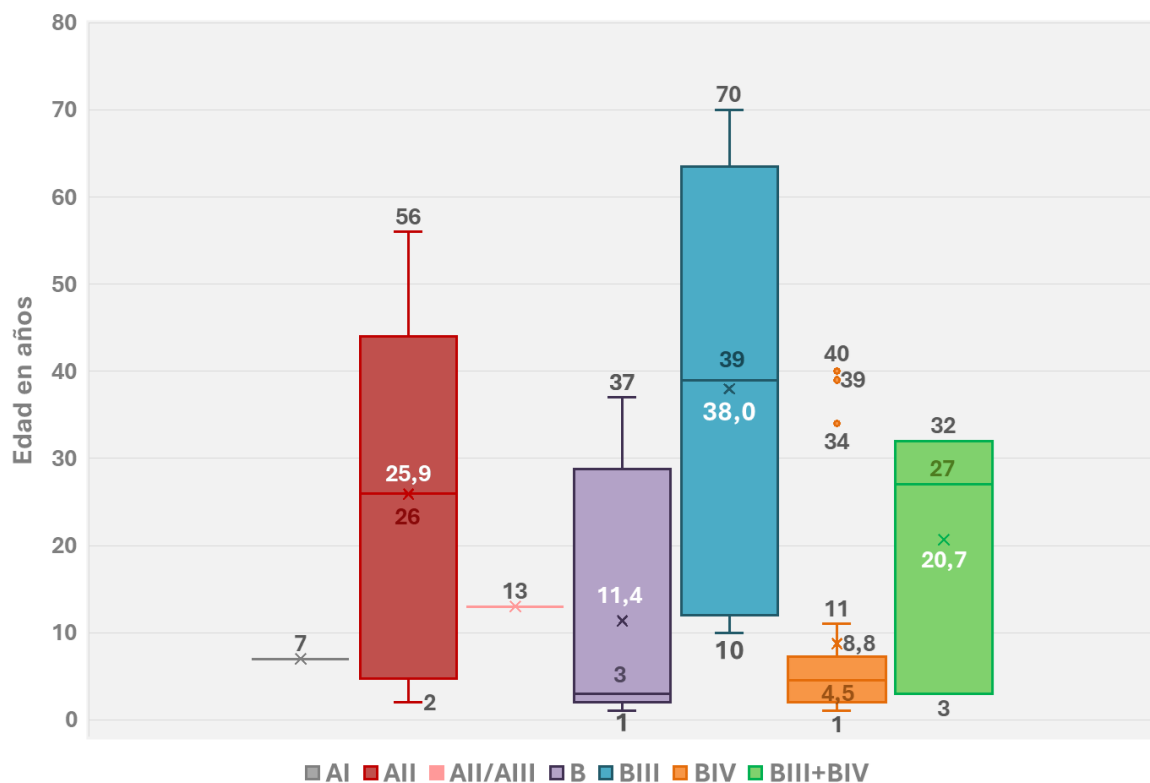
#### 4.2.3.2. Estudio sociodemográfico según genotipado

En el estudio estadístico de la relación de las variables sociodemográficas y los subgenotipos, se excluyeron AI, AII/AIII y BIII/BIV debido al escaso número de casos obtenidos ( $n < 5$ ). Tampoco se tuvo en cuenta aquellos asignados como B sin identificar el subgenotipo.

##### 4.2.3.2.1. Edad y sexo

De los 50 pacientes con aislados de *Giardia intestinalis* genotipados, la media de edad fue de  $16,3 \pm 18,4$  años. Mediante la prueba de Shapiro-Wilk se observó que no existía una distribución normal en los valores de la edad de los pacientes con *G. intestinalis* genotipados ( $W(37) = 0,775$ ;  $p < 0,001$ ), debido a ello, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para establecer relaciones estadísticas entre subgenotipos y la edad de los pacientes. Como resultado se obtuvo la existencia de diferencias significativas entre la edad y la parasitación por un subgenotipo u otro ( $H(2) = 11,963$ ;  $p = 0,003$ ). Las comparaciones múltiples *post hoc* mostraron que las diferencias se establecían entre los subgenotipos BIII y BIV ( $p = 0,009$ ) y entre BIV y AII ( $p = 0,047$ ).

Podemos observar en la Figura 43 que la mediana de edad fue muy dispar entre subgenotipos (BIV 4,5 años [RIQ: 5 años], BIII 39 años [RIQ: 52 años] y AII 26 años [RIQ: 39 años]), con un rango intercuartílico muy pequeño para BIV aun representando una gran parte de nuestra población (44,0%, 22/50). De igual forma, los pacientes parasitados por BIV presentaban una media de edad inferior a BIII y AII ( $8,8 \pm 12,0$  años para BIV frente a  $38,0 \pm 26,2$  años de BIII y  $25,9 \pm 20,3$  años de AII).



**Figura 43.** Distribución de los diferentes subgenotipos de *G. intestinalis* según la edad en años de los pacientes.

x: Media de edad en años; —: Mediana de edad en años.

Aunque no se incluyeron en el análisis estadístico por el escaso número de pacientes parasitados, para BIII/BIV se obtuvo una media y mediana de edad relativamente elevadas con respecto al resto de subgenotipos ( $20,7 \pm 15,5$  años y 27 años, respectivamente), mientras que los 8 pacientes sin subgenotipo B asignado, que quedaron como B, presentaron  $11,4 \pm 15,6$  años de media y 3 años de mediana (RIQ: 27 años). Los únicos pacientes con AI y AII/AIII fueron niños/as (7 y 13 años respectivamente) (Figura 43).

Encontramos que solo un 13,6% (3/22) de los pacientes con BIV fueron adultos (>14 años), con una edad máxima de 40 años (marcados en la Figura 43 como valores atípicos), mientras que para BIII un 60,0% fueron adultos (3/5), englobando a los pacientes más longevos del estudio (57 y 70 años) con el único anciano (Tabla 40).

Al analizar la prevalencia de cada subgenotipo por grupos de edad, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con una asociación de magnitud media ( $\chi^2(4) = 14,416$ ;  $p=0,006$ ;  $V=0,441$ ). Se obtuvo que el subgenotipo AII fue predominante en los adultos con respecto a los

niños/as (40,0% [6/15] frente a 11,8% [4/34]) (p=0,017) y el BIV en los niños/as con respecto a los adultos (55,9% [19/34] frente a 20,0% [3/15]) (p=0,006) (Tabla 40).

**Tabla 40.** Distribución de los grupos de edad en años de los pacientes según el subgenotipo de *Giardia intestinalis*.

Genotipo (n)	Subgenotipo (n)	Niños/as (0-14 años) (%)	Adultos (15-64 años) (%)	Ancianos/as (≥65 años) (%)
A (12)	AI (1)	1 (2,9)	0	0
	AII (10)	6 (17,6)	6 (40,0)	0
	AII/AIII (1)	1 (2,9)	0	0
B (38)	- (8)	6 (17,6)	2 (13,3)	0
	BIII (5)	2 (5,9)	9 (60,0)	1 (100,0)
	BIV (22)	19 (55,9)	3 (20,0)	1 (100,0)
	BIII/BIV (3)	1 (2,9)	2 (13,3)	0
<b>Total (50)</b>		<b>34 (68,0)</b>	<b>15 (30,0)</b>	<b>1 (2,0)</b>

Mediante la prueba de Shapiro-Wilk, se observó que la carga parasitaria en valores de Ct seguía una distribución normal ( $W(37) = 0,962$ ;  $p=0,230$ ) y, por tanto, se puede considerar que la media es un buen descriptor. Debido a que únicamente tenemos un paciente anciano, se eliminó este grupo del análisis. En primer lugar, se comparó la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene, obteniéndose que no es posible rechazar la hipótesis de homogeneidad ( $F: 0,020$ ;  $p=0,888$ ) y, por tanto, se empleó la prueba T-test para muestras independientes para determinar si la carga parasitaria difiere entre los dos grupos de edad. Se observó una desigualdad de medias de Ct entre ambos grupos ( $T(47) = 2,389$ ;  $p=0,021$ ), con una diferencia de 2,4 en este valor medio de Ct entre uno y otro, siendo significativamente mayor en niños/as que en adultos (24,7 [DE: 3,3] para los niños/as y 22,3 [DE: 3,2] para los adultos); por tanto, la carga parasitaria fue más elevada en adultos que en niños/as.

La distribución de los genotipos y subgenotipos fue homogénea entre hombres y mujeres, sin observarse asociación estadísticamente significativa entre el sexo ni el genotipo o subgenotipo detectado ( $F: p=0,742$  y  $\chi^2(2) = 2,293$ ;  $p=0,318$ , respectivamente) (Tabla 41).

**Tabla 41.** Distribución de los diferentes genotipos/subgenotipos de *G. intestinalis* según sexo.

Genotipo	Subgenotipo	Hombres (%)		Mujeres (%)	
A	AI		0		1 (4,0)
	AII	5 (20,0)	4 (16,0)	7 (28,0)	6 (24,0)
	AII/AIII		1 (4,0)		0
B	-		1 (4,0)		7 (28,0)
	BIII	20 (80,0)	4 (16,0)	18 (72,0)	1 (4,0)
	BIV		13 (52,0)		9 (36,0)
	BIII/BIV		2 (8,0)		1 (4,0)
<b>Total (50)</b>		<b>25 (50,0)</b>		<b>25 (50,0)</b>	

#### 4.2.3.2.2. Movimiento migratorio y movilidad internacional

El 88,0% (n=44) de los 50 pacientes habían nacido en España y el 12,0% restante tenían nacionalidad boliviana, saharauí, dominicana (n=1, 2,0% cada uno) y pakistaní (n=3, 6,0%). Un 18,0% (n=9) de los pacientes había realizado un viaje reciente al extranjero antes de la recogida de la muestra de heces. En la Tabla 42 se observa la distribución de los subgenotipos según lugar de nacimiento y viajes.

**Tabla 42.** Distribución de los subgenotipos según lugar de nacimiento y viajes recientes.

		AI (%)	AII (%)	AII/AIII (%)	B (%)	BIII (%)	BIV (%)	BIII/BIV (%)
Lugar de nacimiento (n)  N = 50	España (44)	0	9 (20,4)	1 (2,3)	7 (15,9)	3 (6,8)	22 (50,0)	2 (4,5)
	América (Centro/Sur) (2)	0	1 (50,0)	0	0	1 (50,0)	0	0
	África (1)	0	0	0	0	1 (100,0)	0	0
	Asia (3)	1 (33,3)	0	0	1 (33,3)	0	0	1 (33,3)
Viajes recientes (n)  N = 9	América (Centro/Sur) (2)	0	0	0	0	1 (50,0)	1 (50,0)	0
	África (4)	0	1 (25,0)	0	0	3 (75,0)	0	0
	Asia (3)	1 (33,3)	0	0	0	0	0	2 (66,7)

La nacionalidad y los viajes al extranjero se asociaron significativamente con la presencia de distintos subgenotipos ( $\chi^2 (2) = 8,815$ ;  $p=0,012$ ;  $V=0,488$  y  $\chi^2 (2) = 17,462$ ;  $p<0,001$ ;  $V=0,687$ , respectivamente). Un 80,0% (4/5) de los pacientes con BIII habían realizado viajes recientes fuera de España, un 75,0% (3/4) a África y el paciente restante a Bolivia. Se determinó que la proporción de pacientes con BIII que había viajado pre recogida de muestra (80,0%) fue significativamente superior al del resto de subgenotipos (10,0% [1/10] de AII;  $p=0,010$  y 4,5% [1/22] de BIV;  $p<0,001$ ). De igual forma, hubo más pacientes extranjeros parasitados con BIII (66,7%, 2/3), con respecto a los pacientes españoles (8,8%, 3/34) ( $p=0,005$ ).

Por otro lado, el 90,0% (9/10) de los pacientes con AII eran españoles y no habían abandonado el país recientemente, el restante procedía de República Dominicana. De forma similar, todos los pacientes parasitados por BIV ( $n=22$ ) habían nacido en España y solo uno (4,5%) relataba haber viajado fuera del país antes de remitir la muestra, específicamente a México. El único subgenotipo AI se correspondía con un paciente de Pakistán que acudió al Centro de Salud tras regresar de su país de origen. En cuanto a BIII/BIV, el 66,7% (2/3) de los pacientes habían viajado a Asia (a India o Pakistán). Por último, el subgenotipo ambiguo AII/AIII pertenecía a un paciente español del que no constaba ninguna salida al extranjero reciente.

#### **4.2.3.2.3. Distribución geográfica**

La mayor parte de las muestras caracterizadas procedían de la zona norte (64,0%, 32/50) y únicamente un 10,0% (5/50) se aislaron del sur de Valencia. Hubo una gran cantidad de pacientes procedentes de otros hospitales e, incluso, de fuera de Valencia (26,0%, 13/50).

No existió asociación entre ningún subgenotipo y ningún Centro de Salud ( $\chi^2 (20) = 22,784$ ;  $p=0,300$ ) o zona de Valencia propuesta ( $\chi^2 (2) = 4,219$ ;  $p=0,121$ ). La zona norte presentó la mayor diversidad de subgenotipos, siendo el predominante BIV (34,4%, 11/32), seguido de AII (25,0%, 8/32); mientras que, en el sur, todos los casos se correspondían con el subgenotipo BIV ( $n=5$ ). Los pacientes procedentes de otras Áreas de Salud también mostraron una gran diversidad genética con hasta 4 subgenotipos distintos (AII, AII/AIII, BIII, BIV y BIII/BIV).

El análisis de aquellos subgenotipos que compartían polimorfismos de un solo nucleótido en *gdh* o *bg* tampoco reportó ninguna relación entre los aislados y los Centros de Salud, encontrándose las muestras con las mismas mutaciones dispersas por Centros de Salud, entre norte y sur y por otras áreas de Valencia y de fuera de la ciudad.

La distribución de los subgenotipos según los Centros de Salud se plasma en la Tabla 43.

**Tabla 43.** Prevalencia de cada subgenotipo de *G. intestinalis* por zonas de salud.

Zonas	Centros de Salud y Consultorios Médicos (n)	AI (%)	AII (%)	AII/AIII (%)	B (%)	BIII (%)	BIV (%)	BIII/BIV (%)
Norte	Campanar (8)	0	0	0	2 (25,0)	0	5 (22,7)	1 (33,3)
	Just Ramírez (9)	1 (100)	2 (20,0)	0	3 (37,5)	1 (20,0)	2 (9,1)	0
	Trinitat (3)	0	1 (10,0)	0	1 (12,5)	1 (20,0)	0	0
	Miguel Servet + Azucena (Benicalap) (5)	0	2 (20,0)	0	1 (12,5)	1 (20,0)	1 (4,5)	0
	Salvador Allende (5)	0	3 (30,0)	0	1 (12,5)	0	1 (4,5)	0
	Juan XXIII (2)	0	0	0	0	0	2 (9,1)	0
	<b>Total de Norte (32)</b>	<b>1 (100)</b>	<b>8 (80,0)</b>	<b>0</b>	<b>8 (100)</b>	<b>3 (60,0)</b>	<b>11 (50,0)</b>	<b>1 (33,3)</b>
Sur	Albal (0)	0	0	0	0	0	0	0
	Alcácer (2)	0	0	0	0	0	2 (9,1)	0
	Catarroja (2)	0	0	0	0	0	2 (9,1)	0
	Massanassa (0)	0	0	0	0	0	0	0
	Silla (1)	0	0	0	0	0	1 (4,5)	0
	Beniparrell (0)	0	0	0	0	0	0	0
	<b>Total de Sur (5)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5 (22,7)</b>	<b>0</b>
H.U.P. La Fe (3)	0	0	0	0	0	3 (13,6)	0	
Otros hospitales (10)	0	2 (20,0)	1 (100)	0	2 (40,0)	3 (13,6)	2 (66,7)	
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>1</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>22</b>	<b>3</b>	

La mayor parte de los individuos con *G. intestinalis* de nacionalidad distinta a la española vivían en el norte de la ciudad (83,3%, 5/6), representando el 15,6% (5/32) del total de la población de esta zona, aunque sin asociación estadística entre la nacionalidad y una zona u otra (F: p=0,342).

#### 4.2.3.3. Estudio de la clínica asociada según genotipado

Un 70,0% (n=35) de los 50 pacientes presentaron clínica, siendo el síntoma más frecuente la diarrea aguda (38,0%, n=19). Un 12,0% de los pacientes (n=6) reportaron síntomas sistémicos (fiebre, prurito generalizado, pérdida de peso o astenia) (Tabla 44).

**Tabla 44.** Sintomatología de los pacientes con *G. intestinalis* genotipada (N=50).

Síntomas	N	%
Diarrea aguda	19	38,0
Diarrea crónica	5	10,0
Estreñimiento	1	2,0
Dolor abdominal	8	16,0
Vómitos	3	6,0
Dispepsia/epigastralgia	1	2,0
Meteorismo/flatulencias	3	6,0
Heces de consistencia o apariencia anormal	1	2,0
Proctalgia y/o rectorragia	1	2,0
Prurito anal	5	10,0
Pérdida de peso	2	4,0
Fiebre	1	2,0
Prurito generalizado	3	6,0
Astenia	1	2,0
Asintomático	15	30,0

El análisis de la sintomatología por grupos de edad mostró diferencias en el número de pacientes asintomáticos por grupos ( $\chi^2 (2) = 6,340$ ;  $p=0,042$ ;  $V=0,356$ ), observándose una mayor proporción de niños/as asintomáticos en comparación con los adultos (un 41,2% [14/34] de los niños/as fueron asintomáticos, frente al 6,7% [1/15] de los adultos;  $p=0,016$ ). Sin embargo, ningún síntoma fue más prevalente en un grupo de edad u otro.

Por otro lado, no hubo diferencias en la proporción de pacientes asintomáticos y sintomáticos según el sexo de los pacientes ( $\chi^2 (1) = 0,857$ ;  $p=0,355$ ) y tampoco un síntoma prevaleció sobre otro en un sexo u otro.

No se estableció ninguna asociación entre sintomatología y la parasitación por un subgenotipo u otro (Tabla 45), ni entre ambos genotipos ( $p > 0,05$  para todos los signos y síntomas). A pesar de ello, cabe destacar que todos los pacientes con diarrea crónica y meteorismo o flatulencias presentaron *Giardia intestinalis* BIV ( $n=5$  y  $3$ , respectivamente).

**Tabla 45.** Sintomatología de los pacientes según genotipos/subgenotipos de *G. intestinalis*.

Síntomas (n)	AI n = 1 (%)	AII n = 10 (%)	AII/AIII n = 1 (%)	B n = 8 (%)	BIII n = 5 (%)	BIV n = 22 (%)	BIII/BIV n = 3 (%)	P valor <sup>1</sup>
Diarrea aguda (19)	0	4 (40,0)	0	5 (62,5)	2 (40,0)	6 (27,3)	2 (66,7)	0,719
Diarrea crónica (5)	0	0	0	0	0	5 (22,7)	0	0,139
Estreñimiento (1)	0	1 (10,0)	0	0	0	0	0	0,250
Dolor abdominal (8)	0	1 (10,0)	0	3 (37,5)	0	4 (18,2)	0	0,523
Vómitos (3)	0	2 (20,0)	0	1 (12,5)	0	0	0	0,058
Dispepsia/epigastralgia (1)	0	0	0	1 (12,5)	0	0	0	-
Meteorismo/flatulencias (3)	0	0	0	0	0	3 (13,6)	0	0,329
Heces de consistencia o aparición anormal (1)	0	1 (10,0)	0	0	0	0	0	0,250
Proctalga y/o rectorragia (1)	0	0	0	0	0	1 (4,5)	0	0,704
Fiebre (1)	0	0	0	0	0	1 (4,5)	0	0,704
Prurito generalizado (3)	0	2 (20,0)	0	0	1 (20,0)	0	0	0,091
Prurito anal (5)	0	1 (10,0)	0	1 (12,5)	0	3 (13,6)	0	0,672
Pérdida de peso (2)	0	1 (10,0)	0	0	0	1 (4,5)	0	0,694
Astenia (1)	0	0	0	0	0	1 (4,5)	0	0,250
Asintomático (15)	1 (100)	3 (30,0)	1 (100)	1 (12,5)	2 (40,0)	6 (27,3)	1 (33,3)	0,854

<sup>1</sup> Prueba Chi-cuadrado

No se relacionó ningún genotipo/subgenotipo con la sintomatología sistémica (Genotipo: F:  $p=0,141$  y Subgenotipo:  $\chi^2 (2) = 2,273$ ;  $p=0,321$ ), existiendo un 30,0% de pacientes con AII, 20,0% con BIII y 9,1% con BIV con alguna manifestación de esta índole (3/10, 1/5 y 2/22, respectivamente). Y de forma similar, no se observó una mayor prevalencia de pacientes asintomáticos con ningún genotipo o subgenotipo ( $\chi^2 (1) = 1,023$ ;  $p=0,312$  entre genotipos A y B) (Tabla 45 para subgenotipos).

Mediante análisis estadístico T-test para muestras independientes se determinó que no existían diferencias en la media de Ct entre pacientes sintomáticos y asintomáticos (T (48) = 0,579;  $p=0,565$ ). La diferencia en las medias de Ct fue de solo 0,6 (Ct con valor de 24,4 [DE: 3,9] para pacientes asintomáticos y 23,8 [DE: 3,2] para sintomáticos).

Un 32,0% (n=16) de los pacientes padecía de algún tipo de enfermedad alérgica y un 20,0% (n=10) presentaba afectaciones cutáneas del tipo dermatitis atópica, eccemas o psoriasis, siendo alérgicos un 70,0% de estos 10 pacientes (n=7). La distribución de genotipos/subgenotipos fue similar entre la población general y los pacientes alérgicos (Genotipo: F:  $p=0,486$  y Subgenotipo:  $\chi^2 (2) = 1,578$ ;  $p=0,454$ ).

Un 10,0% de los pacientes (n=5) presentaron algún tipo de inmunosupresión (trasplante renal, aplasia medular por síndrome mielodisplásico, leucemia mieloblástica aguda, esclerosis múltiple en tratamiento inmunosupresor y VIH mal controlado), sin diferencias estadísticas significativas entre genotipo/subgenotipo y la presencia de esta inmunosupresión (Genotipo: F:  $p=0,082$  y Subgenotipo:  $\chi^2 (2) = 2,209$ ;  $p=0,331$ ). Aunque la proporción de pacientes sintomáticos en la población inmunodeprimida fue superior a la inmunocompetente (80,0% [4/5] frente a 68,9% [31/45], respectivamente) estas diferencias no fueron significativas (F:  $p=0,524$ ).

A 24 pacientes (48,0%) se les realizó analítica sanguínea con determinación de eosinófilos, encontrándose en un 33,3% (n=8) la presencia de eosinofilia. De estos pacientes con eosinófilos elevados, un 50,0% (4/8) eran alérgicos y, a su vez, en un 50,0% se encontraron coinfecciones con otros parásitos (*Blastocystis* sp., *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides* sp. o *Endolimax nana*), coincidiendo en dos individuos patología alérgica y la presencia de coinfección. Un 62,5% (5/8) de los pacientes con eosinofilia eran asintomáticos. No se observó relación entre ningún genotipo/subgenotipo y la presencia o ausencia de eosinofilia (Genotipo: F:  $p=0,647$  y Subgenotipo:  $\chi^2 (2) = 0,693$ ;  $p=0,707$ ).

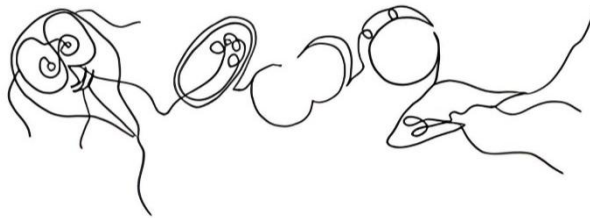
En el análisis coproparasitológico mediante microscopía óptica en heces, se detectó una coinfección con algún otro protista intestinal en un 28,0% (n=14) de los pacientes,

predominantemente con *Blastocystis* sp. (16,0%, n=8/50), seguido de *Endolimax nana* (8,0%, n=4/50) y *Dientamoeba fragilis* (4,0%, n=2/50). No se encontraron diferencias entre la incidencia de ningún síntoma estudiado y ninguna coinfección parasitaria detectada.

Se diagnosticaron 4 pacientes con procesos de reinfección o giardiosis crónica, ya que presentaron aislamientos de *G. intestinalis* en heces en episodios que diferían entre sí en un lapso de 6 meses o más. Todos estos pacientes eran niños/as, con edades comprendidas entre los 2 y 12 años. En tres de ellos se logró realizar la caracterización molecular (al menos en una muestra), siendo los resultados diferentes en todos los casos (B, BIV y All). Los niños/as con B y BIV presentaron prurito anal, y uno de ellos, además, fiebre, mientras que el niño parasitado por All no mostraba síntomas.



## 5. DISCUSIÓN





## 5.1. ANÁLISIS DE RUTINA CON MICROSCOPIA ÓPTICA: PREVALENCIA PARASITARIA Y COINFECCIONES

El espectro parasitario obtenido en nuestra población mediante microscopía óptica concuerda con el de otros estudios similares realizados en España, siendo *Blastocystis* sp. el protista intestinal más frecuentemente observado, seguido de *Giardia intestinalis* (González-Moreno et al., 2011; Bayo et al., 2022; Fernández et al., 2022; Matovelle et al., 2022). No obstante, al focalizar el análisis en la población pediátrica, específicamente en niños menores de 5 años, fue más común el hallazgo de *G. intestinalis* frente a *Blastocystis* sp., tanto en nuestra población como en la de otros estudios españoles (Muadica et al., 2020; Köster et al., 2021a; Hernández-Castro et al., 2023b).

Sin embargo, esta prevalencia podría variar si se modificasen las técnicas de diagnóstico, como queda plasmado en diferentes estudios donde al emplear técnicas de PCR se aumenta considerablemente la frecuencia de *Dientamoeba fragilis*, siendo, incluso, el parásito predominante (Bayo et al., 2022; Fernández et al., 2022).

### 5.1.1. *Blastocystis* sp.

En nuestro estudio se obtuvo un 6,4% de prevalencia para *Blastocystis* sp. En España, en otros trabajos llevados a cabo en una población similar (pacientes ambulatorios y/o hospitalarios) empleando la misma metodología (microscopía óptica), encontramos tasas de prevalencia equivalentes (Barcelona, 7,0%; Zaragoza, 5,0%; Lugo, 8,3%) (González-Moreno et al., 2011; Fernández et al., 2022; Matovelle et al., 2022). Sin embargo, estas frecuencias podrían verse incrementadas si se emplearan técnicas de biología molecular en el diagnóstico. Un ejemplo de ello es el estudio de Bayo y colaboradores en el que la prevalencia de *Blastocystis* sp. fue claramente superior al emplear PCR a tiempo real (qPCR) (28,1%) frente a microscopía (4,8%) (Bayo et al., 2022). Estos valores elevados obtenidos mediante qPCR también se observaron en otros estudios (Caudet et al., 2022b; Fernández et al., 2022). Otros trabajos en población infantil de Madrid muestran valores de 5,6-13,0% empleando PCR convencional dirigida frente a *ssu* ADNr (Muadica et al., 2020; Hernández-Castro et al., 2023b), y esta cifra asciende hasta un 35,2% en familias de Álava con animales domésticos empleando en el diagnóstico esta misma técnica (Paulos et al., 2018).

Centrándonos en Valencia, otros trabajos, aunque llevados a cabo en una población más acotada y específica, mostraron porcentajes de *Blastocystis* sp. semejantes al de nuestra población, empleando microscopía óptica en el diagnóstico. En un estudio en el que se

analizaron heces de pacientes con Trastornos Gastrointestinales Crónicos (TGC), se encontró una prevalencia de *Blastocystis* sp. de un 7,8% (Cifre, 2021) y en otro trabajo llevado a cabo con voluntarios internos del Centro Penitenciario de Picassent se reportó un porcentaje similar (7,0%) (Muñoz-Antoli et al., 2023).

En general, la variabilidad observada en diferentes estudios llevados a cabo en España que emplean microscopía óptica ( $11,0\% \pm 5,6$ ) (Talayero et al., 1998; González-Moreno et al., 2011; Soriano et al., 2011; Ocaña-Losada et al., 2018; Trelis et al., 2019; Cifre, 2021; Bayo et al., 2022; Fernández et al., 2022; Matovelle et al., 2022; Muñoz-Antoli et al., 2023) se debe principalmente a los estudios que incluyen pacientes de zonas endémicas (Talayero et al., 1998; Soriano et al., 2011; Ocaña-Losada et al., 2018). En cambio, cuando se emplean técnicas de PCR, los valores ascienden hasta  $14,7\% \pm 11,7$  con PCR convencional frente a *ssu* ADNr (Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020; Cifre, 2021; Köster et al., 2021a; Hernández-Castro et al., 2023b) y  $31,8\% \pm 11,1$  con qPCR (Bayo et al., 2022; Caudet et al., 2022b; Fernández et al., 2022), y la variabilidad deriva principalmente de los valores extremos observados en familias de Álava empleando PCR convencional (35,2%) (Paulos et al., 2018) y en pacientes con obesidad mórbida empleando qPCR (44,2%) (Caudet et al., 2022b). Si excluimos estos estudios, las cifras descienden en valor y variabilidad hasta un  $8,2\% \pm 3,2$  mediante microscopía, un  $9,6\% \pm 3,0$  mediante PCR convencional y un  $25,5\% \pm 3,6$  mediante qPCR. Esto indica que, a pesar de existir diferencias en las poblaciones estudiadas (como pacientes hospitalarios, pediátricos, con TGC, individuos asintomáticos, población penitenciaria, entre otros), los resultados de prevalencia son similares cuando se emplean las mismas técnicas diagnósticas, por lo que esta parasitosis parece ser común en distintos contextos y localizaciones de España.

Queda reflejado un incremento significativo en las tasas de detección cuando se emplean técnicas de qPCR en lugar de los métodos convencionales de diagnóstico y de PCR convencional, lo que podría indicar que, en nuestra población, la presencia de *Blastocystis* sp. se encuentre subestimada debido a las limitaciones de la técnica de microscopía utilizada.

### 5.1.2. *Giardia intestinalis*

Se estima que la prevalencia de *Giardia intestinalis* en países industrializados oscila entre el 2-7%, mientras que aumenta hasta un 20-30% en países en vías de desarrollo (Carmena et al., 2012; Leung et al., 2019). En el presente estudio, mediante microscopía, se observó una prevalencia de 2,8%, cifra que está en consonancia con los datos reportados para países desarrollados.

En España, encontramos un estudio llevado a cabo en pacientes hospitalarios mediante análisis por microscopía (González-Moreno et al., 2011), que muestra una prevalencia de 3,9%, similar a la del presente proyecto; mientras que, cuando la población a estudio es pediátrica y se emplean técnicas de biología molecular en el diagnóstico, estos valores aumentan considerablemente (Muadica et al., 2020; Bayo et al., 2022), encontrando porcentajes de hasta un 31,6% en niños/as asintomáticos de guarderías de Madrid (Hernández-Castro et al., 2023b).

Encontramos una elevada variabilidad en las tasas de prevalencia de *G. intestinalis* de distintos estudios de Valencia, incluso empleando las mismas técnicas diagnósticas. Mediante microscopía se detectó en un 4,4% de pacientes con TGC (Cifre, 2021) y en un 12,0% de los reclusos de la cárcel de Picassent (Muñoz-Antoli et al., 2023). Estos porcentajes son superiores al del presente estudio, lo que podría orientar a que las condiciones de convivencia en espacios cerrados puedan favorecer la adquisición de este parásito y que presentar alguna enfermedad digestiva crónica pueda ser causa o consecuencia de esta infección parasitaria.

### **5.1.3. Reinfecciones, parasitación crónica y coinfecciones**

Durante los dos años de estudio, un 1,8% (n=128) de los 6987 pacientes tuvieron varios episodios clínicos en los que se observaron formas parasitarias en heces.

Aunque las vías de transmisión son diferentes según el parásito responsable, existen factores de riesgo comunes que pueden conducir a sufrir de reinfecciones. En el caso de los protistas intestinales, la transmisión fecal-oral indirecta por consumo de agua o alimentos contaminados es una de las vías más importantes en la adquisición parasitaria (Wawrzyniak et al., 2013; Einarsson et al., 2016; Vivancos et al., 2018; Leung et al., 2019; Ryan et al., 2021). El aislamiento en España de diferentes protistas en agua de ríos, de riego e incluso aguas cloradas del grifo, muestra un potencial foco de infección (Carmena et al., 2007; Amorós et al., 2010; Castro-Hermida et al., 2015; Ramo et al., 2017). En Valencia existen estudios que evalúan la presencia parasitaria en frutas y verduras distribuidas en la CCAA (Amorós et al., 2010; Trelis et al., 2022; Moreno-Mesonero et al., 2023), en aguas residuales utilizadas para riego de la ciudad (Moreno-Mesonero et al., 2022) y en muestras obtenidas de la Estación de Tratamiento de Aguas para generar agua potable (ETAP) donde el abastecimiento es una mezcla del río Turia y el canal Júcar-Turia (Moreno-Mesonero et al., 2024). En estos estudios se han encontrado *Blastocystis* sp. y *Giardia intestinalis*, además de otros parásitos, en diferentes muestras tanto de agua como de alimentos.

Además, el carácter zoonótico de la mayor parte de los parásitos observados puede contribuir a estas constantes reinfecciones. En España, se han detectado parásitos responsables de provocar patología en humanos tanto en animales domésticos, como en salvajes (Martínez-Díaz et al., 2011; Dado et al., 2012b; Reboredo-Fernández et al., 2015; Sanchez-Thevenet et al., 2019; Calero-Bernal et al., 2020; Köster et al., 2021b; Rego et al., 2023), así como en parques y zonas de juego infantiles donde conviven animales y humanos (Dado et al., 2012a; Lorenzo-Rebenaque et al., 2023). Los hábitos personales de los pacientes, tanto higiénicos en cuanto a consumo de agua no tratada y frutas y verduras sin lavar, como nadar en ríos y el contacto con animales, podrían estar estrechamente relacionados con la posibilidad de sufrir procesos de reinfección.

Por otro lado, el aislamiento parasitario después de 6 meses podría significar la permanencia intestinal de forma crónica y no a nuevas infecciones. En 6 de los pacientes de nuestra población se repitió el aislamiento de *Endolimax nana* y *Entamoeba coli*; ambos se consideran comensales, por lo que no se les aplica tratamiento antiparasitario y podrían permanecer como parte de la microbiota intestinal (Poulsen & Stensvold, 2016; Haidar & De Jesus, 2023). En el caso de *Blastocystis* sp., con 12 pacientes en nuestra población con aislamientos repetidos (2,5%, 12/470), su tratamiento no es necesario cuando estamos ante una infección autolimitada, con la remisión espontánea de los síntomas (Coyle et al., 2012; Sekar & Shanthi, 2013); por lo que, en algunos casos, su detección reiterada también podría ser consecuencia de que no se ha aplicado tratamiento, existiendo literatura que demuestra su capacidad de colonización durante largos periodos de tiempo, manteniéndose como un componente estable de la microbiota intestinal (Scanlan et al., 2014; Andersen & Stensvold, 2016; Forsell et al., 2017; Hernández-Castro et al., 2023b).

Respecto a *G. intestinalis*, hay evidencia científica que demuestra la existencia de portadores crónicos durante meses o incluso años, con casos de giardiosis crónica sintomática y asintomática (Leung et al., 2019; Dunn & Juergens, 2024). En nuestro estudio se observó en 4 pacientes (2,0%, 4/203) la persistencia intestinal de *G. intestinalis* después de 6 meses del primer aislamiento del parásito. Debido a que no se dispone del dato de tratamiento y erradicación en estos pacientes, no se puede concluir que se trate de casos de reinfección o de giardiosis crónica.

En cuanto a las coinfecciones, un 13,5% de las muestras positivas presentaban más de un parásito intestinal. La principal coinfección fue de *Blastocystis* sp. con *E. nana* (51,3%), seguida de *Blastocystis* sp. y *G. intestinalis* (21,2%). En otros estudios llevados a cabo en España, las principales coinfecciones son de *Blastocystis* sp. con *Dientamoeba fragilis* (González-Moreno et

al., 2011; Fernández et al., 2022; Matovelle et al., 2022). El empleo de técnicas de biología molecular parece jugar un papel fundamental en la detección de *D. fragilis* (Fernández et al., 2022), por lo que el estudio de nuestras muestras mediante PCR podría modificar los presentes resultados de coinfección en nuestra población.

## 5.2. ANÁLISIS SOCIODEMOGRÁFICO

### 5.2.1. *Blastocystis* sp.

La mediana de edad de los pacientes con *Blastocystis* sp. fue de 36 años (RIQ: 44 años), siendo significativamente superior a la mediana de edad de los pacientes sin el protista (26 años, RIQ:43 años). Además, la prevalencia en niños/as fue estadísticamente inferior a la de adultos y ancianos/as (4,9%, 7,1% y 8,5%, respectivamente), con un pico observado tras superar los 70 años. Estos datos concuerdan con la evidencia científica existente hasta la fecha de que la presencia de *Blastocystis* sp. aumenta con la edad, siendo más común en adultos y ancianos/as con respecto a niños/as (Abdulsalam et al., 2013; Andersen & Stensvold, 2016; Delshad et al., 2020; Kosik-Bogacka et al., 2021; Köster et al., 2021a; Viesy et al., 2022; Piperni et al., 2024). Es posible que la acumulación de factores de riesgo con el paso del tiempo, como el contacto con animales o los viajes, terminen por ir aumentando la probabilidad de adquirir este protista con los años, favoreciendo su establecimiento en el tracto intestinal donde puede permanecer durante periodos prolongados, lo que explicaría su mayor detección en personas de edad más avanzada (El Safadi et al., 2016; Lhotská et al., 2020).

Por otro lado, la influencia del género no parece tener efecto sobre la colonización o infección por *Blastocystis* sp. (Cabrine-Santos et al., 2015; El Safadi et al., 2016; Delshad et al., 2020), como se observa en nuestros resultados.

Tras dividir Valencia en las dos zonas de salud atendidas por el H.U.P. La Fe, zona norte de la ciudad y la Comarca de la Huerta Sur, encontramos un mayor número tanto de muestras como de positivos de *Blastocystis* sp. que proceden de la zona norte (7,0% de positivos frente a 5,0%). Este dato contrasta con lo esperado, debido a las características de la zona sur, que se localiza más próxima a áreas de cultivo y parques naturales (Parque Natural de La Albufera de Valencia) y, por tanto, proporciona un posible aumento en el contacto con vehículos de transmisión del protista, como el agua de riego, consumo de alimentos de huertas propias y los animales (Tan, 2008; Stensvold et al., 2009c; Parkar et al., 2010; Wang et al., 2014b; Einarsson et al., 2016; Vivancos et al., 2018; Leung et al., 2019; Trelis et al., 2019; Ryan et al., 2021; Attah et al., 2022).

El número de muestras positivas de *Blastocystis* sp. sufrió un aumento paulatino desde el año 2017 a 2019 pero sin asociación entre ninguna estación en concreto. En otros países de Europa, la prevalencia de *Blastocystis* sp. se ve incrementada en los meses más cálidos, durante el verano (El Safadi et al., 2016), posiblemente debido al exceso de humedad y la presencia de altas temperaturas que podrían ser factores de riesgo para la transmisión y adquisición del protista (Javanmard et al., 2018; Nemati et al., 2021b). En cualquier caso, estos datos deben analizarse con cautela, ya que las variaciones estacionales podrían estar influenciadas por factores asociados con el clima más allá de la estación en sí misma, como un incremento en los viajes, mayor consumo de verduras y frutas frescas o el baño en agua de ríos o lagos en los meses más cálidos (González-Moreno et al., 2011). Curiosamente, en nuestro estudio se observó una mayor tasa de positivos (7,5%) durante el invierno, a pesar de que, incluso, se recibieron más muestras en los meses de verano.

### 5.2.2. *Giardia intestinalis*

La media de edad de los pacientes con *Giardia intestinalis* fue de  $13,8 \pm 16,9$  años (mediana de 6 años, RIQ: 12 años), observándose una mayor prevalencia en niños/as en comparación con adultos y ancianos/as, así como una mayor frecuencia en adultos en relación con los ancianos/as. Estos resultados son consistentes con lo esperado, ya que *Giardia* es un parásito que comúnmente afecta a la población infantil (Arancón Viguera et al., 1990; García-Rodríguez et al., 1990), existiendo evidencia de su mayor prevalencia en niños/as menores de 5 años con respecto a edades más avanzadas (Sahagún et al., 2008; Goñi et al., 2010; De Lucio et al., 2015). De igual forma, en nuestra población la mayor frecuencia observada se dio en los niños/as con rango de edad entre 0-5 años (6,5%).

Los hábitos de higiene inadecuados (lavado de manos insuficiente, manipulación de alimentos sin precauciones... etc.) y los entornos de riesgo elevado en los que conviven los niños/as (guarderías, jardines de infancia, parques... etc.), favorece el contacto con tierra, agua no tratada o superficies potencialmente contaminadas con quistes del parásito, lo que los hace más susceptibles a padecer de infecciones o colonizaciones por *Giardia*.

En cuanto al sexo, un mayor porcentaje de hombres (3,3%, 112/3379) presentaron *G. intestinalis* frente a las mujeres (2,3%, 91/3982). En concordancia con nuestros datos, en los informes epidemiológicos sobre la situación de la giardiosis en España a partir de los reportes de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), desde 2017 a 2022, se detectó un mayor porcentaje de *Giardia* en hombres que en mujeres, a razón hombre/mujer de entre 1,2 y 1,5,

según el año (CNE-ISCI, 2023). De igual forma, en el reporte epidemiológico de diferentes países de la Unión Europea, con datos del año 2022, emitido por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC)), también se observó esta predominancia de hombres frente a mujeres (ratio 1,3:1) (ECDC, 2024).

Sin embargo, si analizamos nuestros datos por los grupos de edad propuestos, los dos rangos con mayor prevalencia de *Giardia* fueron entre los 0-5 años (6,5%) en niños/as y entre los 26-30 años (2,5%) en adultos, encontrándose más varones en el grupo de los niños/as (58,2%, 57/98) y más mujeres en el grupo de los adultos (87,5%, 7/8). Existen artículos que relacionan una mayor prevalencia de *Giardia* en mujeres adultas debido al cuidado de menores (Hoque et al., 2001; Feng & Xiao, 2011). Si ampliamos el rango de estudio en nuestros datos considerando adultos jóvenes de entre 26 y 45 años, margen en el que las personas tienen más contacto con niños/as por cuidado de hijos/as, familiares o en contextos de trabajo (como guarderías, colegios, etc.), volvemos a observar un mayor número de mujeres que de hombres infectadas por *G. intestinalis* (58,6% (17/29) de mujeres) mientras que los rangos de edad inferior o superior a estos años propuestos (menores de 25 años y mayores de 46 años) tuvieron una mayor proporción de hombres en ambos casos (57,0% [90/158] en menores de 25 años y 62,5% [10/16] en mayores de 46 años).

En cuanto a la evolución temporal del parásito, en los informes de RENAVE y de la ECDC se observó un repunte de casos en 2022 con respecto a años anteriores, además de darse más casos durante el verano y en el inicio del otoño (CNE-ISCI, 2023; ECDC, 2024). En diferentes estudios de prevalencia de *G. intestinalis* en España, también demuestran esta asociación del parásito a los meses más cálidos y a comienzos del último trimestre del año (Carmena et al., 2012). En nuestra población, se mantuvieron tasas de prevalencia constantes durante los años 2017-2019, observándose una prevalencia ligeramente superior en verano y otoño (3,2% en ambos casos [66/2080 para verano y 55/1741 para otoño], frente al 2,0% [40/1953] de primavera y el 2,6% [42/1587] de invierno), aunque sin diferencias estadísticamente significativas entre estaciones. Al igual que ocurre con *Blastocystis* sp. y otros protistas intestinales, su adquisición en los meses estivales suele ir ligado al uso de piscinas y otras aguas recreativas y el aumento de viajes a zonas endémicas durante el periodo vacacional (González-Moreno et al., 2011).

Por último, la proporción de muestras positivas para *G. intestinalis* fue prácticamente igual en las zonas norte y sur de Valencia, registrándose un 2,7% (121/4510) en el norte y un 3,2% (53/1642) en el sur, siendo esta tendencia similar en todos los Centros de Salud. Esta proporción comparable nos podría indicar que los factores ambientales y socioeconómicos asociados a las infecciones parasitarias (como el consumo de agua tratada, prácticas de higiene, o hábitos alimenticios) son similares en ambas zonas, sin que exista una influencia de la proximidad de la huerta o parques naturales en la transmisión o adquisición del parásito.

### 5.3. ANÁLISIS MOLECULAR

#### 5.3.2. *Blastocystis* sp.

##### 5.3.2.1. Identificación y caracterización molecular: variabilidad genética

A pesar de que, en términos generales, las técnicas de biología molecular proporcionan una mayor tasa de positivos con respecto a la microscopía (Fernández et al., 2022), en el presente trabajo, de las muestras positivas por microscopía, tras realizar PCR convencional frente a *ssu* ADNr de *Blastocystis* sp., se obtuvo un 31,9% (106/332) de resultados negativos. Algunos autores ya han reportado un resultado similar entre el empleo de microscopía óptica y este tipo de PCR convencional en la detección de *Blastocystis* sp. (Cifre, 2021), mientras que en los estudios en la población española analizados con anterioridad, se muestran tasas parecidas entre ambas técnicas (11,0% ± 5,6 mediante microscopía y 14,7% ± 11,7 mediante PCR convencional), mientras que los resultados por qPCR sí marcan una gran diferencia (31,8% ± 11,1). Es importante tener en cuenta la concentración de *Blastocystis* sp. en heces, que puede desempeñar un papel crucial en su detección por este tipo de PCR convencional (Azcona-Gutiérrez et al., 2017). Debido a que este dato no se ha recopilado en el presente estudio, es posible que se haya observado mediante microscopía un escaso número de células en heces en aquellas muestras negativas por PCR convencional, y, por otro lado, también se podrían haber reportado falsos positivos de *Blastocystis* sp. por microscopía debido a la gran diversidad de formas pleomórficas que presenta este protista, en ocasiones difíciles de identificar.

Posteriormente, de entre los positivos por PCR (n=203) se consiguió la caracterización molecular en un 88,7% (n=180) de las muestras. Este podría considerarse un porcentaje de éxito bastante aceptable, similar al obtenido por otros grupos de trabajo que emplean las mismas técnicas de análisis (Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020).

En nuestro estudio, el subtipo mayoritariamente encontrado fue ST1 (34,2%, n=52), seguido de ST2 y ST4 (ambos 18,4%, n=28). Curiosamente, el subtipo ST3, que es el predominante a nivel mundial (Alfellani et al., 2013c; Zhang et al., 2020b), únicamente se identificó en el 16,4% (n=25) de nuestras muestras, apoyando otros análisis moleculares realizados en Valencia donde o no fue detectado o presentó una prevalencia inferior a ST2 (Domínguez-Márquez et al., 2009; Cifre, 2021). Aunque en algunas regiones de España, ST3 predomina sobre el resto de subtipos (Matovelle et al., 2024; Seijas-Pereda et al., 2024), en términos generales, ST2 y ST4 son los subtipos más frecuentes en nuestro país (33,6% ± 17,5 y 30,0% ± 27,0, respectivamente). Estos datos concuerdan con lo observado en nuestra población, sin embargo, llama la atención la elevada prevalencia de ST1 (34,2%), que contrasta con los valores promedios observados en otros estudios españoles los cuales muestran prevalencias de 12,1% ± 9,0 (Domínguez-Márquez et al., 2009; Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020; Cifre, 2021; Hernández-Castro et al., 2023b; Matovelle et al., 2024, Seijas-Pereda et al., 2024).

La considerable prevalencia de ST4 (18,4%) apoya el vínculo de este subtipo a la población europea (Domínguez-Márquez et al., 2009; Stensvold et al., 2011; Bart et al., 2013, El Safadi et al., 2016; Seyer et al., 2017; Piubelli et al., 2019; Gabrielli et al., 2020; Rudzińska et al., 2023; Matovelle et al., 2024), con escasa prevalencia en el resto del mundo (Alfellani et al., 2013c; Zhang et al., 2020b).

El quinto subtipo detectado fue ST6, con una prevalencia bastante elevada (10,5%, n=16) en comparación con otros reportes europeos que informan tasas de ≈ 3% (Menounos et al., 2008; Rene et al., 2009; Poirier et al., 2011; Bart et al., 2013; El Safadi et al., 2016; Seyer et al., 2017; Rudzińska et al., 2019; Rudzińska et al., 2023). Los valores observados en nuestra población se equiparan más a los reportados en países asiáticos, donde el subtipo ST6 es más prevalente (Nemati et al., 2021b). En España, existe escasa literatura al respecto, con un estudio de pacientes atendidos en un hospital de Madrid entre 2020 y 2022 (Seijas-Pereda et al., 2024), donde se observó un 5,5% (12/219) de ST6 y un trabajo Doctoral donde se analizaron pacientes con TGC en Valencia durante los años 2016 y 2019, detectándose una prevalencia de 8,7% (2/23) para este subtipo, un porcentaje que se asemeja más al obtenido en nuestro estudio y que sugiere una posible asociación de ST6 a la ciudad de Valencia.

Los restantes subtipos detectados en este estudio fueron ST7 y ST8, los cuales se aíslan de forma esporádica en humanos a nivel mundial (Alfellani et al., 2013c; Zhang et al., 2020b) y es lo que observamos en nuestra población, con prevalencias de 1,3% (n=2) para ST7 y 0,7% (n=1) para ST8.

Dado que ST6, ST7 y ST8 tienen un marcado carácter zoonótico, principalmente relacionados los dos primeros con aves (Greige et al., 2018; Skotarczak, 2018; Maloney et al., 2020a) y el último, con primates no humanos (Alfellani et al., 2013a; Cian et al., 2017; Skotarczak, 2018; Maloney et al., 2020a), es relevante evaluar el contacto con animales como posible vía de transmisión de estos subtipos. Encontramos un estudio español que vincula la adquisición de ST6 y ST7 con el contacto de los sujetos con pájaros (Seijas-Pereda et al., 2024); en cambio, en otro trabajo de Valencia, los pacientes con ST6 no relataban contacto habitual con aves (Cifre, 2021). Por otro lado, existen evidencias científicas de transmisión de ST8 entre primates no humanos y sus cuidadores en zoos de Reino Unido (Stensvold et al., 2009c), teniendo constancia de la presencia de ST8 en primates de zoos españoles (Köster et al., 2021b; Köster et al., 2022), se afirma la circulación de este subtipo en nuestro país; sin embargo, uno de los dos aislamientos previos de ST8 en España en humanos no se asoció a ningún factor de riesgo relacionado con animales y el otro, aunque existía sospecha de zoonosis, no se conocía con precisión el foco de contagio (Muadica et al., 2020; Köster et al., 2021a). La ausencia de interacción con animales en humanos con subtipos zoonóticos muestra la necesidad de encontrar otras vías de transmisión del protista, como el consumo de agua no tratada. En Valencia se ha comprobado la existencia de ST8 y ST6 en aguas residuales empleadas para riego y de ST6 en aguas de una ETAP (Moreno-Mesonero et al., 2022; Moreno-Mesonero et al., 2024). Sería útil ampliar el estudio en futuros trabajos en Valencia para recabar información sobre el contacto con animales y los hábitos de los pacientes con *Blastocystis* sp. para estudiar sus posibles vías de transmisión.

En cuanto a la variación de los subtipos, el alelo 34 de ST3 y alelo 4 de ST1, son los predominantes a nivel mundial (Ramírez et al., 2016; Sánchez et al., 2017; Seguí et al., 2018; Jiménez et al., 2022; Soleimani Jevinani et al., 2023; Adao & Rivera, 2024; Boutahar et al., 2024; Kwon et al., 2024; Tileklioğlu & Ertabaklar, 2024). En concordancia con estos resultados, en nuestras muestras todos los ST1 se correspondieron con el alelo 4 y en ST3 el alelo 34 fue el predominante (76,0%, 19/25).

La escasa variabilidad alélica documentada en ST1, también la encontramos en ST4, donde, con excepción de un caso, todos los aislados fueron alelo 42. En España, para estos subtipos ST1 y ST4, encontramos la misma estabilidad genética que en el presente estudio, siendo ST1-alelo 4 el predominante y ST4-alelo 42 el único observado en humanos (Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020; Cifre, 2021; Hernández-Castro et al., 2023b; Matovelle et al., 2024). En este trabajo de doctorado se presenta el primer reporte en España de ST4 alelo 92 en humanos, que, hasta la fecha, en nuestro país únicamente se había evidenciado en ratas (Köster et al., 2021b). En otros

países como Irán, China o Italia también se ha detectado este alelo en roedores (Mohammadpour et al., 2020; Marchiori et al., 2024; Shan et al., 2024), mientras que la literatura que evidencia su presencia en humanos es bastante escasa (Marangi et al., 2023).

La conservación genética actual de ST4 se debe al reciente salto interespecie desde su reservorio animal (roedores) al ser humano en Europa (Stensvold et al., 2012b). La aparición de ST4 en humanos se dio en etapas posteriores a otros subtipos, por lo que mientras que el resto presentan una distribución mundial y han evolucionado presentando divergencia genética, la estabilidad en el genoma de ST4 todavía se mantiene, junto con su acotamiento geográfico (Stensvold et al., 2012b; Ramírez et al., 2014).

Por otro lado, en nuestros resultados encontramos una alta variabilidad alélica en los subtipos ST2, ST3 y ST6. Esta heterogeneidad en los alelos detectados de ST2 se comparte con otros estudios del territorio español (Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020; Cifre, 2021), siendo los alelos 9, 11 y 12 los mayoritariamente encontrados en nuestro país. De forma similar, en nuestra población predomina el alelo 12 (42,9%, 12/28) seguido del alelo 11 (35,7%, 10/28).

Con respecto a ST3, en los datos españoles existen discrepancias en la predominancia de sus alelos, con estudios donde se observa una alta variabilidad alélica intrasubtipo (Muadica et al., 2020), como el presente trabajo, y otros con la única existencia o clara dominancia del alelo 34 (Paulos et al., 2018; Cifre, 2021; Matovelle et al., 2024). Estas discordancias se evalúan con más detalle en el apartado de movimiento migratorio y movilidad internacional del presente informe.

Por último, en nuestros datos, la mayor diversificación de alelos se encontró en ST6, detectándose 4 alelos diferentes (122, 123, 134 y 154), además de varias coinfecciones de dos alelos por muestra y la presencia de un alelo indeterminado que no coincide con ninguno reconocido hasta la fecha. A pesar de que el alelo 122 parece ser el más extendido a nivel mundial, habiéndose documentado en diversas regiones del mundo, incluyendo Europa, Asia, América Latina y África (Arisue et al., 2003; Sánchez et al., 2017; Rezaei Riabi et al., 2018; Seguí et al., 2018; Jiménez et al., 2019; Gabrielli et al., 2021; Franklin et al., 2022; Munsaka et al., 2022; Adao & Rivera, 2024), en nuestra población, los alelos mayoritariamente aislados fueron el 154 y 123, ambos en un 43,7% (7/16) de las muestras. En nuestro país, solo disponemos de 2 artículos previos que identifican los alelos de ST6, con un escaso número de muestras (n=3), correspondiéndose con los alelos 122 y 123, aislados y en combinación 122+123 (Cifre, 2021; Salvador et al., 2021).

Estos hallazgos, junto con la presencia significativa de ST6 en nuestra población, podrían sugerir la existencia de factores ambientales locales que faciliten la transmisión de este subtipo y sus diferentes variantes alélicas. En este contexto, la detección de ST6 en aguas residuales de la ciudad apoyaría esta teoría (Moreno-Mesonero et al., 2022). Aunque el contacto con aves es un potencial foco de infección para ST6, aún existen factores de transmisión no comprendidos completamente, como podrían ser el contacto con el medio ambiente o con otras especies animales, que podrían estar contribuyendo a la propagación de este subtipo en nuestro medio. Además, que exista esta mayor diversidad de hospedadores y fuentes de contagio podría explicar la coexistencia de las diversas variantes alélicas observadas. Otro de los motivos que podría generar esta heterogeneidad, es que Valencia es una ciudad con un alto grado de movilidad internacional, lo cual podría haber facilitado la introducción de distintos alelos de *Blastocystis* sp. procedentes de regiones donde ST6 es más prevalente, como Asia (Nemati et al., 2021b), y su posterior mantenimiento y propagación en la población local por motivos todavía desconocidos. Debido a estos resultados, se subraya la necesidad de ampliar estudios para comprender mejor la distribución, variabilidad genética y posibles fuentes de transmisión de los subtipos, en especial ST6, en nuestra población.

#### **5.3.2.1.1. Análisis filogenético**

El árbol filogenético construido agrupa correctamente a los aislados que pertenecen a un mismo subtipo, afirmando el estado monofilético independiente de cada uno de ellos. Además, se evidencian dos clados bien diferenciados, uno formado por los subtipos ST1, 2 y 5, con la relación más cercana entre ST1 y ST2, y un segundo clado que consta de ST3, ST4 y ST8, lo que demuestra una relación filogenética más estrecha entre estos subtipos (Lepczyńska et al., 2017).

Cabe destacar que ST6-Alelo indeterminado difiere del resto de secuencias de ST6 en  $\approx 2\%$  de identidad, hecho que queda reflejado en el estudio evolutivo del subtipo donde este alelo indeterminado se mantiene fuera del grupo formado por el resto de ST6. Sería interesante llevar a cabo la secuenciación del gen *ssu* ADNr completo, con el fin de establecer una correcta caracterización y clasificación de este aislado, que podría representar incluso un nuevo subtipo.

#### **5.3.2.2. Estudio sociodemográfico según subtipado**

##### **5.3.2.2.1. Edad y sexo**

En nuestra población, los subtipos ST4 y ST6 presentan una mediana de edad considerablemente superior al resto de subtipos, con valores de 60 años (RIQ: 24 años) para ST4

y 64,5 años (RIQ: 21 años) para ST6. En el lado opuesto, encontramos ST3, con una mediana de edad de 35 años (RIQ: 36 años) y sin incluir a ningún anciano (>65 años). En los pacientes con ST1, ST2 y ST3 hubo más niños/as que en los pacientes con ST4 y, en el otro extremo, en pacientes con ST6 y ST4 encontramos más ancianos/as que en pacientes con ST1 y ST2. Aunque totalmente anecdótico por el escaso número de muestras, también es interesante que los dos pacientes con ST7 se trataron de ancianos/as, con edades de 71 y 74 años.

En el estudio llevado a cabo por Seijas-Pereda y colaboradores, en Madrid (España), se observaron datos similares, con una edad media menor en los pacientes con ST1 y ST2 (29 y 28 años, respectivamente) con respecto a ST4 y ST6/ST7 (48 y 51 años, respectivamente), siendo los niños/as con menor edad los que más frecuentemente presentan ST1 y ST2 (10 y 9 años, respectivamente) (Seijas-Pereda et al., 2024). Pese a que en otros trabajos se observó también esta diferencia de edad entre subtipos, con pacientes de edad más avanzada con ST4 y ST7 (Stensvold et al., 2009a; Cifre, 2021) o relacionando ST2 con niños/as (Matovelle et al., 2024), siendo este subtipo el predominante en varios estudios de población infantil (Muadica et al., 2020; Hernández-Castro et al., 2023b), también encontramos resultados totalmente opuestos, como un estudio donde el aislamiento de ST4 se dio mayoritariamente en pacientes con menos de 16 años (Matovelle et al., 2024) o, incluso, otros trabajos que exponen la inexistencia de asociación entre la edad y la presencia de un subtipo u otro (Piubelli et al., 2019).

En cuanto al género, se observaron porcentajes más elevados de ST4 y ST6 en mujeres (71,4%, 20/28 y 62,5%, 10/16, respectivamente), y de ST1 y ST3 en hombres (67,3%, 35/52 y 64,0%, 16/25, respectivamente), con diferencias estadísticamente significativas para ST1 y ST4. Curiosamente, esta diferenciación basada en el sexo de los pacientes también se observó en otros estudios, que determinaron un mayor porcentaje de ST4 y ST6 en mujeres y de ST1 y ST3 en hombres (Forsell et al., 2012; Cifre, 2021; Seijas-Pereda et al., 2024).

Sería interesante en futuros proyectos profundizar en las diferencias debido al sexo y la edad, estudiando los diferentes factores de riesgo diferenciales, como variaciones en las condiciones ambientales u ocupacionales asociadas, factores hormonales o microbiota, además del posible mecanismo de transmisión de cada subtipo para entender por qué existe una mayor frecuencia de unos subtipos sobre otros según el hospedador tenga una edad u otra o sea hombre o mujer.

#### **5.3.2.2.2. Movimiento migratorio y movilidad internacional**

La elevada prevalencia obtenida de ST1 (34,2%, n=52), muy dispar con el resto de estudios españoles (12,1% ± 9,0) (Domínguez-Márquez et al., 2009; Paulos et al., 2018; Cifre, 2021; Köster

et al., 2021a; Muadica et al., 2020; Hernández-Castro et al., 2023b; Matovelle et al., 2024; Seijas-Pereda et al., 2024), podría sugerir que este subtipo proceda de pacientes de otros países donde ST1 sea más común, sin embargo, no se observó relación estadística con viajes o nacionalidad de los pacientes (un 19,2% [10/50] de los pacientes con ST1 había viajado fuera de España y un 21,1% [11/52] de pacientes con ST1 eran extranjeros). La estabilidad genética observada en este subtipo, donde todos los ST1 analizados se correspondieron con el alelo 4, tanto en pacientes locales como en individuos procedentes de África, Asia y América, refleja su amplia distribución geográfica y su conservación genética, siendo este alelo el predominantemente informado en la mayor parte de regiones del mundo (Ramírez et al., 2016; Sánchez et al., 2017; Seguí et al., 2018; Jiménez et al., 2022; Soleimani Jevinani et al., 2023; Adao & Rivera, 2024; Boutahar et al., 2024; Kwon et al., 2024; Tileklioglu & Ertaaklar, 2024,).

Por otro lado, se observó una relación estadística entre la nacionalidad de los pacientes y los subtipos ST3 y ST4. La variable nacionalidad por sí sola no es un determinante directo para la colonización o infección por un subtipo de *Blastocystis* sp. o genotipo de *Giardia intestinalis* específico. Sin embargo, sí podría acarrear consigo factores de riesgo que favorecen esta transmisión, como el contacto estrecho con familiares que viven en zonas endémicas o los viajes a estas regiones, donde, por el hecho de ser países natales, el viajero no se comporta como un turista, adoptando menos precauciones (como consumir agua no embotellada o residir en alojamientos locales) que aumentan la probabilidad de adquirir estos enteroparásitos. Aunque un viaje reciente, y más si va acompañado con la remisión de una muestra de heces y sintomatología, es claramente un factor de riesgo relevante para poder establecer asociaciones con la adquisición del parásito durante este viaje, la capacidad de que los dos protistas analizados en el presente estudio puedan permanecer durante largos periodos en el tracto gastrointestinal hace plausible su adquisición en viajes realizados meses o incluso años previos a este diagnóstico. Como con los datos que disponemos es imposible asegurar cuándo y dónde se ha contraído el protista, se aporta la información de la nacionalidad como posible factor a tener en cuenta.

En el caso de ST3, existía una elevada proporción en pacientes extranjeros (37,5%, 12/32). Si analizamos más en detalle la diversidad alélica de este subtipo en la literatura, los alelos 34, 36 y 37 se encuentran ampliamente distribuidos, con casos caracterizados en todos los continentes, sin embargo, existen alelos que, hasta la fecha, se encuentran conservados por localización, como el 23 y 56 que se han restringido a Asia, los tres alelos 52, 101 y 136 que se han reportado exclusivamente en África y hasta 11 alelos únicos de Europa, 44-47, 49-51, 53, 54,

127 y 128 (Nemati et al., 2021a). Hay que tener en cuenta que la mayor parte de los estudios epidemiológicos publicados reportan caracterización molecular a nivel de subtipo, no de alelo, por lo que es complicado establecer una representatividad poblacional alélica.

En nuestra población, todos los pacientes españoles presentaron el alelo 34, uno de ellos con coinfección de 34 y 36. Los restantes alelos de ST3 caracterizados (36, 37 y 37+136) se correspondieron con pacientes de diversas nacionalidades de América (Alelo 36, Bolivia y Alelo 37, República Dominicana) y África (Alelo 36, Congo y Alelo 37+136, Senegal). Curiosamente, el único alelo 136 aislado pertenecía a un paciente de origen senegalés, lo que concuerda con el posible carácter endémico de este alelo en la población africana (Nemati et al., 2021a).

Esta diferenciación alélica por nacionalidades, junto con la baja prevalencia global de ST3 en nuestra población (16,4%, n=25) con respecto a la proporción observada en el resto del mundo, sugiere la posible importación de este subtipo a nuestro Área de Salud debido a la migración. Además, la variabilidad en los estudios actuales españoles donde en unos trabajos se observa una predominancia clara o única existencia de ST3-Alelo 34 y otros con una elevada heterogeneidad de alelos, podría deberse a la nacionalidad de la población a estudio y la mayor o menor afluencia de extranjeros en cada zona. Estas conclusiones concuerdan con los datos mostrados en un trabajo de Zaragoza donde se obtuvieron los alelos 34 y 36 de ST3, relacionando este último alelo a pacientes extranjeros, ya que un 66,7% (2/3) de estos pacientes con ST3 alelo 36 habían nacido fuera de España (América y África) (Matovelle et al., 2024). De forma similar, en otro estudio de Madrid donde se caracterizó *Blastocystis* sp., también se observó un mayor porcentaje de pacientes extranjeros con ST3 con respecto a los españoles ( $p=0,002$ ) (Seijas-Pereda et al., 2024). Es importante señalar que estas interpretaciones están basadas en tamaños muestrales muy reducidos, necesitando de estudios con una mayor representatividad para poder confirmar asociaciones.

En contraposición, en nuestra población encontramos una mayor frecuencia de pacientes nacidos en España con ST4 (22,7%, 27/119), con respecto a los nacidos en otros países (3,1%, 1/32). Debido a que ninguno de nuestros pacientes extranjeros procedía de otros países de Europa, estos resultados sostienen el arraigo de ST4 a este continente. A destacar el único paciente no europeo con ST4 que, además, se correspondía con el único alelo 92, discrepante del resto de ST4 que se identificaron como alelo 42. En un estudio italiano se relacionó ST4-Alelo 92 con pacientes africanos, encontrando que el 66,7% (4/6) de los pacientes con este alelo procedían de diferentes países de África (Marangi et al., 2023), resultado que concuerda con nuestros datos, siendo nuestro paciente un varón de Guinea Ecuatorial. Esta observación, si bien

aislada y no concluyente, plantea interrogantes sobre un posible vínculo geográfico de este alelo, que requiere un análisis más profundo y con un mayor tamaño muestral.

En el caso de los subtipos ST2 y ST6, la alta variabilidad alélica encontrada en nuestra población podría achacarse a la movilidad humana y el intercambio de personas que viajan o emigran entre distintas regiones del mundo, lo que favorecería la circulación de diferentes variantes genéticas de estos subtipos, generando una mezcla de alelos locales y foráneos. Sin embargo, no conseguimos establecer una relación estadística entre los subtipos ST6 y ST2 y la nacionalidad o movilidad internacional de nuestros pacientes, un 81,2% (13/16) con ST6 y un 78,6% (22/28) con ST2 habían nacido en España y un 93,7% (15/16) con ST6 y un 89,3% (25/28) con ST2 no relataba viajes al extranjero. Estos resultados no invalidarían la teoría expuesta en apartados anteriores sobre la posible introducción de diferentes alelos debido a una población inicial diversa procedente de distintas partes del mundo, con una posterior perpetuación y diseminación en Valencia de ST6 y ST2 junto con sus variantes alélicas, por motivos todavía desconocidos. Aunque su aparición también podría deberse a otros factores, como distintos reservorios animales y medio ambiente, así como distintos focos de transmisión anteriormente descritos.

Cabe destacar que la hipervariabilidad alélica encontrada en ST2 ya ha sido reportada en otros estudios españoles donde, además, este subtipo era el predominante (Paulos et al., 2018; Muadica et al., 2020), lo que demuestra que existe una heterogeneidad elevada de ST2 en nuestro país. En nuestra población encontramos una distribución cosmopolita de los alelos de este subtipo; mientras que todos los pacientes con alelo 9 y 11 fueron españoles (39,3%, 11/28), el alelo 12 se aisló en pacientes de diversas nacionalidades, un 75,0% (9/12) habían nacido en España y los tres restantes en Ecuador, Marruecos y Colombia. En cuanto a las coinfecciones, el único paciente con 12+68 era español y el 100% los pacientes con los alelos 11+12 (n=4) eran o habían viajado fuera de España (Nicaragua, México, Marruecos y Cuba).

En cuanto a ST6, el único paciente que refería un viaje reciente al extranjero, específicamente a Tailandia, presentó el ST6-Alelo indeterminado. En Tailandia, el subtipo ST1 es el predominante (Nemati et al., 2021b), sin embargo, también se ha aislado ST6, tanto en humanos, como animales y en el medio ambiente (Sanpool et al., 2015; Palasuwan et al., 2016; Jinatham et al., 2021), incluso posicionándose en algunas poblaciones como el segundo subtipo mayoritario (Thathaisong et al., 2013), por lo que la adquisición del protista durante el viaje podría ser plausible. No obstante, no puede descartarse que la infección se haya adquirido en nuestro entorno, donde, como se evidencia en el presente estudio, también hay una alta prevalencia.

Por otro lado, es importante reseñar que el 100% (n=4) de los pacientes con ST6-Alelo 134 fueron españoles, así como el 87,7% (6/7) de los pacientes con ST6-Alelo 154 solo o en coinfección con otros alelos (el restante pertenecía a un paciente colombiano sin reportes de viajes recientes y se mostró en coinfección con el alelo 122). Debido a la reciente inclusión del alelo 154 en la base de datos PUBMLST *Blastocystis*, su prevalencia a nivel global podría estar infradiagnosticada, pudiéndose haber reportado en estudios previos como otros alelos con mutaciones puntuales. En la base de datos NCBI GenBank, encontramos hasta 4 secuencias con 100% de identidad con ST6-Alelo 154 del presente estudio, pertenecientes a individuos de Polonia, Irán y República Checa (Id. GenBank: [KU684643](#), [MN014065](#) y [MT039591](#)) y a faisanes de Italia (Id. GenBank: [MZ242081](#)) (Kaczmarek et al., 2017; Sharifi et al., 2020). En el caso del alelo 134, existen reportes de su aislamiento en humanos principalmente en América Latina (Sánchez et al., 2017; Seguí et al., 2018; Jiménez et al., 2019; Maloney et al., 2021a), sin embargo, nuestros pacientes con este alelo fueron todos españoles, lo que podría sugerir la posible introducción y posterior permanencia de este alelo en nuestra población.

Por último, los aislamientos caracterizados como ST7 y ST8 procedían de pacientes nacidos en España que no habían realizado viajes fuera del país en un período reciente. No disponemos de datos previos en humanos sobre alelos de ST7 en España, aunque el alelo 99 ha sido identificado en diversos países como Irán, Brasil y Singapur (Melo et al., 2020; Deng et al., 2021; Mohammad Rahimi et al., 2022b), el alelo 104 se ha encontrado en Francia (Pennell & Kurtz, 1989) y el alelo 137 en diferentes países asiáticos (Souppart et al., 2009; Deng et al., 2021). En cuanto al subtipo ST8-Alelo 21, ha sido previamente detectado en una niña y en primates no humanos en un zoológico en España (Muadica et al., 2020; Köster et al., 2021b), así como en varios países, incluidos Brasil, Corea, Italia, Reino Unido y Estados Unidos (Scicluna et al., 2006; Whipps et al., 2010; Meloni et al., 2011; Seguí et al., 2018; Muadica et al., 2020; Kwon et al., 2024). Nuestros datos demuestran que diferentes alelos de ST7, así como el alelo 21 de ST8, aunque principalmente identificados en otras regiones del mundo, también están presentes en nuestro país, lo que indica una circulación local de estos subtipos y sus variantes. La importancia de que los pacientes no hayan viajado fuera del país refuerza la hipótesis de que estos alelos están siendo transmitidos dentro de España, tanto en humanos como en animales, lo que recalca la relevancia del monitoreo local para comprender su distribución y propagación.

Es importante tener en cuenta que, debido a los escasos estudios con análisis de la diversidad alélica a nivel mundial y la presencia de personas asintomáticas que portan este protista, es muy

probable que exista circulando en la población humana una variedad de subtipos y alelos superior a la que hoy en día está documentada.

#### **5.3.2.2.3. Distribución geográfica**

Tanto en la zona norte como en la zona sur de Valencia se mantuvo el ST1 como predominante. A pesar de que no se evidenció asociación de ST4 a ninguna de ambas zonas, se dio un porcentaje mayor de ST4 en el norte frente al sur (22,3% y 13,2%, respectivamente) con un 83,3% (5/6) de Centros de Salud del norte en los que se aísla ST4, frente al 60,0% (3/5) del sur; habiendo incluso dos Centros de Salud del norte (CAP de Trinitat y CAP de Benicalap) donde la proporción de ST4 fue superior a la de ST1. Existen estudios realizados en ratas de la ciudad de Valencia (incluyendo la zona norte pero no la sur) que evidencian la presencia de *Blastocystis* sp. en estos roedores, lo que podría suponer un posible reservorio de este subtipo en zonas urbanas (Galán-Puchades et al., 2023). Sin embargo, cabe destacar que las infecciones derivadas de los 4 subtipos predominantes en nuestra población (ST1-ST4), suelen deberse a transmisión interhumana, sin que intervenga un foco zoonótico, por lo que esto podría explicar los datos obtenidos similares entre el norte y el sur de Valencia, sin que la zona de la Huerta y parques naturales influya de forma significativa en la prevalencia de cada subtipo (Ghafari-Cherati et al., 2024; Piperni et al., 2024).

Por otro lado, en cuanto a los subtipos con mayor carácter zoonótico, el ST6 se observó en mayor proporción en el sur (13,2% frente a 7,4% del norte), con más Centros de Salud de esta zona en los que se detectó (60,0%, 3/5 del sur y 33,3%, 2/6 del norte). Mientras que el subtipo ST7, con similar mecanismo de transmisión que ST6, asociados ambos a aves y murciélagos, quedó restringido al norte de la ciudad, con lo que el foco de infección de ambos podría ser diferente en nuestra población, apoyando la hipótesis de que existen fuentes de contagio y rutas de transmisión en nuestro medio todavía no identificadas. Sin embargo, el escaso número de pacientes con ST7 no nos permite establecer conclusiones firmes.

En relación con ST3, el cual se ha vinculado en apartados anteriores con la población extranjera, se observó una mayor proporción en el sur que en el norte (21,2% frente a 12,8%, respectivamente). No obstante, se comprobó que la población extranjera con *Blastocystis* sp. era mayor en la zona norte de la ciudad en comparación con el sur, lo que, en principio, debería correlacionarse con una prevalencia de ST3 más elevada en esta área. Sin embargo, al analizar con mayor detalle las variantes alélicas y su distribución entre el norte y el sur, encontramos que el 87,5% (7/8) de los alelos en el sur se correspondían con el alelo 34, mientras que en el norte

existía una mayor diversidad, relacionado con que el 66,7% (8/12) de los pacientes con ST3 en el norte eran originarios de otros países, frente al 37,5% (3/8) en el sur. Estos datos refuerzan la hipótesis de que el alelo 34 de ST3 podría considerarse autóctono, predominando en zonas con baja prevalencia de población extranjera, mientras que el resto de los alelos podrían haber sido importados desde otros países.

### 5.3.2.3. Estudio de la clínica asociada según subtipado

*Blastocystis* sp. se ha vinculado en numerosas ocasiones con el padecimiento tanto de afectaciones intestinales, del tipo diarrea aguda, dolor abdominal y meteorismo (Tan, 2008; Tan et al., 2010; Del Cocco et al., 2017) como de afectaciones extraintestinales, tales como artritis reactiva y urticaria crónica (Tejera et al., 2012; Bahrami et al., 2019; AlamLih et al., 2020). Sin embargo, debido a su alta prevalencia, aislándose tanto en pacientes sintomáticos como en la población sana, su rol patogénico sigue siendo foco de discrepancias, existiendo literatura tan confrontada como la que atribuye beneficios a la presencia intestinal de *Blastocystis* sp. por la reducción de marcadores inflamatorios, aceleración en la recuperación de colitis y regulación de la microbiota intestinal (Billy et al., 2021; Deng & Tan, 2022), como la que asegura su implicación en disbiosis o en el desarrollo de pólipos y cáncer colorrectal (Yason et al., 2019; Hussein et al., 2023).

En diversas ocasiones se ha propuesto la infección según subtipos como posible etiología en la aparición o no de sintomatología. En los últimos años, varios autores han relacionado los subtipos ST4 y ST7 con pacientes sintomáticos (Domínguez-Márquez et al., 2009; Stensvold et al., 2011; Mattiucci et al., 2016; Yason et al., 2019; Deng et al., 2021). Sin embargo, existen detractores de esta propuesta con numerosos estudios que no observan diferencias significativas entre la presencia de un subtipo u otro y la manifestación clínica (Yoshikawa et al., 2004b; El Safadi et al., 2016; Seyer et al., 2017; Aynur et al., 2019; Rudzińska et al., 2019; Salazar-Sánchez et al., 2020; Shasha et al., 2024). Algunos autores, incluso tras descartar otras coinfecciones y estudiar únicamente pacientes mono infectados con *Blastocystis* sp., no consiguieron establecer asociación entre el subtipo y la presencia de diarrea o dolor abdominal (Seijas-Pereda et al., 2024). Nuestros resultados continúan en esta línea, sin encontrar asociación entre ningún subtipo y la presencia o ausencia de sintomatología, siendo el subtipo ST4 en el que mayor proporción de pacientes sintomáticos encontramos (89,3%, 25/28), principalmente con diarrea aguda (28,6%, 8/28) y crónica (32,1%, 9/28). En el otro extremo, dentro del grupo con ST3 es donde más pacientes asintomáticos se observaron (32,0%, 8/25).

En el caso de ST7, otro de los subtipos que en los últimos años se ha postulado como potencialmente patógeno, solo uno de los dos pacientes con este subtipo en nuestra población presentó síntomas (prurito anal y astenia).

El paciente con ST8, subtipo aislado esporádicamente en humanos, presentaba diarrea crónica de 3 meses de evolución, distensión abdominal, meteorismo y pérdida de peso, y, a su vez, padecía de diverticulosis crónica como enfermedad subyacente. Los escasos reportes de este subtipo en la población mundial demuestran su existencia tanto en sujetos sintomáticos, con dolor abdominal y diarrea (Whipps et al., 2010; Meloni et al., 2011; Kwon et al., 2024), como en asintomáticos (Muadica et al., 2020).

En cuanto a las diferentes manifestaciones clínicas, se observó una elevada proporción de pacientes con heces de consistencia o apariencia anormal, en algunas ocasiones con presencia de moco o sangre, y ST6 (44,4%, 4/9). Aunque *Blastocystis* sp. no suele causar la aparición de moco, sangre o pus en heces, existen reportes de casos clínicos con diarrea sanguinolenta asociada a este parásito (Lucía et al., 2007; Boorom et al., 2008; Janarthanan et al., 2011); sin embargo, el mecanismo patogénico por el que se produce esta sintomatología todavía no está descrito. Los factores de virulencia de *Blastocystis* sp. se encuentran por definir, aunque diversos estudios apuntan a que la producción de proteasas, mayoritariamente proteasas de cisteína, son las principales implicadas en su patogénesis, mediando en la permeabilidad intestinal y en la evasión del sistema inmunitario (Sio et al., 2006; Wawrzyniak et al., 2012; Ajjampur & Tan, 2016; Nourrisson et al., 2016; Gonzalez-Arenas et al., 2018). Se ha postulado que exista disimilitud entre los ST de *Blastocystis* sp. y la producción de proteasas (Argüello-García et al., 2023); subtipos como el ST4, ST6 y ST7 se han asociado a una elevada producción de estas enzimas (Abe, 2004; Al & Hökelek, 2007; Mirza & Tan, 2009; Nourrisson et al., 2016; Defaye et al., 2020; Karamati et al., 2021; Argüello-García et al., 2023). Por otro lado, la capacidad invasiva de *Blastocystis* sp. está en entredicho, estudios llevados a cabo en cerdos, a pesar de observar formas vacuolares/granulares en el material luminal intestinal, no muestran evidencia de unión o invasión (Fayer et al., 2014; Wang et al., 2014a), sin embargo, otro estudio en ratas ha demostrado la capacidad de *Blastocystis* ST1 de adherirse a la lámina propia del intestino, generando úlceras y edema de la mucosa (Li et al., 2013), aunque este mecanismo no ha sido observado *in vivo*, tras la colonización humana (Clark et al., 2013). Es por ello que se cuestiona que *Blastocystis* sp. pueda ser responsable de sintomatología tal como la presencia de moco y sangre en heces, siendo, probablemente, este síntoma derivado de alguna otra causa no identificada.

Centrándonos en los síntomas sistémicos, en diferentes ocasiones *Blastocystis* sp. ha sido señalado como agente causal de afectaciones dermatológicas, del tipo urticaria, tanto aguda como crónica, angioedema, lesiones cutáneas y prurito (Casero et al., 2015; Lepczyńska et al., 2016; Bahrami et al., 2019; Aykur et al., 2022). La capacidad de *Blastocystis* sp. para modular en la permeabilidad intestinal parece jugar un papel fundamental en el desarrollo de estas afectaciones dermatológicas, al promover la producción de citoquinas proinflamatorias y reacciones alérgicas mediadas por IgE (Lepczyńska et al., 2016; Aykur et al., 2022). Debido a la posible diferencia entre subtipos en la modificación de esta permeabilidad, se han postulado los subtipos ST2, ST3 y ST4 como los principalmente asociados con estas manifestaciones cutáneas, especialmente en sus formas ameboides (Lepczyńska et al., 2016; Bahrami et al., 2019; Aykur et al., 2022). En nuestra población, un 27,6% (42/152) de los pacientes padecían de afectaciones crónicas de la piel y un 5,9% (9/152) presentaron prurito generalizado en el momento de remitir la muestra de heces. Además, este prurito se presentaba como único síntoma en un 55,5% (5/9) de estos pacientes, hecho que se repite en otros estudios en los que las afectaciones cutáneas aparecen sin ir acompañadas de síntomas gastrointestinales (Bahrami et al., 2019; Aykur et al., 2022). Sin embargo, no se asoció ni las manifestaciones cutáneas ni la afectación sistémica de prurito, como ninguno de los otros síntomas de esta índole sistémica (fiebre, pérdida de peso y/o astenia), con ningún subtipo en particular. En cuanto a los tres subtipos relacionados en la literatura con afectaciones cutáneas, en nuestros pacientes con prurito generalizado, únicamente un 11,1% presentaban ST2 o ST3 (n=1 de ambos), siendo ST4 el subtipo mayoritariamente aislado (33,3%, 3/9); mientras que en los pacientes con enfermedades dermatológicas del tipo dermatitis atópica o similares, el subtipo predominante fue ST1 (42,9%, 18/42).

Relacionado con estas reacciones dermatológicas, cabe destacar el elevado número de pacientes en nuestra población con patologías alérgicas de base (32,9%, n=50), dentro de los cuales, un 38,0% (n=19) mostraban afectaciones crónicas de la piel. En diferentes trabajos relacionan directamente estas alergias con *Blastocystis* sp., algunos incluso observando mayores reacciones de hipersensibilidad alimentaria en pacientes parasitados con respecto a los no parasitados (Tuzer et al., 2022). Menos estudiado se encuentra la diferenciación entre subtipos y la presentación de estas enfermedades alérgicas. En nuestra población hallamos una elevada frecuencia de pacientes con ST6 y alérgicos (68,7%, 11/16); de estos pacientes un 36,4% (4/11) presentaban clínica dermatológica y un 18,2% (2/11) remitía la muestra de heces por prurito generalizado. Debido a estos datos, puede ser objeto de estudio la causalidad de

*Blastocystis* sp. y sus variantes génicas en las patologías alérgicas, su efecto inmunorregulador y la desaparición de esta sintomatología tras el tratamiento frente a este protista.

Continuando en esta línea de respuesta inmunológica frente a *Blastocystis* sp., tras revisar el recuento de eosinófilos, disponible en el 65,8% (n=100) de los pacientes, se observó eosinofilia en un 29,0% (n=29) de los casos, de los cuales un 65,5% (n=19) únicamente presentaban *Blastocystis* sp. La eosinofilia es un signo hematológico comúnmente asociado a infecciones por helmintos, pero, aunque las infecciones protozoarias no se consideran causa de su aparición, existen autores que demuestran su elevación en pacientes parasitados por *Giardia intestinalis* (Aguiar et al., 2011), *Dientamoeba fragilis* (Gray et al., 2013; Garg et al., 2024) y *Blastocystis* sp. (Angelici et al., 2018; Matovelle et al., 2022; Tuzer et al., 2022), considerándolo un signo a tener en cuenta para la sospecha de estas infecciones parasitarias. En el estudio de la influencia de los subtipos en la aparición de eosinofilia, no se observó una proporción estadísticamente superior de ninguno de ellos en estos pacientes.

La causa para el desarrollo de síntomas producidos por *Blastocystis* sp. es multifactorial, no dependiendo únicamente de factores del propio protista, sino también del hospedador (Del Coco et al., 2017). La inmunosupresión ha sido propuesta en diferentes ocasiones como posible factor de riesgo para el desarrollo de sintomatología tras la adquisición de *Blastocystis* sp. Las tasas de prevalencia en pacientes inmunodeprimidos son variables, aunque se consideran superiores a las de la población general (Khorshidvand et al., 2021). En algunas ocasiones se ha observado una mayor incidencia de clínica gastrointestinal en pacientes con algún tipo de inmunosupresión, predominantemente diarrea (Marcus & Gotuzzo, 2013; Roberts et al., 2014; Öncü Öner et al., 2022). Pero, al igual que muchos de los parámetros de *Blastocystis* sp., esta propuesta también ha sido cuestionada y, a pesar de su aparición frecuente en personas inmunodeprimidas, su patogenicidad en estos pacientes también es controvertida (Kaya et al., 2021), encontrando estudios donde no se observa una mayor incidencia de síntomas en esta población (Roberts et al., 2014; El Safadi et al., 2016) o, incluso, muestran menos sintomatología que la población general (Di Cristanziano et al., 2019). Este hecho se repite en nuestros datos, con una proporción más alta de personas inmunodeprimidas que no presentaron síntomas en comparación con los individuos inmunocompetentes (50,0% [8/16] frente a 21,3% [29/136], respectivamente). Es importante reseñar que, en nuestro estudio, estas diferencias podrían estar sesgadas debido al control en pacientes inmunodeprimidos que se lleva a cabo en el H.U.P. La Fe, donde se examinan de forma rutinaria heces por microscopía tanto en sujetos sintomáticos, como asintomáticos, para vigilar el estado del paciente cuando son sometidos a procedimientos

inmunosupresores severos, al considerarse vulnerables para desarrollar patologías infecciosas más graves que la población general. Debido a esto, gran parte de nuestra población inmunodeprimida es asintomática (de los 16 pacientes inmunodeprimidos el 50,0% (n=8) no presentaba síntomas, siendo un 43,7% (n=7) trasplantados pulmonares). Aun así, el hecho de que exista una proporción de *Blastocystis* sp. tan alta en individuos inmunodeprimidos y asintomáticos (50,0%), refuerza las hipótesis de que este protista pueda permanecer como comensal, incluso en población con un sistema inmunológico debilitado.

Por otro lado, muy pocos trabajos estudian la relación de los subtipos con el perfil inmunitario de los pacientes. En nuestros datos se observó un elevado número de pacientes con ST6 e inmunodeprimidos (31,3%, 5/16). Revisando la literatura, tres estudios llevados a cabo en Turquía y Francia, ponen de manifiesto la presencia de ST6 en pacientes inmunodeprimidos (Poirier et al., 2011; Cakir et al., 2019; Gulhan et al., 2020). En estos trabajos se expone la baja prevalencia de este subtipo en la población general de ambos países, llamando la atención su presencia en los pacientes con algún tipo de inmunosupresión. La elevada proporción de ST6 en poblaciones vulnerables, como ancianos e inmunodeprimidos, podría deberse a una baja patogenicidad de este subtipo, donde un sistema inmunitario debilitado provoque su persistencia intestinal mientras que en personas sanas pueda ser eliminado más fácilmente.

Por último, la relación de *Blastocystis* sp. con diferentes trastornos gastrointestinales crónicos también ha sido foco de estudio en diversas ocasiones y, de nuevo, los resultados obtenidos han sido mixtos. Encontramos estudios que informan de una mayor prevalencia de este protista en pacientes con Síndrome del Intestino Irritable o en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Alfellani et al., 2013c; Jadallah et al., 2017) y otros que reportan todo lo contrario (Petersen et al., 2013; Krogsgaard et al., 2015). En nuestra población, un 17,1% (26/152) de los pacientes padecían algún trastorno gastrointestinal además de la presencia de *Blastocystis* sp. En estos pacientes, varios síntomas se vieron potenciados con respecto a los que no presentaban enfermedades digestivas crónicas; encontramos una alta frecuencia de meteorismo/flatulencias en pacientes con *Blastocystis* sp. y diverticulosis (66,7%, 4/6), y los pacientes con Síndrome del Intestino Irritable presentaron diarrea crónica con mayor frecuencia que aquellos que solo estaban infectados por *Blastocystis* sp. (80,0% [4/5] frente a 18,2% [23/126], respectivamente). Existen estudios que consideran a *Blastocystis* sp. como un agravante que contribuye a la persistencia de la clínica y la exacerbación de los síntomas en las TGC (Yamamoto-Furusho & Torijano-Carrera, 2010; Nourrisson et al., 2014; Jadallah et al., 2017), y otros que exponen que la mayor prevalencia encontrada en este tipo de pacientes deriva de un

análisis más exhaustivo por sus patologías de base, sin que exista una verdadera relación del desarrollo de la enfermedad con la presencia del protista (Stensvold & Clark, 2016a), por lo que no es posible establecer la relación de *Blastocystis* sp. con estas patologías, sin saber si actúa como desencadenante o son estas enfermedades un requisito previo para la colonización.

En cuanto al estudio de los subtipos con estos trastornos gastrointestinales, no se observó asociación entre ninguna de estas patologías y la presencia de ningún subtipo, resultado que coincide con la heterogeneidad de asociaciones entre subtipos y afectaciones que encontramos en la literatura, sin un resultado uniforme (Alfellani et al., 2013c; Clark et al., 2013; Cifre, 2021).

Una de las variables que no han sido estudiadas en este trabajo son las infecciones por otros patógenos gastrointestinales no parasitarios, como virus y bacterias, que puedan ser el desencadenante de la sintomatología observada en algunos de los pacientes. En la práctica habitual de un laboratorio clínico, la realización de estudio coproparasitológico, detección de virus o cultivo bacteriológico, se basa en criterios clínicos y factores de riesgo que indiquen de forma individual en cada paciente la realización de una prueba u otra. Esto provoca una baja uniformidad de estas pruebas en todos los pacientes o ante un único síntoma concreto, lo que dificulta su inclusión como variables a tener en cuenta en un estudio estadístico. Por este motivo, y dado que el presente es un estudio observacional basado en la práctica asistencial, estas variables no se han evaluado. Los criterios clínicos para realizar estudio parasitológico en heces son la presencia de síntomas gastrointestinales persistentes o que no remiten con tratamiento empírico inicial, el hallazgo de eosinofilia en estudios hematológicos, pacientes sintomáticos que pertenecen a grupos vulnerables (personas inmunodeprimidas, niños/as, ancianos/as) o con factores de riesgo para la adquisición de parasitosis (como el consumo de agua no embotellada y viajes a zonas endémicas) y la sospecha de brotes o relevancia para salud pública (Shane et al., 2017; Álvarez-Martínez et al., 2020; Aparicio & Díaz-Cirujano, 2021).

Como análisis final, las escasas asociaciones estadísticas establecidas entre subtipos y clínica concuerdan con que la diversidad genética como factor independiente no es la responsable de la patogenicidad de *Blastocystis* sp., donde el desarrollo de sintomatología parece derivar de una relación más compleja entre el protista y el hospedador. Por otro lado, es importante remarcar las relaciones establecidas del subtipo ST6 con pacientes alérgicos e inmunodeprimidos. Estos datos son especialmente relevantes, dado que existen escasos reportes de ST6 en humanos en nuestro medio y, por tanto, insuficientes resultados concluyentes.

### 5.3.3. *Giardia intestinalis*

#### 5.3.3.1. Identificación y caracterización molecular: variabilidad genética

Se observó una buena correlación entre los resultados de microscopía óptica y la identificación por qPCR (95,3%, 164 detectados por qPCR de los 172 por microscopía), con valores de ciclos umbral de amplificación (Ct) que oscilaron entre 16,0 y 36,1, con una media de 27,8. Sin embargo, en los consecutivos procesos de caracterización molecular mediante PCR convencional, la tasa de éxito disminuyó enormemente. En total, se consiguió la correcta caracterización de un 30,5% (50/164) de las muestras positivas por qPCR, específicamente un 25,0% (41/164) mediante PCR convencional frente a *gdh* y un 14,0% (23/164) frente a *bg*.

La carga parasitaria y, como consecuencia, los valores de Ct en la qPCR frente a *ssu* ADNr de *G. intestinalis*, son clave en el rendimiento de las PCR convencionales frente a *gdh* y *bg*. Valores de Ct por encima de 30 son limitantes en este proceso, existiendo autores que establecen este valor de 30 como punto de corte, por encima del cual no sería recomendable realizar pruebas de PCR convencional por su baja relación coste/eficacia, al tratarse de PCR cuyos marcadores dianas (como *gdh* o *bg*) son genes de copia única con sensibilidad limitada (De Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Dacal et al., 2020; Muadica et al., 2020). Este hecho se confirma en nuestros datos, donde con el análisis de la curva ROC se determinó que el Ct con valor de 29,8 presentaba un 96,0% de especificidad (AUC: 0,859), detectándose un 28,7% (47/164) de muestras positivas por qPCR con Ct mayor de 29,8 y de éstas, únicamente un 4,2% (2/47) proporcionaron resultados óptimos de secuenciación y posterior clasificación en genotipos/subgenotipos, lo que confirma que este punto de corte cercano a 30 es determinante en la decisión de realizar o no el consecuente proceso de caracterización molecular.

Sin embargo, cabe reseñar que un 59,0% (n=69) de las 117 muestras que presentaron un Ct menor de 29,8 no arrojaron resultados de caracterización, ya sea por resultar negativas en las pruebas de PCR convencional frente a *gdh* y *bg*, o por considerarse como no tipables al presentar baja calidad de los cromatogramas obtenidos a partir los productos amplificados. Otros grupos de investigación mostraron también estas bajas tasas de éxito (Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Muadica et al., 2020; Cifre, 2021); sin embargo, empleando los mismos protocolos de extracción, purificación y amplificación de ADN, esta ratio fue superior en otros estudios (De Lucio et al., 2015; De Lucio et al., 2016), por lo que no podemos dar una explicación concisa de por qué se obtienen estas discrepancias.

En cuanto a los resultados de caracterización, el genotipo predominantemente encontrado fue el B, con una prevalencia de 76,0% (38/50), mientras que el 24,0% (12/50) de muestras restantes se clasificaron con el genotipo A. Estos dos genotipos son los principalmente observados en las infecciones en humanos en España (Carmena et al., 2012); además, nuestros resultados concuerdan con la prevalencia observada a nivel mundial, donde el genotipo B se impone frente al A (Ryan & Cacciò, 2013; Zajackowski et al., 2021). Dentro de estos dos genotipos, el predominio de los subgenotipos BIII, BIV, AI y AII varía según el continente a estudio, siendo en Europa la proporción de BIII y BIV similar y AII superior a AI (Sprong et al., 2009). En nuestros datos, el subgenotipo mayoritario fue BIV con un 44,0% (22/50), seguido de un 20,0% (10/50) de AII, un 10,0% (5/50) de BIII, un 6,0% (3/50) de coinfecciones o subgenotipo ambiguo BIII/BIV, un 2,0% (1/50) de AI y un subgenotipo discordante AII/AIII (2,0%). Además, en un 16,0% (8/50) de las muestras, solo se identificó el genotipo B sin conseguir determinar el subgenotipo.

En España, en diferentes estudios realizados en varias provincias, tanto en población sintomática como asintomática y de diferentes edades, se observó el genotipo B como mayoritario (Sahagún et al., 2008; Goñi et al., 2010; Mateo et al., 2014; De Lucio et al., 2015; Gabín-García et al., 2017; Wang et al., 2019; Muadica et al., 2020,). La identificación del subgenotipo solo se llevó a cabo en 3 de estos trabajos, detectando, al igual que en nuestro estudio, el subgenotipo BIV como predominante (Mateo et al., 2014; De Lucio et al., 2015; Muadica et al., 2020). Sin embargo, en otros estudios realizados en pacientes sintomáticos, personas con TGC y niños/as de guarderías, de La Rioja, Valencia y Madrid, respectivamente, se identificó el genotipo A y subgenotipo AII como el más frecuentemente aislado (Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Cifre, 2021; Hernández-Castro et al., 2023b). El hecho de que, en algunas localizaciones se observe diferente diversidad genética de *Giardia intestinalis*, incluso estudiando poblaciones similares como niños/as asintomáticos de guarderías de una misma ciudad (Muadica et al., 2020; Hernández-Castro et al., 2023b), podría indicar la existencia de variabilidad temporal del parásito. Factores como cambios en las condiciones ambientales o fluctuaciones en la incidencia pueden influir en qué subgenotipo predomina en un momento dado. Por otro lado, que se observen diferencias entre distintas poblaciones podría deberse a características sociodemográficas y hábitos personales distintos con fuentes de infección diferentes en cada región.

En cuanto a los restantes subgenotipos menos prevalentes, en España encontramos resultados similares al del presente estudio, con tasas que oscilan entre 1,9% y 19,0% para BIII (De Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Cifre, 2021) y entre 0,8% y 9,6% para AI (De Lucio et al.,

2015; Cifre, 2021). Ambos subgenotipos tienen carácter zoonótico (Sprong et al., 2009; Feng & Xiao, 2011; Ryan & Cacciò, 2013); sin embargo, BIII se detecta con mayor frecuencia en humanos, mientras que AI se aísla predominantemente en el ganado y las mascotas (Sprong et al., 2009). En España, el subgenotipo AI se ha encontrado en ganado de diferentes localizaciones y en primates de zoos de Valencia y Madrid (Martínez-Díaz et al., 2011; Carmena et al., 2012).

Respecto al subgenotipo ambiguo AII/AIII, fue asignado como AII a partir del estudio del gen *gdh* y como AIII mediante el estudio del gen *bg*. La discrepancia entre ambas dianas nos demuestra lo crucial de realizar estudios MLST para detectar la variabilidad genética entre *locus* dentro de *G. intestinalis*, evitando la tipificación errónea por el empleo de un único gen a estudio.

En el caso de las coinfecciones o subgenotipo ambiguo BIII/BIV, se identificaron por la presencia de 3 o más dobles picos en los cromatogramas del gen *gdh* que se correspondían con ambos subgenotipos. Este resultado puede deberse a una infección mixta o corresponder a una heterocigosidad alélica del parásito con distintas variantes del mismo gen en el mismo organismo (Aguar et al., 2016).

Por último, cabe destacar que la ausencia de genotipos mejor adaptados a otros animales que al ser humano, como C, D, E o F, puede significar que la transmisión en nuestro entorno sea principalmente de origen antroponótico, ya sea por vía indirecta (a partir de agua o alimentos contaminados) o directa (contacto persona-persona).

#### **5.3.3.1.1. Glutamato deshidrogenasa**

En el estudio de las mutaciones del *locus gdh*, se destaca un elevado grado de polimorfismo, especialmente en los subgenotipos BIII y BIV. Mientras que el aislado de AI coincidió perfectamente con la secuencia de referencia y las secuencias de AII presentaron ninguna o una única mutación por secuencia, los subgenotipos BIII y BIV acumularon hasta un máximo de 5 y 9 SNPs, respectivamente, sin coincidir BIII en ningún caso con la secuencia de referencia.

Esta diversidad génica encontrada dentro del genotipo B y, en el otro extremo, su ausencia en el genotipo A, está ampliamente descrita en la literatura (Lebbad et al., 2010; Feng & Xiao, 2011; De Lucio et al., 2015; Aguar et al., 2016; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Gabín-García et al., 2017; Wang et al., 2019; Ryan et al., 2021) y se repite, además de en el gen *gdh*, en los genes *bg* y *tpi*, que son empleados universalmente en la caracterización molecular de *Giardia intestinalis*. Debido a estas variaciones genéticas, existen incluso grupos de investigación que plantean la

diferenciación de la giardiasis humana en dos especies diferentes según ambos genotipos (Jerlström-Hultqvist et al., 2010b; Xu et al., 2012; Seabolt et al., 2022; Wielinga et al., 2023).

En la evaluación de las mutaciones específicas del genotipo B, en BIII encontramos la posición C309 mutada en el 100,0% de las muestras (n=5), como transición (C → T) o como doble pico (Y: C/T), con, además, una transición en las posiciones C87 y T147 en dos de ellas (40%) (ref: AF069059). En otros estudios españoles donde se aisló BIII también se encontró en todas las secuencias analizadas la presencia de estas mismas mutaciones en la posición C309 (De Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Cifre, 2021). Otras posiciones donde se repetían las mutaciones con transiciones o dobles picos, aunque en menor medida, fueron C99, T147, G150 y T237 (De Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Cifre, 2021). Más interesante es que en otros países de Asia y África, las mutaciones descritas son muy similares, con acúmulo en posiciones recurrentes como C99, T147, G150 y C309 (Dacal et al., 2018; Messa et al., 2021; Sarzhanov et al., 2021).

En el caso de BIV, los sitios donde los SNP tendían a acumularse en nuestras secuencias fueron T183, T387, C396 y C423 (ref: L40508), encontrándose modificadas con transiciones o picos dobles en un 54,5% (12/22) de las muestras. En la búsqueda en la literatura de España, en todos los artículos de caracterización molecular de *G. intestinalis* en humanos donde se aisló BIV, se repetían estas mismas mutaciones en la mayoría de las muestras (Mateo et al., 2014; De Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Muadica et al., 2020; Cifre, 2021), y, de nuevo, en países tan alejados como Mozambique, Angola y Turquía, las modificaciones en T183, T387 y C423 también fueron los SNPs aislados con mayor frecuencia (Dacal et al., 2018; Messa et al., 2021; Sarzhanov et al., 2021).

Por último, el subgenotipo o coinfección BIII/BIV se identificó por la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido (transiciones y dobles picos) en las posiciones T135, C255, C273, T366, T387 y A438 de las 3 secuencias (100,0%), a lo que hay que añadir la mutación C423Y que se observó en un 66,7% (2/3) de los casos (ref: L40508). Estas mismas mutaciones se han detectado en diferentes países del mundo en menor o mayor medida (Dacal et al., 2018; Muadica et al., 2020; Rafiei et al., 2020; Messa et al., 2021; Sarzhanov et al., 2021).

La presencia de los mismos puntos críticos para sufrir mutaciones en diferentes regiones geográficas podría ser el resultado de una combinación de factores tanto evolutivos, como ecológicos y epidemiológicos que favorecen su aparición y transmisión. Podría tratarse de una evolución convergente donde el parásito de diferentes regiones del mundo termina

desarrollando las mismas mutaciones debido a su respuesta a factores ambientales compartidos, como el tipo de hospedadores o tratamientos antiparasitarios comunes, de tal forma que sería interesante analizar si estas mutaciones favorecen la adaptación de *G. intestinalis* proporcionándole una ventaja selectiva, haciéndola más eficaz para infectar a los humanos, sobrevivir en el ambiente intestinal o incluso, aumentar la resistencia a las terapias antiprotozoarias, haciendo que estos aislados predominen sobre el resto y se difundan de forma más ágil en la población. Es importante reseñar que, para lograr confirmar estas hipótesis, sería necesario el estudio de una parte más amplia del genoma de *G. intestinalis*.

El mecanismo por el que se desarrollan estos acúmulos de mutaciones todavía no ha sido completamente esclarecido. Diferentes trabajos apoyan la capacidad del parásito de realizar intercambios de material genético entre secuencias de ADN homólogas por recombinación génica inter- o intragenotipos (Cooper et al., 2007; Kosuwin et al., 2010; Andersson, 2012; Xu et al., 2012; Aguiar et al., 2016; Ankarklev et al., 2018). Sin embargo, encontramos detractores de estas teorías, achacando la divergencia genética como consecuencia de la producción de errores por la ADN polimerasa durante la replicación que son toleradas por el sistema de reparación génica de *Giardia* (Lecová et al., 2019). Por el momento, se puede afirmar que *Giardia* sufre con frecuencia algún tipo de estrategia para aumentar su diversidad genética, pero queda por completar el proceso exacto de cómo lo logra y si estos cambios genéticos presentan algún efecto fenotípico.

#### **5.3.3.1.1.1. Análisis filogenético**

Mientras que con el genotipo A existe consenso sobre el empleo de fragmentos cortos de ADN para llevar a cabo su caracterización molecular, obtener el subgenotipado preciso del genotipo B por estos métodos está siendo puesto en entredicho, debido a que la diferenciación entre subgenotipos se basa únicamente en unos pocos polimorfismos, pero encontramos una alta hipervariabilidad en estas secuencias (Feng & Xiao, 2011; Brynildsrud et al., 2018; Lecová et al., 2019; Ryan et al., 2021). Además, algunos autores no han encontrado apoyo filogenético para BIII y BIV, viéndose incapaces de generar agrupamientos genéticos confiables (Brynildsrud et al., 2018; Ryan et al., 2021).

En nuestro estudio evolutivo de las secuencias de *gdh*, conseguimos una buena división de los subgenotipos, separando AII de AI y BIII de BIV, con valores de *Bootstrap* de 95 y 100%, respectivamente. A pesar de que para el genotipo B no se consiguieron dos grupos independientes con valores aceptables de *Bootstrap* (por encima del 80%), sí que se observó la

agrupación de todos los subgenotipos tipificados como BIV quedando separados de los subgenotipos BIII y BIII/BIV que permanecieron como ramas independientes externas a este grupo.

#### **5.3.3.1.1.2. Cambios aminoacídicos**

Cuando se producen sustituciones de un solo nucleótido en el ADN codificante (SNPs), las consecuencias en la proteína resultante pueden variar debido a varios factores. En algunos casos, estas sustituciones producen mutaciones sinónimas, ya que, debido a la redundancia del código genético, algunas modificaciones en el ADN pueden resultar en la traducción de un mismo aminoácido. Por otro lado, encontramos mutaciones no sinónimas, que son aquellas que sí determinan cambios de aminoácidos. Estas mutaciones no sinónimas pueden tener mayor o menor impacto en la proteína según si afectan a regiones cruciales para la determinación de la estructura tridimensional o de la función proteica y según el cambio de aminoácido producido. Los aminoácidos presentan cadenas laterales en su estructura que les confiere características propias, con tamaños distintos y haciéndolos hidrófobos o hidrófilos y ácidos o básicos, siendo más o menos reactivos, por lo que en cada proteína existen posiciones críticas que necesitan de un tipo de aminoácido específico para poder desempeñar su función; es por ello, que estas mutaciones no sinónimas pueden degenerar en una proteína defectuosa e ineficaz. Por último, también existen mutaciones sin sentido, que son aquellas que provocan la aparición de un codón STOP prematuro, lo que desencadena la finalización de la traducción y, por tanto, la pérdida en la proteína de los aminoácidos posteriores a este punto.

Dentro del genotipo B, un 73,3% (22/30) de las secuencias se encontraron mutadas, acumulando hasta 12 SNPs por secuencia, pero solo un 12,5% (4/32) de los diferentes SNPs se consideraron mutaciones no sinónimas. Ninguna de las posiciones críticas para el desarrollo de mutaciones descritas en apartados anteriores, es decir, aquellas en las que se repetían los mismos SNPs tanto en nuestras secuencias como en otros estudios a nivel mundial, causó cambios aminoacídicos (Mateo et al., 2014; De Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Dacal et al., 2018; Muadica et al., 2020; Rafiei et al., 2020; Cifre, 2021; Messa et al., 2021; Sarzhanov et al., 2021). El carácter silente de estas mutaciones sugiere que podrían ser el resultado del azar, probablemente debido a la tolerancia del sistema de reparación del ADN del parásito (Lecová et al., 2019). Sin embargo, su repetición en diversas poblaciones y en distintas localizaciones geográficas plantea una contradicción, ya que también podría indicar que estas mutaciones están siendo conservadas por algún proceso de selección natural, lo que nos lleva a la hipótesis de que, de alguna manera, podrían conferir una ventaja selectiva parasitaria (Aguar et al., 2016).

Si estas mutaciones fueran simplemente aleatorias y no tuvieran una función biológica clara, deberían de ser eliminadas con el tiempo y no transmitirse y mantenerse de manera consistente en diferentes poblaciones, como se observa en este caso.

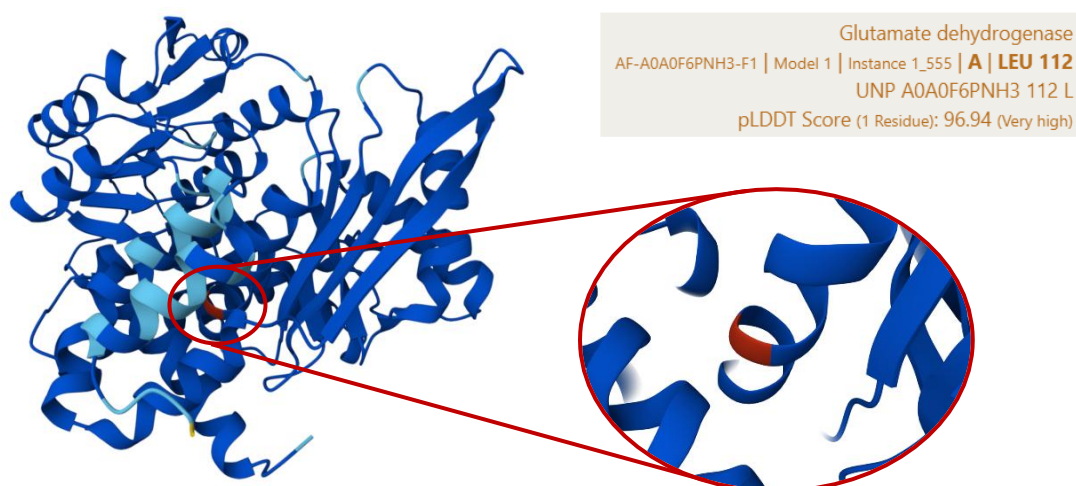
De forma totalmente opuesta, en el genotipo A subgenotipo All, a pesar de que el índice mutagénico es menor (50,0%, 5/10; con solo una mutación por aislado), las 5 mutaciones observadas fueron no sinónimas, implicando cambios de aminoácidos. Esto vuelve a mostrar las diferencias patentes entre ambos genotipos, pudiendo incluso presentar estrategias de reparación de ADN diferentes (Lecová et al., 2019).

Es importante reseñar, que algunas de estas mutaciones pueden ser derivadas de fallos producidos por la enzima ADN polimerasa en el proceso de amplificación de la PCR, por lo que, para confirmarlas sería de especial relevancia repetir este proceso de PCR y secuenciación y observar si se repiten los mismos patrones mutacionales.

La enzima GDH está formada por su centro activo que, en la proteína de referencia XP\_001707257, engloba los aminoácidos desde la posición 119 a la 132; y, además, encontramos dos dominios implicados en la actividad enzimática: la región de dimerización, formada por 97 aminoácidos de esta proteína de referencia (desde el residuo 54 al 181) y el dominio de unión al cofactor NAD(P)<sup>+</sup>, con 256 aminoácidos, desde el 192 al 448.

Ninguna de las mutaciones no sinónimas observadas en nuestros aislados, incluyendo ambos genotipos, afectaron al centro activo de la enzima, acumulándose la mayoría en la región de dimerización (88,9%, 8/9). La modificación en la secuencia de este dominio podría degenerar en la interrupción de la oligomerización, la alteración de su estabilidad o el cambio de la afinidad de interacción, pudiendo generar una oligomerización aberrante con inactivación o actividades anómalas de la proteína.

Específicamente, dentro de las mutaciones en los aislados All, encontramos mutaciones potencialmente disruptivas, como L112P (Ref: XP\_001707257), donde la introducción de una prolina, con una estructura cíclica rígida y al carecer de hidrógeno disponible en su grupo N-H, puede romper  $\alpha$ -hélices y desestabilizar completamente el dominio (Barlow & Thornton, 1988). Es de especial interés, ya que este residuo 112 se localiza en una  $\alpha$ -hélice de GDH, como se muestra en la Figura 44.



**Figura 44.** Localización del residuo aminoacídico 112 (marcada en rojo) en la estructura de la proteína de referencia AF-A0A0F6PNH3-F1 predicha por *AlphaFold* (<https://AlphaFold.com/>).

Por otro lado, la mutación L216Q (Ref: XP\_001707257), única que afecta a la región de unión al cofactor NAD(P)<sup>+</sup>, implica el cambio de una leucina con carácter hidrofóbico por una glutamina polar, lo que podría afectar a la afinidad o correcta orientación del cofactor, impidiendo interacciones y afectando así a la actividad catalítica enzimática. Sería interesante realizar estudios de biología estructural y enzimología para determinar si las mutaciones encontradas en este estudio tienen o no efecto en la proteína resultante.

En el caso del genotipo B, subgenotipo BIV, de especial interés es la mutación sin sentido Q179\* (codón STOP prematuro) (Ref: XP\_001707257), que produce la eliminación total del dominio de unión al cofactor NAD(P)<sup>+</sup> y, como consecuencia, probablemente desencadena la pérdida de actividad catalítica enzimática. Esto produciría un aumento en el estrés metabólico del parásito, resultante de la ausencia de asimilación de los hidratos de carbono, aminoácidos y amoníaco, donde la supervivencia parasitaria dependería de la existencia de otros mecanismos compensatorios efectivos. Es posible que exista una población parasitaria mixta con células de *Giardia intestinalis* que no presenten esta mutación, ya que la inactividad de esta enzima puede afectar gravemente a la viabilidad del parásito. Sin embargo, el cromatograma obtenido en nuestros datos presenta una calidad óptima con concordancia entre ambas secuencias de cada cebador y no muestra la presencia de doubles picos que puedan orientar a una posible diversidad parasitaria.

### 5.3.3.1.2. *β-giardina*

En el análisis del *locus bg*, como ocurría con *gdh*, también se observó una elevada heterogeneidad en el genotipo B. En estos aislados tipificados como B, la mutación C309T fue detectada en un 89,5% (17/19) de los casos, las mutaciones C165T, C324T, C393T y T471C en un 78,9% (15/19) y la posición G159 se modificó en 63,2% (12/19) secuencias (como transición G→A o como doble pico A/G) (ref: AY072727). De nuevo, de forma equivalente a lo que observamos en el estudio de *gdh*, estas mismas mutaciones en B se repetían en diferentes aislados de *Giardia intestinalis* de distintas ciudades de España, donde el patrón 159 (G → A), 165 (C → T), 309 (C → T), 324 (C → T), 393 (C → T) y 471 (T → C) aparecía en una gran proporción de aislados, y la posición C309 se vio mutada en prácticamente todas las secuencias estudiadas de los diferentes artículos publicados hasta la fecha (Mateo et al., 2014; De Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Muadica et al., 2020). En otros países de Asia y África las mutaciones principalmente compartidas afectaban a las posiciones C165 y C309 (Dacal et al., 2018; Rafiei et al., 2020; Messa et al., 2021; Sarzhanov et al., 2021)

Por último, cabe destacar que el subgenotipo All, aunque presentó una mayor estabilidad genética que el genotipo B, un aislado mostró la mutación que teóricamente podría tener consecuencias mayores en la estructura final de la proteína BG. Este polimorfismo se corresponde con la delección de adenina en la posición 568 (Ref: AY072723). Las modificaciones exactas que implica en la secuencia proteica se analizan en detalle en el apartado *Cambios aminoacídicos* del presente informe.

#### 5.3.3.1.2.1. *Análisis filogenético*

Debido a la alta heterogeneidad observada en las secuencias de *bg*, la subgenotipificación basada en el análisis parcial de este gen resulta inviable. Aun así, en nuestro análisis evolutivo se consiguió agrupar un 75,0% (12/16) de las secuencias del genotipo B (identificativos de Tabla 36: B6-8 y B11-19), compartiendo todas ellas las mutaciones más prevalentes (C165T, C309T, C324T, C393T, T471C) (ref: AY072727) y quedando separadas del resto de secuencias del mismo genotipo (identificativos en la Tabla 36: B4, B5, B9 y B10) con una buena significancia estadística (99%), pero sin lograr una correcta agrupación que permita identificar subgenotipos.

Ante esta problemática, con estudios que informan una alta diversidad de secuencias del genotipo B, pero una baja resolución filogenética, en los últimos años se ha propuesto el estudio de otros genes distintivos más estables y conservados que los marcadores hipervariables actuales (*gdh*, *bg* y *tpi*), que parecen ser útiles en esta caracterización molecular. Entre ellos

encontramos una secuencia parcial del gen codificante para la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa (*6-pgdh*) y parte del gen que codifica para la subunidad catalítica de la enzima fosforilasa quinasa B (*phk*) (Seabolt et al., 2021).

#### 5.3.3.1.2.2. Cambios aminoacídicos

La  $\beta$ -giardina (BG) forma parte del citoesqueleto de *Giardia intestinalis*. Este citoesqueleto es esencial para la división celular, la motilidad, el transporte intracelular y el proceso de enquistamiento/desenquistamiento (Elmendorf et al., 2003), además, forma parte del disco ventral del trofozoíto del parásito, orgánulo clave en la patogénesis de *Giardia* ya que es el responsable de su adhesión al epitelio del hospedador (Macarisin et al., 2012).

La conformación de BG se basa en dos dominios, uno con estructura no helicoidal (HEAD, amino-terminal) que engloba  $\approx$  30 aminoácidos iniciales de su secuencia (27 para la secuencia de referencia XP\_001705425) y el segundo con estructura  $\alpha$ -helicoidal con formación de hélices superenrolladas (ROD, carboxi-terminal) que está constituido por el resto de los aminoácidos de la proteína (245 aminoácidos en la secuencia de referencia XP\_001705425).

Debido a la diana marcada por nuestra PCR convencional, el único dominio a estudio en el presente proyecto es el dominio ROD. La estructura tridimensional final con la formación de hélices superenrolladas depende de la interacción entre aminoácidos apolares y aminoácidos cargados del dominio ROD (Holberton et al., 1988), por lo que la sustitución de unos por otros en la secuencia debido a SNPs podría desencadenar la pérdida de la conformación final esperada.

Algunos autores han demostrado que la existencia de prolinas y repeticiones combinatorias de serina–prolina–arginina (SPR) en el dominio ROD provocan un cambio en el plegamiento final proteico, alterando la estructura tridimensional enrollada. La presencia de estos aminoácidos conforma una región C-terminal altamente cargada (principalmente debido a la existencia de argininas) que típicamente genera una región intrínsecamente desordenada, sin una estructura tridimensional estable, ni conformación fija, pudiendo verse modificada según el entorno y su interacción con otras moléculas (Jiménez-Cardoso et al., 2009). Además, estas modificaciones a nivel genético se encontraron en cepas resistentes al tratamiento con albendazol, fármaco antiparasitario cuyo mecanismo de acción es provocar la disrupción de la organización del disco ventral de *Giardia* (Matadamas-Martínez et al., 2020). Estos resultados podrían indicar que alteraciones en genes estructurales del citoesqueleto del parásito, como *bg*, pueden ser responsables del desarrollo de resistencias frente a antiprotozoarios.

Algunas de las mutaciones con potencial carácter disruptivo, observadas en diferentes aislados caracterizados como genotipo B, son la sustitución de L73P (Ref: XP\_001705425), que implica la aparición de una prolina con capacidad de interrumpir la  $\alpha$ -hélice, pudiendo romper la estructura secundaria, la mutación E105K (Ref: XP\_001705425), que provoca una inversión de carga (de ácido glutámico a una lisina básica), pudiendo afectar a las interacciones electrostáticas, y las mutaciones I63T, I143T y A112T (Ref: XP\_001705425), que introducen polaridad en regiones probablemente hidrofóbicas, pudiendo afectar el empaquetamiento durante la formación de las hélices superenrolladas.

Sin embargo, la mutación con un posible mayor grado de efecto sobre el fenotipo del parásito portador se corresponde con un aislado caracterizado con el subgenotipo All, con la delección de adenina en la posición 568 (ref: AY072723). Esta delección modifica el marco de lectura afectando a los aminoácidos desde el 205 (ref: XP\_001705425) y sus consecutivos. Debido a nuestro margen de estudio que engloba únicamente hasta la posición 575 del gen de referencia de All (AY072723), solo se pudieron corroborar 5 modificaciones aminoacídicas en la proteína AAL67658 (hasta la posición 194), con la aparición de una serina y dos argininas nuevas; sin embargo, si se prolongase esta cadena de sustituciones hasta el final de la secuencia primaria, empleando como molde la proteína de referencia de GDH XP\_001705425, se obtendría la secuencia resultante que se muestra en la Tabla 46.

**Tabla 46.** Comparativa entre la secuencia de referencia de GenBank XP\_001705425 y su alternativa tras la mutación 568delA (ref: AY072723).

**>Proteína nativa:**

MSMFTSTRTLTQTMDKPDLLRSATETAVKLSNMNQRVSRFHDKMENEIEVRRVDDDDTRVKMIKDAIA  
HLDRLIQTESRKRQASFEDIREEVKKSADNMYLTIKKEEIDTMAANFRKSLAEMGDTLNNVETNLQNQIAI  
HNDIAIALRKEALKSLNDLETGIATENAERKKMYDQLNEKVAEGFARISAAIEKETIARERAVSAATTEALT  
NTKLVEKCVNEQLENVASEIRAIQEEIDREKAERKEAEDKIVNTLEDVVSKIQQGLSMVTKH

**>Proteína mutada:**

MSMFTSTRTLTQTMDKPDLLRSATETAVKLSNMNQRVSRFHDKMENEIEVRRVDDDDTRVKMIKDAIA  
HLDRLIQTESRKRQASFEDIREEVKKSADNMYLTIKKEEIDTMAANFRKSLAEMGDTLNNVETNLQNQIAI  
HNDIAIALRKEALKSLNDLETGIATENAERKKMYDQLNEKVAEGFARISAAIEKETIARERAVSAAARQKRS  
QTRSSRSASTSSRTPRRSALSRRRSTARRPSARRQTRSSSTLSRTSSRRSRRA

**Rojo:** Secuencia afectada tras la mutación.

Como queda reflejado en la Tabla 46, esta mutación podría provocar un aumento considerable en la proporción de serinas, prolinas y argininas y sus combinaciones SPR similares a las reproducidas en aislados de *G. intestinalis* resistentes a albendazol (Jiménez-Cardoso et al., 2009). Debido a este resultado, podría ser de gran relevancia clínica la confirmación de estas mutaciones mediante el estudio molecular de la secuencia completa de *bg* de este aislado, además de una evaluación del tratamiento parasitario prescrito y la respuesta terapéutica obtenida en este paciente.

#### **5.3.3.1.3. Comparativa Glutamato deshidrogenasa y $\beta$ -giardina**

En la comparativa entre los resultados obtenidos de la caracterización de *Giardia intestinalis* realizada a partir de *gdh* o *bg*, cabe destacar que las mutaciones C165T, C324T, C393T, T471C (Ref: AY072727) que se repiten en secuencias del *locus bg* genotipo B, se corresponden con aislados que han sido tipificados con el subgenotipo BIV por *gdh*, estando ausentes en BIII y BIII/BIV. Este resultado se refuerza al analizar el estudio evolutivo de *bg*, donde las muestras con estas mutaciones (identificativos B6-8 y B11-19 de *bg*) se agrupan en un mismo clado, quedando separadas del resto. Por tanto, estos hallazgos podrían indicar que la prevalencia de BIV es superior a la documentada, donde las 7 secuencias que comparten estas mutaciones en el *locus bg* genotipo B (B6-B8, B12-B15) y sin resultado por *gdh*, podrían corresponderse con el subgenotipo BIV.

La inexistencia de estas 4 mutaciones en las secuencias de *bg* que han sido identificadas como posibles coinfecciones BIII/BIV por *gdh*, nos vuelve a plantear las dudas analizadas en apartados anteriores, ya que si nos encontrásemos ante una verdadera coinfección de ambos subgenotipos, cabría esperar que se compartiesen estas mutaciones identificadas en el subgenotipo BIV con ausencia de BIII; lo que sugiere que estos aislados BIII/BIV no se corresponden con una coinfección real, sino con un proceso de divergencia genética, ya sea por recombinación o por acúmulo mutagénico por otros motivos, que afecta al *locus gdh* pero no a *bg*.

Aun así, debido al escaso número de muestras y la elevada heterogeneidad de ambos genes, con los datos de este estudio no es posible realizar afirmaciones, siendo insuficientes para determinar polimorfismos de secuencia específicos que identifiquen los subgenotipos BIII y BIV en *bg* o confirmar coinfecciones de varios subgenotipos. Se necesita analizar estos mismos genes junto con otros más conservados para obtener una caracterización más certera y reforzar estas hipótesis planteadas.

### 5.3.3.2. Estudio sociodemográfico según genotipado

#### 5.3.3.2.1. Edad y sexo

Además de las diferencias a nivel génico y filogenético encontradas entre los subgenotipos BIII y BIV, también se observaron diferencias epidemiológicas. Mientras que BIV se asoció a pacientes de corta edad, con una mediana de edad de 4,5 años (RIQ: 5 años) y edad máxima de 40 años, los pacientes parasitados con BIII fueron mayores, presentando una mediana de edad significativamente superior, 39 años (RIQ: 52 años) y abarcando al único anciano de nuestra población (70 años). De forma similar, también se observaron estas diferencias de edad entre BIV y All, siendo superior la edad de los pacientes con All (Mediana: 26 años [RIQ: 39 años]).

Lamentablemente no existe evidencia científica que respalde la diferencia de edades entre subgenotipos de *Giardia intestinalis*, pero sí encontramos artículos que encuentran una mayor prevalencia del genotipo B en niños/as y del A en adultos (Minetti et al., 2015; Asher et al., 2016; El Basha et al., 2016; Wang et al., 2019). Debido a esto, se plantea la hipótesis de que los individuos de mayor edad puedan ser capaces de desarrollar algún tipo de inmunidad frente al genotipo B tras infecciones previas, lo que podría explicar por qué este genotipo es más común en niños/as (Zajackowski et al., 2021). Además, estas diferencias de prevalencia entre genotipos podrían derivar de la existencia de una distinta transmisión del parásito y genotipo entre ambas poblaciones (Wang et al., 2019).

En el caso del género, a pesar de que existe una diferenciación en la prevalencia de *G. intestinalis* entre hombres y mujeres, como se ha documentado y analizado en apartados anteriores, estas discrepancias no se observan en el genotipo ni subgenotipo aislado entre ambos sexos. Aunque algunos autores asocian más el genotipo B a las mujeres adultas por el cuidado de menores (Feng & Xiao, 2011) debido a que los niños/as tienen una mayor prevalencia de B que de A, en nuestra población no se observó esta diferenciación por genotipos y género, ni una mayor proporción del subgenotipo BIV en mujeres entre 25-46 años ( $p=0,513$ ), mayoritario en los niños/as de nuestro estudio; resultado que contrasta con la relación previamente establecida de contacto estrecho con menores y la prevalencia de *Giardia* en mujeres de este rango de edad, lo que debería ir correlacionado con la presencia del mismo subgenotipo entre ambas poblaciones. Estos resultados contradictorios podrían explicarse por la posible inmunidad en adultos frente al subgenotipo BIV, que es el predominante en la población pediátrica, junto con la posible existencia de infecciones de genotipos y subgenotipos mixtos donde se imponen unos sobre otros (Aguiar et al., 2016), pudiendo encontrar diferencias en esta predominancia según la

edad de los pacientes, por procesos todavía no comprendidos, donde los genotipos/subgenotipos minoritarios en estas infecciones genéticamente heterogéneas podrían quedar infradiagnosticados con los métodos de caracterización actuales empleados en nuestra metodología.

#### **5.3.3.2.2. Movimiento migratorio y movilidad internacional**

Se observó que un 80,0% (4/5) de los pacientes con BIII había viajado recientemente fuera de España previa recogida de muestra, siendo África el destino principal (75,0%, 3/4). En el lado opuesto, el 100,0% (n=22) de los pacientes con BIV eran españoles y solo un 4,5% (1/22) había salido del país. Existen evidencias de una diferente distribución de subgenotipos de B entre los distintos continentes y países del mundo; en África, la prevalencia del subgenotipo BIII predomina sobre el subgenotipo BIV, mientras que en América del Norte ocurre lo contrario y en Europa, Latinoamérica y Australia la distribución de ambos subgenotipos está más equilibrada (Sprong et al., 2009; Sarria-Guzmán et al., 2022). Esta elevada prevalencia de BIII en diferentes países de África concuerda con la posible relación geográfica en nuestra población, con un marcado porcentaje de pacientes parasitados con BIII y con viajes a este continente. En otros estudios de caracterización molecular llevados a cabo en España, este subgenotipo no se detecta (Mateo et al., 2014; Muadica et al., 2020; Hernández-Castro et al., 2023b), y en los que está presente, se incluye en la población a estudio individuos extranjeros, aunque no se informa si este subgenotipo se relaciona con la nacionalidad (De Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017). Sería de especial relevancia recabar estos datos en futuros proyectos para corroborar que estamos ante un subgenotipo importado a nuestro país y observar si hay una tendencia al alza en la prevalencia de BIII y otros subgenotipos menos prevalentes a fecha actual, tal y como se evidenció en Noruega, donde se demostró la capacidad de diseminación y permanencia de BIII tras un brote, observando la modificación de la composición genética de *Giardia* en el agua residual de la ciudad de Bergen, que seis meses antes del brote se basaba en el genotipo A, mientras que un año después se diversificó, encontrando tanto el genotipo A como BIII (Robertson et al., 2007).

Al igual que BIV, encontramos una clara superioridad de pacientes españoles con AII (90,0%, 9/10), con escasos reportes de viajes (10,0%, 1/10). Estos datos se comparten con la marcada prevalencia de estos dos subgenotipos en otros estudios españoles (Sahagún et al., 2008; Goñi et al., 2010; Mateo et al., 2014; De Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Wang et al., 2019; Muadica et al., 2020; Cifre, 2021; Hernández-Castro et al., 2023b), siendo los predominantes en nuestro país y estando, a su vez, ampliamente distribuidos a nivel mundial.

En el caso de los subgenotipos con menor prevalencia, el único subgenotipo AI pertenecía a un paciente de Pakistán que envió la muestra después de regresar de su país natal. A nivel global, la prevalencia de AI suele ser menor en humanos que la de AII, estando AI principalmente asociado al ganado y mascotas (Sprong et al., 2009). Sin embargo, en Australia y algunos países de Asia se observa lo opuesto, con un mayor número de infecciones humanas por AI que por AII (Sprong et al., 2009; Al-Mohammed, 2011; Thakur et al., 2021), lo que, en nuestros datos, podría indicar la adquisición de esta infección por *Giardia* AI en el país de origen del paciente.

El subgenotipo AIII se asocia a algunos rumiantes salvajes (Cacciò et al., 2008; Feng & Xiao, 2011), existiendo escasos reportes en humanos en España, Rumanía y Nueva Zelanda (De Lucio et al., 2015; Costache et al., 2020; Garcia-R et al., 2021,). Sin embargo, diferentes subgenotipos ambiguos AII/AIII se han observado en individuos de diversos países alrededor del mundo (De Lucio et al., 2015; Azcona-Gutiérrez et al., 2017; Dacal et al., 2018; Rafiei et al., 2020; Messa et al., 2021; Sarzhanov et al., 2021; Sarria-Guzmán et al., 2022; Hernández-Castro et al., 2023b). En nuestro estudio, la paciente parasitada por AII/AIII se correspondía con una niña española que no tenía registrado ningún viaje reciente al extranjero. La marcada diferencia de hospedadores entre AII, que se aísla predominantemente en humanos, y AIII, que lo hace en animales, con la aparición común en humanos de subgenotipos ambiguos AII/AIII, podría indicar la existencia de interacción entre animales y personas (por ejemplo, en hogares con animales domésticos o en comunidades rurales) infectados por el parásito que genere el contacto con ambos subgenotipos y sus recombinaciones para generar este tipo de híbridos más adaptados a los humanos. Sin embargo, los subgenotipos AII y AIII difieren entre sí en sólo dos nucleótidos en los tramos de secuencia considerados en este estudio, por lo que, de nuevo, esta discrepancia entre los dos marcadores *gdh* y *bg* también podría derivar de la aparición de mutaciones que desencadenarían este subgenotipo AII/AIII sin necesidad de que haya recombinación entre ambos; problemática que podría ser resuelta con la secuenciación completa de los genes.

Por último, el subgenotipo ambiguo o coinfección BIII/BIV se aisló en tres pacientes, quienes podrían haber adquirido el parásito en España, India o Pakistán, dado que realizaron viajes a estos países antes de la remisión de la muestra fecal. Este subgenotipo o coinfección está ampliamente distribuido a nivel mundial, con proporciones similares a las observadas de infecciones únicas de BIV en algunos países, así como varios reportes previos en España (Sprong et al., 2009; De Lucio et al., 2015; Dacal et al., 2018; Seguí et al., 2018; Hernández et al., 2019; Muadica et al., 2020; Messa et al., 2021; Sarzhanov et al., 2021); es por ello que no se puede

asociar a una ubicación geográfica específica, con su aparición y transmisión en nuestro país ya consolidada.

#### **5.3.3.2.3. Distribución geográfica**

Debido a que no se establecieron asociaciones entre ningún subgenotipo ni sus variantes génicas con polimorfismos compartidos y ningún Centro de Salud o zona de Valencia propuesta, se demuestra una circulación generalizada de estas variantes, sin ningún patrón de distribución geográfica o entre centros, lo que posiblemente se relacione con fuentes de contagio y vías de transmisión comunes en todas las zonas de Valencia y la diseminación por igual en toda la ciudad.

Por otro lado, se observó una correlación entre la población extranjera parasitada por *Giardia*, concentrada en el norte de la ciudad, y la presencia restringida a esta zona de AI y BIII, subgenotipos previamente vinculados con la migración. Además, todos los pacientes residentes en el sur que presentaban *Giardia* eran de nacionalidad española y todos estuvieron infectados por BIV, subgenotipo asociado con la población española y considerado uno de los predominantes en nuestro país. Estos resultados se muestran similares a los recabados en el análisis de *Blastocystis* sp., encontrándose las variantes alélicas posiblemente asociadas a pacientes extranjeros, acumuladas en el norte de la ciudad, mientras que las autóctonas se mantienen en el sur.

#### **5.3.3.3. Estudio de la clínica asociada según genotipado**

Al igual que observábamos con *Blastocystis* sp., existe una gran prevalencia de portadores asintomáticos con *Giardia intestinalis*; se estima que entre el 50% y el 75% de las personas infectadas pueden no desarrollar manifestaciones clínicas (Carmena et al., 2012). Entre los pacientes que sí presentan síntomas, los más comunes incluyen diarrea y dolor abdominal (Zajaczkowski et al., 2021), siendo estos mismos los más frecuentemente observados en nuestra población, con un 38,0% (n=19) de diarrea aguda seguida de un 16,0% (n=8) de dolor abdominal.

No establecimos ninguna asociación entre sintomatología y la parasitación por un genotipo/subgenotipo u otro. Aunque la mayoría de la literatura concuerda en que el genotipo B es más virulento y, por lo tanto, es más probable que genere manifestaciones clínicas (Homan & Mank, 2001; Sahagún et al., 2008; Xiao & Feng, 2017; Wang et al., 2019; Zajaczkowski et al., 2021), otros estudios han observado asociaciones entre el genotipo A y síntomas gastrointestinales (Read et al., 2002; Aydin et al., 2004; Zajaczkowski et al., 2021). Estos

resultados discrepantes pueden derivar de diferencias en la metodología utilizada y las distintas poblaciones objeto de estudio; características del hospedador, como la respuesta inmunológica, juegan un papel crucial en el desarrollo de los síntomas, además, otros factores como la carga parasitaria y la presencia de coinfecciones pueden influir en la gravedad de la clínica, haciendo que genotipos o subgenotipos que pueden ser menos virulentos generen manifestaciones más graves. Serían necesarios más estudios que analicen los factores de virulencia en aquellas cepas que inducen una mayor sintomatología, teniendo en cuenta que no existe una asociación exclusiva con la tipificación molecular, sino que esta virulencia deriva de una interacción más compleja, que involucra aspectos multifactoriales relacionados con el hospedador, el propio parásito y el entorno intestinal, incluyendo la microbiota.

A este escenario con tantas variables, hay que sumarle la posibilidad de que las infecciones no se deban únicamente a una población parasitaria clonal, sino a una genéticamente heterogénea, con infecciones mixtas en las que predomina un genotipo/subgenotipo sobre el otro y es el que se detecta con la metodología actual, y otros genotipos o subgenotipos menos abundantes que pasan desapercibidos (Aguilar et al., 2016).

Entre todos estos factores, el estado inmunitario se ha establecido como clave para el desarrollo de sintomatología en las infecciones por *G. intestinalis*, existiendo diversa literatura que expone una mayor prevalencia y gravedad de síntomas en pacientes inmunodeprimidos (Mahdavi et al., 2021; Dunn & Juergens, 2024). En nuestra población se observó una proporción ligeramente superior de pacientes inmunodeprimidos y sintomáticos que de población general (80,0% frente a 68,9%), sin establecer diferencias estadísticas entre la tipificación genética y la presencia de esta inmunosupresión. A diferencia de lo que ocurría con *Blastocystis* sp., el cual se observó en un considerable número de pacientes inmunodeprimidos y asintomáticos debido a la realización de controles rutinarios en esta población, para *G. intestinalis* no encontramos esta asociación, lo que apoyaría su mayor potencial patogénico.

En cuanto a la influencia de la edad en el desarrollo de sintomatología, observamos en nuestra población que una mayor proporción de niños/as fueron asintomáticos, con respecto a los adultos (41,2% frente a 6,7%). Este resultado se correlaciona con la detección de una carga parasitaria ligeramente inferior detectada en los menores, con una media superior de Ct (ciclo umbral) obtenida en la qPCR (24,7 para los niños/as y 22,3 para los adultos). Aunque existen estudios que achacan una mayor sintomatología en niños/as con respecto a sujetos de mayor edad (Carmena et al., 2012), varios trabajos llevados a cabo en España demuestran la elevada prevalencia de *G. intestinalis* en niños/as asintomáticos, con tasas de colonización que oscilan

entre 2,5% y hasta un 31,6% (Muadica et al., 2020; Köster et al., 2021a; Hernández-Castro et al., 2023b). Encontramos diversa literatura que informa de que en áreas donde *G. intestinalis* es endémica, las exposiciones repetidas durante la primera infancia generan infecciones sin desarrollo de sintomatología gastrointestinal o, incluso, pudiendo ser protectora en la aparición de diarrea (Bartelt & Platts-Mills, 2016; Dougherty & Bartelt, 2022). Analizando los datos epidemiológicos de los pacientes menores de 15 años y asintomáticos en nuestra población, en un 28,6% (4/14) de los casos se trataban de cribados de salud realizados a niños/as extranjeros que procedían de áreas endémicas; aun así, el porcentaje de niños/as asintomáticos nacidos en España continúa siendo considerablemente superior al de los adultos (33,3% [10/29] frente al 7,1% [1/14]). Hay que tener en cuenta el posible sesgo debido a la mayor realización de exámenes de salud en niños/as con síntomas más difusos que en los adultos, como irritabilidad y cambios en el apetito, lo que genera una mayor detección de *Giardia* en ausencia de síntomas típicos de enfermedad gastrointestinal en esta población, que son los evaluados en este estudio.

Es importante reseñar que, principalmente en zonas endémicas donde se ha reportado un elevado número de infecciones persistentes y subclínicas de *G. intestinalis* en niños/as, varios estudios informan de que, aunque haya ausencia de síntomas gastrointestinales, las infecciones crónicas pueden desencadenar otras patologías en la población infantil como anemia, retraso del crecimiento o deterioro del desarrollo neurocognitivo (Savioli et al., 2006; Halliez & Buret, 2013; Bartelt & Platts-Mills, 2016; Lehto et al., 2019; Dougherty & Bartelt, 2022). Algunos autores relacionan estas infecciones crónicas al subgenotipo ambiguo AII/AIII, remarcando la resistencia al tratamiento mantenida por este subgenotipo (De Lucio et al., 2015; Hernández-Castro et al., 2023b). En nuestra población se diagnosticaron 4 niños/as con procesos de reinfección o giardosis crónica, con aislamientos del parásito en episodios que diferían entre sí en un lapso de 6 meses o más, sin embargo, no encontramos en este grupo a la paciente parasitada por AII/AIII. Debido a que únicamente se realizó caracterización molecular en una de las muestras por paciente remitidas durante los años de estudio, no es posible diferenciar si nos encontramos ante eventos de infección a largo plazo (posiblemente se detectaría la misma variante génica de forma crónica) o ante una reinfección (posibilidad de identificación de diferentes variantes); sería de especial interés el seguimiento y análisis de diferentes muestras de heces donde se detecte *G. intestinalis* a lo largo del tiempo, para determinar la verdadera prevalencia de infecciones crónicas y si realmente hay asociación de algún subgenotipo con esta cronicidad.

Además de la sintomatología gastrointestinal clásica que se le atribuye a este parásito, también se ha relacionado con afectaciones cutáneas de la piel, como urticaria crónica, angioedema y

dermatitis atópica (Humbert et al., 2017), existiendo diferentes casos en la literatura en los cuales tras el tratamiento frente a *G. intestinalis*, la clínica dermatológica desaparece (Weisman, 1979; Nenoff et al., 2006; Yildiz Ozkaya et al., 2022). El mecanismo por el que se desarrollan estas patologías puede deberse a procesos inflamatorios, de hiperpermeabilidad intestinal o reacciones alérgicas que provoca la infestación por *G. intestinalis* (Humbert et al., 2017). Estudios recientes demuestran la capacidad de *Giardia* de desencadenar una respuesta inmunitaria temprana de tipo 2 (Th2) en el intestino, la cual podría predisponer a una mayor reactividad alérgica (Sardinha-Silva et al., 2024), además, el daño que ocasiona en la mucosa intestinal puede favorecer la mayor penetración de antígenos alimentarios y aumentar la sensibilización y el desarrollo de estas patologías (Di Prisco et al., 1998). En nuestra población, un 32,0% (16/50) de los pacientes sufría de alguna enfermedad alérgica y un 20,0% (10/50) presentaba trastornos cutáneos, observándose que un 70,0% (7/10) de los pacientes con afectaciones dermatológicas también tenían antecedentes de alergia. No se consiguió establecer asociaciones entre el genotipo/subgenotipo y el desarrollo de estas condiciones.

Por último, se estudió la posible asociación entre *G. intestinalis* y la eosinofilia. A pesar de que los protozoos no se relacionan con este signo, donde las infecciones por *Giardia* generalmente no provocan anomalías hematológicas, encontramos estudios que muestran una elevación de eosinófilos en sangre relacionados con la infección por este parásito (Ortiz Arduan et al., 1990; Ferrante et al., 1991; Aguiar et al., 2011; Ahmad et al., 2011), e incluso patologías más graves como derrame pleural eosinofílico bilateral (Singh et al., 2013) y miocarditis eosinofílicas fulminantes (Robaei et al., 2014; Dzierwa et al., 2016; Avsar et al., 2019; Beuy & Wiwanitkit, 2019), todos ellos sin obtener otros datos clínicos ni de laboratorio que pudieran explicar estas afecciones; además de la remisión de la sintomatología tras el tratamiento frente a la giardiasis. En nuestros datos no se observó la marcada eosinofilia que señalan otros autores. A pesar de detectar un 33,3% (8/24) de pacientes con eosinofilia, el 50,0% de ellos presentaba alguna condición alérgica y el 25,0% tenía una infección concomitante con helmintos, lo cual podría explicar el aumento en los niveles de eosinófilos detectado, por lo que no sería posible atribuir a *Giardia* como la causa de dicha elevación. Además, no se relacionó ningún genotipo o subgenotipo específico con la aparición de eosinofilia en estos pacientes.

#### 5.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PROPUESTAS DE FUTURO

La principal limitación que encontramos en este estudio es la población analizada, tratándose de pacientes que remiten sus muestras fecales para estudio parasitológico al hospital, principalmente sintomáticos, sin una representación real de la población en general. A pesar de que contamos con individuos asintomáticos, la mayor parte de ellos forman parte de colectivos específicos, como inmunodeprimidos y pacientes procedentes de países con alta prevalencia parasitaria, por lo que la prevalencia y diversidad genética parasitaria real en la población de Valencia no puede ser inferida a partir de nuestros resultados.

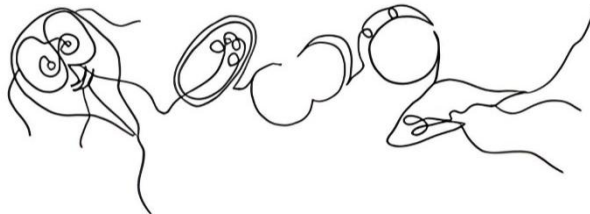
Además, el uso exclusivo de la microscopía óptica como diagnóstico, siendo la técnica disponible en el laboratorio durante los años de estudio, podría llevar a la pérdida de muestras positivas, ya que su sensibilidad es menor en comparación con otros métodos, como la qPCR. Del mismo modo, el estudio MLST empleado, basado en los genes típicamente utilizados para la caracterización molecular de *Giardia intestinalis* (*gdh* y *bg*), podría haber reducido la tasa de éxito en el genotipado de este parásito.

En el futuro, sería de especial relevancia repetir un estudio similar, abarcando un mayor tamaño muestral y más representativo de la población general, junto con el despistaje de coinfecciones víricas y bacterianas según síntomas concretos y el empleo de cuestionarios individualizados que incluyan el estudio de diferentes factores de riesgo diferenciales, como variaciones en las condiciones ambientales y ocupacionales de cada individuo, con el fin de establecer asociaciones más sólidas sobre la adquisición parasitaria y sus variantes genéticas. Además, sería interesante implementar nuevas técnicas de diagnóstico, como la qPCR, y ampliar el estudio mediante análisis de las secuencias completas de *ssu* ADNr en *Blastocystis* sp. que cumplan criterios para ser considerados nuevos subtipos y, en el caso de *G. intestinalis*, estudiar nuevos genes más conservados que permitan una caracterización molecular más precisa, además de profundizar en el análisis de las mutaciones encontradas con su repercusión en las proteínas resultantes y su posible relación con efectos fenotípicos en el parásito.

Por último, realizar estudios longitudinales con protocolos de seguimiento de los pacientes podría ayudar a la identificación de infecciones refractarias al tratamiento antiparasitario y diferenciar entre infecciones crónicas y reinfecciones, proporcionando un análisis más detallado de estas parasitaciones.



## 6. CONCLUSIONES



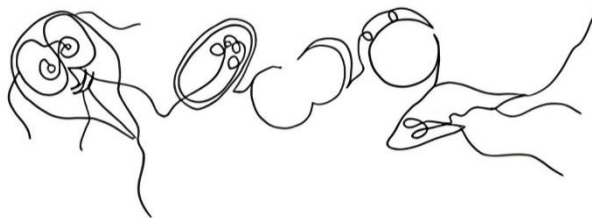


Del análisis de los resultados y su discusión se obtienen las siguientes conclusiones:

1. En nuestro Área de Salud, mediante microscopía óptica, *Blastocystis* sp. y *Giardia intestinalis* son los protistas intestinales más frecuentemente aislados en muestras de heces; no presentan patrón estacional, pero *Blastocystis* sp. muestra un aumento de casos con el paso de los años, a diferencia de *G. intestinalis*, que se mantiene estable.
2. La edad y otros datos sociodemográficos son clave para orientar la sospecha clínica: *Blastocystis* sp. es más frecuente en adultos mayores y *G. intestinalis* en niños con rango de edad entre 0-5 años.
3. El subtipo predominante de *Blastocystis* sp. es ST1, seguido de ST2 y ST4, con especial relevancia la elevada prevalencia de ST6. Se observan diferencias en la prevalencia de los subtipos según factores como la migración (ST3 posiblemente importado a nuestro Área de Salud), sexo y edad (ST1 más frecuente en niños y varones, ST4 y ST6 en pacientes de mayor edad, siendo ST4 más común en mujeres).
4. Existe una gran diversidad genética en los subtipos ST2, ST3 y ST6, lo que sugiere un posible origen polifilético. Por otro lado, los subtipos ST1 y ST4 muestran una mayor homogeneidad genética, lo que puede indicar un origen monofilético con una transmisión común.
5. El subgenotipo predominante de *G. intestinalis* es BIV, seguido de All y BIII. Se observó una mayor frecuencia de BIV en niños/as y All en adultos, además de la posible importación de BIII desde África.
6. La variante genética de *Blastocystis* sp. y *G. intestinalis* parece no determinar el desarrollo de sintomatología, la cual probablemente depende de múltiples factores.
7. La elevada prevalencia de pacientes inmunodeprimidos asintomáticos con *Blastocystis* sp. refuerza su posible carácter comensal. Estos resultados no se repitieron con *G. intestinalis*.
8. Se recomienda un valor límite de Ct  $\approx$  30 (29,8) en las pruebas de qPCR para *ssu* ADNr de *G. intestinalis*, por encima del cual no sería recomendable realizar pruebas de PCR convencional para caracterización molecular, debido a la baja probabilidad de obtener resultados.



## 7. BIBLIOGRAFÍA





- Abdel-Hameed, D. M., & Hassanin, O. M. (2011). Protease activity of *Blastocystis hominis* subtype3 in symptomatic and asymptomatic patients. *Parasitology Research*, 109(2), 321–327. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2259-x>
- Abdulsalam, A. M., Ithoi, I., Al-Mekhlafi, H. M., Khan, A. H., Ahmed, A., Surin, J., & Mak, J. W. (2013). Prevalence, predictors and clinical significance of *Blastocystis* sp. in Sebha, Libya. *Parasites & Vectors*, 6, 86. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-86>
- Abe N. (2004). Molecular and phylogenetic analysis of *Blastocystis* isolates from various hosts. *Veterinary Parasitology*, 120(3), 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.003>
- Adam R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447–475. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.447-475.2001>
- Adam R. D. (2021). *Giardia duodenalis*: Biology and pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(4), e0002419. <https://doi.org/10.1128/CMR.00024-19>
- Adam, E. A., Yoder, J. S., Gould, L. H., Hlavsa, M. C., & Gargano, J. W. (2016). Giardiasis outbreaks in the United States, 1971-2011. *Epidemiology and Infection*, 144(13), 2790–2801. <https://doi.org/10.1017/S0950268815003040>
- Adam, R. D., Dahlstrom, E. W., Martens, C. A., Bruno, D. P., Barbian, K. D., Ricklefs, S. M., Hernandez, M. M., Narla, N. P., Patel, R. B., Porcella, S. F., & Nash, T. E. (2013). Genome sequencing of *Giardia lamblia* genotypes A2 and B isolates (DH and GS) and comparative analysis with the genomes of genotypes A1 and E (WB and Pig). *Genome Biology and Evolution*, 5(12), 2498–2511. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt197>
- Adamska, M. (2020). First report of *Blastocystis* sp. subtypes in natural water bodies in north-western Poland: a one-year monitoring. *International Journal of Environmental Health Research*, 32(4), 862–869. <https://doi.org/10.1080/09603123.2020.1803804>
- Adao, D. E. V., & Rivera, W. L. (2022). Variations in active proteases of *Blastocystis* sp. obtained from water and animal isolates from the Philippines. *Journal of Parasitic Diseases : Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, 46(3), 627–636. <https://doi.org/10.1007/s12639-022-01472-8>
- Adao, D. E. V., & Rivera, W. L. (2024). Subtype-host patterns and genetic differentiation of *Blastocystis* sp. in the Philippines. *Heliyon*, 10(7), e29019. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29019>

- Adeyemo, F. E., Singh, G., Reddy, P., & Stenström, T. A. (2018). Methods for the detection of *Cryptosporidium* and *Giardia*: From microscopy to nucleic acid based tools in clinical and environmental regimes. *Acta Tropica*, 184, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.011>
- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Cárdenas, P., Čepička, I., Chistyakova, L., Del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A. A., ... Zhang, Q. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4–119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. a. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., . . . Spiegel, F. W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5), 429–493. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x>
- Aggarwal, A., & Nash, T. E. (1987). Comparison of two antigenically distinct *Giardia lamblia* isolates in gerbils. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36(2), 325–332. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.36.325>
- Aguiar, A., Saraiva, S., Pontes, M., & Coelho, E. (2011). Eosinofilia em recém-nascido: um caso de giardíase e alergia à proteína do leite de vaca. *Acta Medica Portuguesa*, 24(3), 463–466.
- Aguiar, J. M., Silva, S. O., Santos, V. A., Taniwaki, S. A., Oliveira, T. M., Ferreira, H. L., Keid, L. B., Gregori, F., & Soares, R. M. (2016). Evidence of heterozygosity and recombinant alleles in single cysts of *Giardia duodenalis*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria = Brazilian journal of Veterinary Parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 25(2), 187–195. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016031>
- Ahmad, R. N., Sherjil, A., Mahmood, A., & Rafi, S. (2011). Severe eosinophilia in a case of giardiasis. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 3(1), e2011009. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2011.009>
- Ajjampur, S. S., & Tan, K. S. (2016). Pathogenic mechanisms in *Blastocystis* spp. - Interpreting results from in vitro and in vivo studies. *Parasitology International*, 65(6 Pt B), 772–779. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.007>

- Al, F. D., & Hökelek, M. (2007). *Blastocystis hominis* fırsatçı bir patojen mi?. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(1), 28–36.
- AlamLih, L., Abufaied, M., & Al-Allaf, A. W. (2020). An unusual cause of reactive arthritis with urticarial: A case report. *Qatar Medical Journal*, 2020(2), 25. <https://doi.org/10.5339/qmj.2020.25>
- Alexeieff, A. (1911). Sur la nature des formations dites kystes de *Trichomonas intestinalis*. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales*, 71, 296-298.
- Alfellani, M. A., Jacob, A. S., Perea, N. O., Krecek, R. C., Taner-Mulla, D., Verweij, J. J., Levecke, B., Tannich, E., Clark, C. G., & Stensvold, C. R. (2013a). Diversity and distribution of *Blastocystis* sp. subtypes in non-human primates. *Parasitology*, 140(8), 966–971. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000255>
- Alfellani, M. A., Stensvold, C. R., Vidal-Lapiedra, A., Onuoha, E. S., Fagbenro-Beyioku, A. F., & Clark, C. G. (2013c). Variable geographic distribution of *Blastocystis* subtypes and its potential implications. *Acta Tropica*, 126(1), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.12.011>
- Alfellani, M. A., Taner-Mulla, D., Jacob, A. S., Imeede, C. A., Yoshikawa, H., Stensvold, C. R., & Clark, C. G. (2013b). Genetic diversity of *Blastocystis* in livestock and zoo animals. *Protist*, 164(4), 497–509. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.05.003>
- Allain, T., & Buret, A. G. (2020). Pathogenesis and post-infectious complications in giardiasis. *Advances in Parasitology*, 107, 173–199. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.12.001>
- Allain, T., Fekete, E., & Buret, A. G. (2019). *Giardia* cysteine proteases: the teeth behind the smile. *Trends in Parasitology*, 35(8), 636–648. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.06.003>
- Allain, T., Fekete, E., Sosnowski, O., Desmots de Lamache, D., Motta, J. P., Leger, D., Feener, T., Reimer, R. A., & Buret, A. G. (2021). High-fat diet increases the severity of *Giardia* infection in association with low-grade inflammation and gut microbiota dysbiosis. *Scientific Reports*, 11(1), 18842. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98262-8>
- Al-Mohammed H. I. (2011). Genotypes of *Giardia intestinalis* clinical isolates of gastrointestinal symptomatic and asymptomatic Saudi children. *Parasitology Research*, 108(6), 1375–1381. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2033-5>

- Álvarez-Martínez, M. J., Belhassen-García, M., Flores-Chavez, M. D., Pérez de Ayala, A., & Sulleiro, E. (2020). Diagnóstico de parasitosis importadas en España. En M. J. Álvarez-Martínez (Coord.), E. Cercenado Mansilla & R. Cantón Moreno (Eds.), *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- Amat, C. B., Motta, J. P., Fekete, E., Moreau, F., Chadee, K., & Buret, A. G. (2017). Cysteine protease-dependent mucous disruptions and differential mucin gene expression in *Giardia duodenalis* Infection. *The American Journal of Pathology*, 187(11), 2486–2498. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.07.009>
- Amorós, I., Alonso, J. L., & Cuesta, G. (2010). *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts on salad products irrigated with contaminated water. *Journal of Food Protection*, 73(6), 1138–1140. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.6.1138>
- Andersen, L. O., & Stensvold, C. R. (2016). *Blastocystis* in health and disease: are we moving from a clinical to a public health perspective?. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(3), 524–528. <https://doi.org/10.1128/JCM.02520-15>
- Andersson J. O. (2012). Double peaks reveal rare diplomonad sex. *Trends in Parasitology*, 28(2), 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.11.002>
- Angelici, M. C., Nardis, C., Scarpelli, R., & Ade, P. (2018). *Blastocystis hominis* transmission by non-potable water: a case report in Italy. *The New Microbiologica*, 41(2), 173–177.
- Ankarklev, J., Lebbad, M., Einarsson, E., Franzén, O., Ahola, H., Troell, K., & Svärd, S. G. (2018). A novel high-resolution multilocus sequence typing of *Giardia intestinalis* Assemblage A isolates reveals zoonotic transmission, clonal outbreaks and recombination. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 60, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.02.012>
- Antonetti, L., Berrilli, F., Di Cristanziano, V., Farowski, F., Daeumer, M., Eberhardt, K. A., Santoro, M., Federici, M., & D'Alfonso, R. (2024). Investigation of gut microbiota composition in humans carrying *Blastocystis* subtypes 1 and 2 and *Entamoeba hartmanni*. *Gut Pathogens*, 16(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s13099-024-00661-5>
- Anuar, T. S., Ghani, M. K. A., Azreen, S. N., Salleh, F. M., & Moktar, N. (2013). *Blastocystis* infection in Malaysia: Evidence of waterborne and human-to-human transmissions among the Proto-Malay, Negrito and Senoi tribes of Orang Asli. *Parasites & Vectors*, 6(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-40>

- Aparicio, R. M., & Díaz-Cirujano AI. (3 de mayo de 2021). *Parasitosis intestinal* (v.1/2021). *Guía-ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico*. <http://www.guia-abe.es>
- Apacor. (s.f.). *MIDI Parasep: Sistema de concentración de parásitos*. Apacor. <https://apacor.com/product/midi-parasep/>
- Ara-Montojo, M. F., Bustamante, J., Sainz, T., Pérez, S., Jiménez-Moreno, B., Ruiz-Carrascoso, G., Rodríguez-Molino, P., Villota, J., García-López-Hortenano, M., & Mellado-Peña, M. J. (2021). Intestinal giardiasis in children: Five years' experience in a reference unit. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 42, 102082. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2021.102082>
- Arancón Viguera, A., Segura Torres, J. C., Galán Labaca, I., Trapero Carrascosa, J. L., & Maqueda Blasco, J. (1990). Estudio de portadores familiares en 132 casos parasitados por *Giardia lamblia* [A study of family carriers in 132 cases of *Giardia lamblia* infestation]. *Atencion Primaria*, 7(6), 416–418.
- Argüello-García, R., Carrero, J. C., & Ortega-Pierres, M. G. (2023). Extracellular cysteine proteases of key intestinal protozoan pathogens-factors linked to virulence and pathogenicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(16), 12850. <https://doi.org/10.3390/ijms241612850>
- Arisue, N., Hashimoto, T., & Yoshikawa, H. (2003). Sequence heterogeneity of the small subunit ribosomal RNA genes among *Blastocystis* isolates. *Parasitology*, 126(Pt 1), 1–9. <https://doi.org/10.1017/s0031182002002640>
- Arisue, N., Hashimoto, T., Yoshikawa, H., Nakamura, Y., Nakamura, G., Nakamura, F., Yano, T., & Hasegawa, M. (2002). Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(1), 42–53. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2002.tb00339.x>
- Asghari, A., Hassanipour, S., & Hatam, G. (2021). Comparative molecular prevalence and subtypes distribution of *Blastocystis* sp. a potentially zoonotic infection isolated from symptomatic and asymptomatic patients in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Acta Parasitologica*, 66(3), 745–759. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00360-0>

- Asher, A. J., Hose, G., & Power, M. L. (2016). Giardiasis in NSW: Identification of *Giardia duodenalis* assemblages contributing to human and cattle cases, and an epidemiological assessment of sporadic human giardiasis. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *44*, 157–161. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.051>
- Attah, A. O., Sanggari, A., Li, L. I., Him, N. a. I. I. N., Ismail, A. H., & Termizi, F. H. M. (2022). *Blastocystis* occurrence in water sources worldwide from 2005 to 2022: a review. *Parasitology Research*, *122*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07731-0>
- Autier, B., Gangneux, J. P., & Robert-Gangneux, F. (2020). Evaluation of the Allplex™ Gastrointestinal Panel-Parasite Assay for protozoa detection in stool samples: A retrospective and prospective study. *Microorganisms*, *8*(4), 569. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040569>
- Avsar, S., Oz, A., Çınar, T., Ösken, A., & Güvenç, T. S. (2019). Acute fulminant eosinophilic myocarditis due to *Giardia lamblia* infection presented with cardiogenic shock in a young patient. *Anatolian Journal of Cardiology*, *21*(4), 234–235. <https://doi.org/10.14744/AnatoJCardiol.2019.48742>
- Ayan, A., Aslan Çelik, B., Çelik, Ö. Y., Yılmaz, A. B., Orunç Kılınç, Ö., & Oktay Ayan, Ö. (2024). Molecular detection and subtype distribution of *Blastocystis* sp. from shelter dogs and cats in Van, Turkey: First report of ST10 in cats and ST1, ST10 and ST30 in dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, *27*(3), 389–395. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2024.151732>
- Aydin, A. F., Besirbellioglu, B. A., Avci, I. Y., Tanyuksel, M., Araz, E., & Pahsa, A. (2004). Classification of *Giardia duodenalis* parasites in Turkey into groups A and B using restriction fragment length polymorphism. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *50*(2), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.06.001>
- Aykur, M., Camyar, A., Türk, B. G., Sin, A. Z., & Dagci, H. (2022). Evaluation of association with subtypes and alleles of *Blastocystis* with chronic spontaneous urticaria. *Acta Tropica*, *231*, 106455. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106455>
- Aynur, Z. E., Güçlü, Ö., Yıldız, İ., Aynur, H., Ertabaklar, H., Bozdoğan, B., & Ertuğ, S. (2019). Molecular characterization of *Blastocystis* in cattle in Turkey. *Parasitology Research*, *118*(3), 1055–1059. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06243-8>

- Azcona-Gutiérrez, J. M., de Lucio, A., Hernández-de-Mingo, M., García-García, C., Soria-Blanco, L. M., Morales, L., Aguilera, M., Fuentes, I., & Carmena, D. (2017). Molecular diversity and frequency of the diarrheagenic enteric protozoan *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in a hospital setting in Northern Spain. *PloS One*, 12(6), e0178575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178575>
- Aziz, A. F. E., Roshidi, N., Muhammad Hanif, M. D. H., Tye, G. J., & Arifin, N. (2024). *Giardia lamblia* Immunoassay: Systematic review and meta-analysis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 561, 119839. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2024.119839>
- Baek, S., Maloney, J. G., Molokin, A., George, N. S., Cortés Vecino, J. A., & Santin, M. (2022). Diversity of *Blastocystis* subtypes in horses in Colombia and identification of two new subtypes. *Microorganisms*, 10(9), 1693. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091693>
- Bahrami, F., Babaei, E., Badirzadeh, A., Riabi, T. R., & Abdoli, A. (2019). *Blastocystis*, urticaria, and skin disorders: review of the current evidences. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(6), 1027–1042. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03793-8>
- Bahrami, F., Haghighi, A., Zamini, G., & Khademerfan, M. (2020). Molecular evidence for zoonotic transmission of *Blastocystis* subtypes in Kurdistan province, West of Iran. *Annals of Parasitology*, 66(1), 19–25. <https://doi.org/10.17420/ap6601.234>
- Barlow, D. J., & Thornton, J. M. (1988). Helix geometry in proteins. *Journal of Molecular Biology*, 201(3), 601–619. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90641-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90641-9)
- Barrett, T. M., Titcomb, G. C., Janko, M. M., Pender, M., Kauffman, K., Solis, A., Randriamoria, M. T., Young, H. S., Mucha, P. J., Moody, J., Kramer, R. A., Soarimalala, V., & Nunn, C. L. (2024). Disentangling social, environmental, and zoonotic transmission pathways of a gastrointestinal protozoan (*Blastocystis* spp.) in northeast Madagascar. *American Journal of Physical Anthropology*, 185(3), e25030. <https://doi.org/10.1002/ajpa.25030>
- Bart, A., Wentink-Bonnema, E. M., Gilis, H., Verhaar, N., Wassenaar, C. J., van Vugt, M., Goorhuis, A., & van Gool, T. (2013). Diagnosis and subtype analysis of *Blastocystis* sp. in 442 patients in a hospital setting in the Netherlands. *BMC Infectious Diseases*, 13, 389. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-389>

- Bartelt, L. A., & Platts-Mills, J. A. (2016). *Giardia*: a pathogen or commensal for children in high-prevalence settings?. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 29(5), 502–507. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000293>
- Bayo, S. M., González, E. L., Bellés, A. B., Sánchez, A. B., Arnuelos, J. A., De Tudela, I. J. P., Sánchez, I. P., & González, M. G. (2022). Detection and pathological role of intestinal protozoa in children. *Parasitology International*, 88, 102558. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102558>
- Bénére, E., Van Assche, T., Van Ginneken, C., Peulen, O., Cos, P., & Maes, L. (2012). Intestinal growth and pathology of *Giardia duodenalis* assemblage subtype A(I), A(II), B and E in the gerbil model. *Parasitology*, 139(4), 424–433. <https://doi.org/10.1017/S0031182011002137>
- Berry, A. S. F., Johnson, K., Martins, R., Sullivan, M. C., Farias Amorim, C., Putre, A., Scott, A., Wang, S., Lindsay, B., Baldassano, R. N., Nolan, T. J., & Beiting, D. P. (2020). Natural infection with *Giardia* is associated with altered community structure of the human and canine gut microbiome. *mSphere*, 5(4), e00670-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00670-20>
- Beuy, J., & Wiwanitkit, V. (2019). Acute fulminant eosinophilic myocarditis due to *Giardia lamblia* infection. *Anatolian Journal of Cardiology*, 21(5), 293–294. <https://doi.org/10.14744/AnatoUCardiol.2019.07943>
- Bhatt, A. P., Arnold, J. W., Awoniyi, M., Sun, S., Feijoli Santiago, V., Coskuner, D., Henrique Quintela, P., Walsh, K., Xiao, J., Ngobeni-Nyambi, R., Hansen, B., Gulati, A. S., Carroll, I. M., Azcarate-Peril, M. A., Fodor, A. A., Swann, J., & Bartelt, L. A. (2024). *Giardia* antagonizes beneficial functions of indigenous and therapeutic intestinal bacteria during protein deficiency. *Gut Microbes*, 16(1), 2421623. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2421623>
- Billy, V., Lhotská, Z., Jirků, M., Kadlecová, O., Frgelecová, L., Parfrey, L. W., & Pomajbíková, K. J. (2021). *Blastocystis* colonization alters the gut microbiome and, in some cases, promotes faster recovery from induced colitis. *Frontiers in Microbiology*, 12, 641483. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.641483>
- Boorom, K. F., Smith, H., Nimri, L., Viscogliosi, E., Spanakos, G., Parkar, U., Li, L. H., Zhou, X. N., Ok, U. Z., Leelayoova, S., & Jones, M. S. (2008). Oh my aching gut: irritable bowel syndrome, *Blastocystis*, and asymptomatic infection. *Parasites & Vectors*, 1(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-40>

- Boreham, P. F., & Stenzel, D. J. (1993a). *Blastocystis* in humans and animals: Morphology, biology, and epizootiology. *Advances in Parasitology*, 32, 1–70. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60206-7](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60206-7)
- Boreham, P. F., & Stenzel, D. J. (1993b). The current status of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Today (Personal ed.)*, 9(7), 251. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90068-q](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90068-q)
- Boreham, R. E., Benson, S., Stenzel, D. J., & Boreham, P. F. (1996). *Blastocystis hominis* infection. *Lancet (London, England)*, 348(9022), 272–273. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)65587-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)65587-0)
- Bourli, P., Eslahi, A. V., Tzoraki, O., & Karanis, P. (2023). Waterborne transmission of protozoan parasites: a review of worldwide outbreaks – an update 2017–2022. *Journal of Water and Health*, 21(10), 1421–1447. <https://doi.org/10.2166/wh.2023.094>
- Boutahar, M., Belaouni, M., Ibrahimi, A., Eljaoudi, R., Aanniz, T., Er-Rami, M., Köster, P. C., Dashti, A., & Carmena, D. (2024). Unveiling *Blastocystis* epidemiology in Morocco: subtype diversity among clinical patients with and without gastrointestinal manifestations in the Meknes region. *Parasitology Research*, 123(7), 273. <https://doi.org/10.1007/s00436-024-08288-w>
- Brumpt, E. (1912). *Blastocystis hominis* sp. et formes voisines. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 5, 725–730.
- Brynildsrud, O., Tysnes, K. R., Robertson, L. J., & Debenham, J. J. (2018). *Giardia duodenalis* in primates: Classification and host specificity based on phylogenetic analysis of sequence data. *Zoonoses and Public Health*, 65(6), 637–647. <https://doi.org/10.1111/zph.12470>
- Burki, F. (2014). The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(5), a016147. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016147>
- Caballero-Gómez, J., Ávalos, G., Matas-Méndez, P., Figueiredo, A. M., Castro-Scholten, S., Jiménez-Martín, D., Köster, P. C., Santín, M., Bailo, B., Cano-Terriza, D., Sarmiento, P., Neves, N., Carrapato, C., González-Barrio, D., Mateo, M., García-Bocanegra, I., Dashti, A., Sánchez, S., & Carmena, D. (2025). Dietary profiles of wild carnivores and *Blastocystis* occurrence: The case of the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) and systematic review. *Research in Veterinary Science*, 184, 105518. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105518>

- Cabrine-Santos, M., Cintra, E.doN., do Carmo, R. A., Nascentes, G. A., Pedrosa, A. L., Correia, D., & Oliveira-Silva, M. B. (2015). Occurrence of *Blastocystis* spp. in Uberaba, Minas Gerais, BRAZIL. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 57(3), 211–214. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000300005>
- Cacciò, S. M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A., & Pozio, E. (2008). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International Journal for Parasitology*, 38(13), 1523–1531. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.04.008>
- Cacciò, S. M., De Giacomo, M., & Pozio, E. (2002). Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 1023–1030. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00068-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00068-1)
- Cacciò, S. M., Lalle, M., & Svärd, S. G. (2018). Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 66, 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.001>
- Cai, W., Ryan, U., Xiao, L., & Feng, Y. (2021). Zoonotic giardiasis: an update. *Parasitology Research*, 120(12), 4199–4218. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07325-2>
- Cakir, F., Cicek, M., & Yildirim, I. H. (2019). Determination the subtypes of *Blastocystis* sp. and evaluate the effect of these subtypes on pathogenicity. *Acta Parasitologica*, 64(1), 7–12. <https://doi.org/10.2478/s11686-018-00002-y>
- Calero-Bernal, R., Santín, M., Maloney, J. G., Martín-Pérez, M., Habela, M. A., Fernández-García, J. L., Figueiredo, A., Nájera, F., Palacios, M. J., Mateo, M., Balseiro, A., Barral, M., Lima-Barberoi, J. F., Köster, P. C., & Carmena, D. (2020). *Blastocystis* sp. subtype diversity in wild carnivore species from Spain. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 67(2), 273–278. <https://doi.org/10.1111/jeu.12772>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

- Cammarota, G., Ianiro, G., Tilg, H., Rajilić-Stojanović, M., Kump, P., Satokari, R., Sokol, H., Arkkila, P., Pintus, C., Hart, A., Segal, J., Aloï, M., Masucci, L., Molinaro, A., Scaldaferri, F., Gasbarrini, G., Lopez-Sanroman, A., Link, A., de Groot, P., de Vos, W. M., ... European FMT Working Group (2017). European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*, 66(4), 569–580. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313017>
- Cardona, G. A., Carabin, H., Goñi, P., Arriola, L., Robinson, G., Fernández-Crespo, J. C., Clavel, A., Chalmers, R. M., & Carmena, D. (2011). Identification and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in children and cattle populations from the province of Álava, North of Spain. *The Science of the Total Environment*, 412-413, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.076>
- Carmena, D., Aguinagalde, X., Zigorraga, C., Fernández-Crespo, J. C., & Ocio, J. A. (2007). Presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in drinking water supplies in northern Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 102(3), 619–629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03193.x>
- Carmena, D., Cardona, G. A., & Sánchez-Serrano, L. P. (2012). Current situation of *Giardia* infection in Spain: Implications for public health. *World Journal of Clinical Infectious Diseases*, 2(1), 1-12. <https://doi.org/10.5495/wjcid.v2.i1.1>
- Casero, R. D., Mongi, F., Sánchez, A., & Ramírez, J. D. (2015). *Blastocystis* and urticaria: Examination of subtypes and morphotypes in an unusual clinical manifestation. *Acta Tropica*, 148, 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.004>
- Castro-Hermida, J. A., González-Warleta, M., & Mezo, M. (2015). *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* as pathogenic contaminants of water in Galicia, Spain: the need for safe drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 218(1), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.09.001>
- Caudet, J., Trelis, M., Cifre, S., Soriano, J. M., & Merino-Torres, J. F. (2022b). Presence and significance of intestinal unicellular parasites in a morbidly obese population. *International Journal of Obesity (2005)*, 46(1), 220–227. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00980-6>
- Caudet, J., Trelis, M., Cifre, S., Soriano, J. M., Rico, H., & Merino-Torres, J. F. (2022a). Interplay between Intestinal bacterial communities and unicellular parasites in a morbidly obese population: A neglected trinomial. *Nutrients*, 14(15), 3211. <https://doi.org/10.3390/nu14153211>

- Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC). (18 de diciembre de 2024). Giardiosis - *Annual Epidemiological Report for 2022*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/giardiosis-annual-epidemiological-report-2022>
- Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III (CNE-ISCIII). (2023). *Informe epidemiológico sobre la situación de la giardiosis en España. Año 2022*.
- Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). (21 de octubre de 2019). *Blastocystis* sp. <https://www.cdc.gov/dpdx/Blastocystis/index.html>
- Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). (30 de mayo de 2025). *COVID-19 vaccination guidance for people who are immunocompromised*. COVID-19. <https://www.cdc.gov/covid/hcp/vaccine-considerations/immunocompromised.html>
- Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC). (5 de junio de 2024). *Giardiosis*. <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiosis/index.html>
- Chandramathi, S., Suresh, K. G., Mahmood, A. A., & Kuppusamy, U. R. (2010). Urinary hyaluronidase activity in rats infected with *Blastocystis hominis*--evidence for invasion?. *Parasitology Research*, 106(6), 1459–1463. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1825-y>
- Chang, Y., Li, J., & Zhang, L. (2023). Genetic diversity and molecular diagnosis of *Giardia*. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 113, 105482. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105482>
- Chatterjee, A., Carpentieri, A., Ratner, D. M., Bullitt, E., Costello, C. E., Robbins, P. W., & Samuelson, J. (2010). *Giardia* cyst wall protein 1 is a lectin that binds to curled fibrils of the GalNAc homopolymer. *PLoS Pathogens*, 6(8), e1001059. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001059>
- Chin, A. C., Teoh, D. A., Scott, K. G., Meddings, J. B., Macnaughton, W. K., & Buret, A. G. (2002). Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infection and Immunity*, 70(7), 3673–3680. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.7.3673-3680.2002>

- Cian, A., El Safadi, D., Osman, M., Moriniere, R., Gantois, N., Benamrouz-Vanneste, S., Delgado-Viscogliosi, P., Guyot, K., Li, L. L., Monchy, S., Noël, C., Poirier, P., Nourrisson, C., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Bosc, S., Chabé, M., Petit, T., Certad, G., & Viscogliosi, E. (2017). Molecular epidemiology of *Blastocystis* sp. in various animal groups from two french zoos and evaluation of potential zoonotic risk. *PLoS One*, 12(1), e0169659. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169659>
- Cifre, S (2021). *Enteroparasitosis asociadas a trastornos intestinales crónicos*. [Tesis de Doctorado, Universitat de València]. Fichero central de tesis Doctorales de España – TESEO. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=302969>
- Clark, C. G., van der Giezen, M., Alfellani, M. A., & Stensvold, C. R. (2013). Recent developments in *Blastocystis* research. *Advances in Parasitology*, 82, 1–32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407706-5.00001-0>
- Cobo, F., Salas-Coronas, J., Cabezas-Fernández, M. T., Vázquez-Villegas, J., Cabeza-Barrera, M. I., & Soriano-Pérez, M. J. (2016). Infectious diseases in immigrant population related to the time of residence in Spain. *Journal of Immigrant and Minority Health*, 18(1), 8–15. <https://doi.org/10.1007/s10903-014-0141-5>
- Coelho, C. H., Silva, A. C. C., Costa, A. O., & Fernandes, A. P. (2017). Morphological and physiological characteristics of a virulent and zoonotic assemblage A *Giardia duodenalis* canine strain. *Acta Tropica*, 174, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.002>
- Cooper, M. A., Adam, R. D., Worobey, M., & Sterling, C. R. (2007). Population genetics provides evidence for recombination in *Giardia*. *Current Biology : CB*, 17(22), 1984–1988. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.020>
- Corsi, A., Nucci, C., Knafelz, D., Bulgarini, D., Di Iorio, L., Polito, A., De Risi, F., Ardenti Morini, F., & Paone, F. M. (1998). Ocular changes associated with *Giardia lamblia* infection in children. *The British Journal of Ophthalmology*, 82(1), 59–62. <https://doi.org/10.1136/bjo.82.1.59>
- Costache, C., Kalmár, Z., Colosi, H. A., Baciú, A. M., Opreș, R. V., Györke, A., & Colosi, I. A. (2020). First multilocus sequence typing (MLST) of *Giardia duodenalis* isolates from humans in Romania. *Parasites & Vectors*, 13(1), 387. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04248-2>

- Cotton, J. A., Bhargava, A., Ferraz, J. G., Yates, R. M., Beck, P. L., & Buret, A. G. (2014). *Giardia duodenalis* cathepsin B proteases degrade intestinal epithelial interleukin-8 and attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis. *Infection and Immunity*, 82(7), 2772–2787. <https://doi.org/10.1128/IAI.01771-14>
- Coyle, C. M., Varughese, J., Weiss, L. M., & Tanowitz, H. B. (2012). *Blastocystis*: to treat or not to treat... *Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54(1), 105–110. <https://doi.org/10.1093/cid/cir810>
- Dacal, E., Köster, P. C., & Carmena, D. (2020). Diagnóstico molecular de parasitosis intestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English ed.)*, 38 Suppl 1, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.02.005>
- Dacal, E., Saugar, J. M., de Lucio, A., Hernández-de-Mingo, M., Robinson, E., Köster, P. C., Aznar-Ruiz-de-Alegría, M. L., Espasa, M., Ninda, A., Gandasegui, J., Sulleiro, E., Moreno, M., Salvador, F., Molina, I., Rodríguez, E., & Carmena, D. (2018). Prevalence and molecular characterization of *Strongyloides stercoralis*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Blastocystis* spp. isolates in school children in Cubal, Western Angola. *Parasites & Vectors*, 11(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2640-z>
- Dado, D., Izquierdo, F., Vera, O., Montoya, A., Mateo, M., Fenoy, S., Galván, A. L., García, S., García, A., Aránguez, E., López, L., del Águila, C., & Miró, G. (2012a). Detection of zoonotic intestinal parasites in public parks of Spain. Potential epidemiological role of microsporidia. *Zoonoses and Public Health*, 59(1), 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2011.01411.x>
- Dado, D., Montoya, A., Blanco, M. A., Miró, G., Saugar, J. M., Bailo, B., & Fuentes, I. (2012b). Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* from dogs in Spain: possible zoonotic transmission and public health importance. *Parasitology Research*, 111(6), 2419–2422. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3100-x>
- Davids, B. J., & Gillin, F. D. (2011). Methods for *Giardia* culture, cryopreservation, encystation, and excystation in vitro. En S. Svärd & H. D. Lujan (Eds.), *Giardia a model organism* (pp. 381–394). Springer Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0198-8\\_23](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0198-8_23)

- De Boer, M. D., Schuurs, T. A., Vermeer, M., Ruijs, G. J. H. M., van der Zanden, A. G. M., Weel, J. F., & Bruijnesteijn van Coppenraet, L. E. S. (2020). Distribution and relevance of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* species in gastroenteritis: results from a case-control study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(1), 197–203. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03710-z>
- De Lucio, A., Amor-Aramendía, A., Bailo, B., Saugar, J. M., Anegagrie, M., Arroyo, A., López-Quintana, B., Zewdie, D., Ayehubizu, Z., Yizengaw, E., Abera, B., Yimer, M., Mulu, W., Hailu, T., Herrador, Z., Fuentes, I., & Carmena, D. (2016). Prevalence and genetic diversity of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. among school children in a rural area of the Amhara Region, North-West Ethiopia. *PloS One*, 11(7), e0159992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159992>
- De Lucio, A., Martínez-Ruiz, R., Merino, F. J., Bailo, B., Aguilera, M., Fuentes, I., & Carmena, D. (2015). Molecular genotyping of *Giardia duodenalis* isolates from symptomatic individuals attending two major public hospitals in Madrid, Spain. *PloS One*, 10(12), e0143981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143981>
- De Pablos, L. M., & Sotillo, J. (2021). *Parasite genomics: Methods and Protocols*. Humana.
- DeBurger, B. A., Hanna, S., & Mortensen, J. E. (2018). Evaluation of alternate parasite transport systems for the BD MAX™ enteric parasite panel. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 92(3), 204–205. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.06.003>
- Defaye, M., Nourrisson, C., Baudu, E., Lashermes, A., Meynier, M., Meleine, M., Wawrzyniak, I., Bonnin, V., Barbier, J., Chassaing, B., Godfraind, C., Gelot, A., Barnich, N., Ardid, D., Bonnet, M., Delbac, F., Carvalho, F. A., & Poirier, P. (2020). Fecal dysbiosis associated with colonic hypersensitivity and behavioral alterations in chronically *Blastocystis*-infected rats. *Scientific Reports*, 10(1), 9146. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66156-w>
- Del Coco, V. F., Molina, N. B., Basualdo, J. A., & Córdoba, M. A. (2017). *Blastocystis* spp.: avances, controversias y desafíos futuros. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.08.004>
- Delshad, A., Saraei, M., Alizadeh, S. A., Niaraki, S. R., Alipour, M., Hosseinbigi, B., Bozorgomid, A., & Hajjalilo, E. (2020). Distribution and molecular analysis of *Blastocystis* subtypes from gastrointestinal symptomatic and asymptomatic patients in Iran. *African Health Sciences*, 20(3), 1179–1189. <https://doi.org/10.4314/ahs.v20i3.21>

- Deng, L., & Tan, K. S. W. (2022). Interactions between *Blastocystis* subtype ST4 and gut microbiota in vitro. *Parasites & Vectors*, *15*(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05194-x>
- Deng, L., Tay, H., Peng, G., Lee, J. W. J., & Tan, K. S. W. (2021). Prevalence and molecular subtyping of *Blastocystis* in patients with *Clostridium difficile* infection, Singapore. *Parasites & Vectors*, *14*(1), 277. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04749-8>
- Di Cristanziano, V., D'Alfonso, R., Berrilli, F., Sarfo, F. S., Santoro, M., Fabeni, L., Knops, E., Heger, E., Kaiser, R., Dompok, A., Phillips, R. O., Norman, B., Feldt, T., & Eberhardt, K. A. (2019). Lower prevalence of *Blastocystis* sp. infections in HIV positive compared to HIV negative adults in Ghana. *PloS One*, *14*(9), e0221968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221968>
- Di Prisco, M. C., Hagel, I., Lynch, N. R., Jiménez, J. C., Rojas, R., Gil, M., & Mata, E. (1998). Association between giardiasis and allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, *81*(3), 261–265. [https://doi.org/10.1016/s1081-1206\(10\)62823-2](https://doi.org/10.1016/s1081-1206(10)62823-2)
- Diamond, L. S., Harlow, D. R., & Cunnick, C. C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *72*(4), 431–432. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(78\)90144-x](https://doi.org/10.1016/0035-9203(78)90144-x)
- Dogruman-Al, F., Dagci, H., Yoshikawa, H., Kurt, O., & Demirel, M. (2008). A possible link between subtype 2 and asymptomatic infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, *103*(3), 685–689. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1031-3>
- Dogruman-Al, F., Simsek, Z., Boorum, K., Ekici, E., Sahin, M., Tuncer, C., Kustimur, S., & Altinbas, A. (2010). Comparison of methods for detection of *Blastocystis* infection in routinely submitted stool samples, and also in IBS/IBD Patients in Ankara, Turkey. *PloS One*, *5*(11), e15484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015484>
- Dogruman-Al, F., Turk, S., Adiyaman-Korkmaz, G., Hananel, A., Levi, L., Kopelowitz, J., Babai, O., Gross, S., Greenberg, Z., Herschkovitz, Y., & Mumcuoglu, I. (2015). A novel ELISA test for laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in human stool specimens. *Parasitology Research*, *114*(2), 495–500. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4208-y>
- Domínguez-Márquez, M. V., Guna, R., Muñoz, C., Gómez-Muñoz, M. T., & Borrás, R. (2009). High prevalence of subtype 4 among isolates of *Blastocystis hominis* from symptomatic patients of a health district of Valencia (Spain). *Parasitology Research*, *105*(4), 949–955. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1485-y>

- Dougherty, M., & Bartelt, L. A. (2022). *Giardia* and growth impairment in children in high-prevalence settings: consequence or co-incidence?. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 35(5), 417–423. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000877>
- Dubourg, A., Xia, D., Winpenny, J. P., Al Naimi, S., Bouzid, M., Sexton, D. W., Wastling, J. M., Hunter, P. R., & Tyler, K. M. (2018). *Giardia* secretome highlights secreted tenascins as a key component of pathogenesis. *GigaScience*, 7(3), 1–13. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy003>
- Dunn, L. A., & Boreham, P. F. L. (1991). The in-vitro activity of drugs against *Blastocystis hominis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27(4), 507–516. <https://doi.org/10.1093/jac/27.4.507>
- Dunn, L., Boreham, P., & Stenzel, D. (1989). Ultrastructural variation of *Blastocystis hominis* stocks in culture. *International Journal for Parasitology*, 19(1), 43–56. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(89\)90020-9](https://doi.org/10.1016/0020-7519(89)90020-9)
- Dunn, N., & Juergens, A. L. (2024). Giardiasis. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513239/>
- Durviz. (s.f.). *Total-Fix: Concentración de parásitos intestinales*. Durviz. <https://durviz.com/total-fix-concentracion-de-parasitos-intestinales/>
- Dzierwa, K., Rubiś, P., Rudnicka-Sosin, L., Tekieli, L., & Pieniżek, P. (2016). Eosinophilic myocarditis: *Gardia lamblia* infestation and *Garcinia cambogia*–coincidence or causality? (RCD code:III-1B.1.o). *Journal of Rare Cardiovascular Diseases*, 2(7), 231–235.
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., & Svård, S. G. (2016). An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.07.019>
- El Basha, N. R., Zaki, M. M., Hassanin, O. M., Rehan, M. K., & Omran, D. (2016). *Giardia* assemblages a and b in diarrheic patients: A comparative study in Egyptian children and adults. *The Journal of Parasitology*, 102(1), 69–74. <https://doi.org/10.1645/14-676>
- El Safadi, D., Cian, A., Nourrisson, C., Pereira, B., Morelle, C., Bastien, P., Bellanger, A. P., Botterel, F., Candolfi, E., Desoubeaux, G., Lachaud, L., Morio, F., Pomares, C., Rabodonirina, M., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Gantois, N., Certad, G., Delhaes, L., Poirier, P., ... Viscogliosi, E. (2016). Prevalence, risk factors for infection and subtype distribution of the intestinal parasite *Blastocystis* sp. from a large-scale multi-center study in France. *BMC Infectious Diseases*, 16(1), 451. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1776-8>

- El Safadi, D., Gaayeb, L., Meloni, D., Cian, A., Poirier, P., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Dabboussi, F., Delhaes, L., Seck, M., Hamze, M., Riveau, G., & Viscogliosi, E. (2014). Children of Senegal River Basin show the highest prevalence of *Blastocystis* sp. ever observed worldwide. *BMC Infectious Diseases*, 14, 164. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-164>
- El-Gebaly, N. S., Halawa, E. F., Moussa, H. M., Rabia, I., & Abu-Zekry, M. (2012). Saliva and sera IgA and IgG in Egyptian *Giardia*-infected children. *Parasitology Research*, 111(2), 571–575. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2869-y>
- Elghareeb, A. S., Younis, M. S., El Fakahany, A. F., Nagaty, I. M., & Nagib, M. M. (2015). Laboratory diagnosis of *Blastocystis* spp. in diarrheic patients. *Tropical Parasitology*, 5(1), 36–41. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.149919>
- Elmendorf, H. G., Dawson, S. C., & McCaffery, J. M. (2003). The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *International Journal for Parasitology*, 33(1), 3–28. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00228-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00228-x)
- El-Nahas, H. A., Salem, D. A., El-Henawy, A. A., El-Nimr, H. I., Abdel-Ghaffar, H. A., & El-Meadawy, A. M. (2013). *Giardia* diagnostic methods in human fecal samples: a comparative study. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, 84(1), 44–49. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21048>
- Emery, S. J., Mirzaei, M., Vuong, D., Pascovici, D., Chick, J. M., Lacey, E., & Haynes, P. A. (2016). Induction of virulence factors in *Giardia duodenalis* independent of host attachment. *Scientific Reports*, 6, 20765. <https://doi.org/10.1038/srep20765>
- Falcone, A. C., Servián, A., Zonta, M. L., & Navone, G. T. (2023). *Blastocystis* sp. (parásito intestinal potencialmente patógeno). En J. M. Unzaga & M. L. Zonta (Eds.), *Protozoos parásitos de importancia sanitaria: un abordaje transdisciplinar* (pp. 176-182). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/155495>
- Farzam, A., Karampour, A., Nazem-Sadati, S. S., Sadat-Madani, P., & Asghari, A. (2025). Global prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in rodent populations: A systematic review and meta-analysis. *Veterinary medicine and science*, 11(1), e70178. <https://doi.org/10.1002/vms3.70178>
- Fayer, R., Elsasser, T., Gould, R., Solano, G., Urban, J., Jr, & Santin, M. (2014). *Blastocystis* tropism in the pig intestine. *Parasitology Research*, 113(4), 1465–1472. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3787-y>

- Fekete, E., Allain, T., Siddiq, A., Sosnowski, O., & Buret, A. G. (2021). *Giardia* spp. and the gut microbiota: Dangerous liaisons. *Frontiers in Microbiology*, 11, 618106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.618106>
- Fekete, E., Allain, T., Sosnowski, O., Anderson, S., Lewis, I. A., & Buret, A. G. (2024). *Giardia* spp.-induced microbiota dysbiosis disrupts intestinal mucin glycosylation. *Gut Microbes*, 16(1), 2412676. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2412676>
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 39(4), 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Feng, Y., & Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 110–140. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-10>
- Fernández, L. S., González, P. C., Flores, A. M., Marín, P. C., & García, P. A. (2022). Microscopy vs. molecular biology in the diagnosis of intestinal protozoal infections, is it time for a change? *Revista Española de Quimioterapia*, 36(1), 88–91. <https://doi.org/10.37201/req/088.2022>
- Ferrante, E., Valente, S., Corbo, G. M., Rumi, C., De Simone, C., & Ciappi, G. (1991). Marcata ipereosinofilia ematica da infestazione da *Giardia Lamblia* in un soggetto affetto da sindrome di Churg-Strauss [Marked hematic hypereosinophilia caused by *Giardia Lamblia* infestation in a subject with Churg-Strauss syndrome]. *Minerva Medica*, 82(10), 689–691.
- Figueiredo, A. M., Dashti, A., Maloney, J. G., Molokin, A., George, N. S., Köster, P. C., Bailo, B., de Las Matas, A. S., Habela, M. Á., Rivero-Juarez, A., Vicente, J., Serrano, E., Arnal, M. C., de Luco, D. F., Morrondo, P., Armenteros, J. A., Balseiro, A., Cardona, G. A., Martínez-Carrasco, C., Torres, R. T., ... Carmena, D. (2025). *Blastocystis* in free-ranging wild ruminant species across the Iberian Peninsula. *Veterinary Research*, 56(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s13567-025-01563-3>
- Figueiredo, A. M., Santín, M., Köster, P. C., Dashti, A., Maloney, J. G., Torres, R. T., Fonseca, C., Mysterud, A., Carvalho, J., Hipólito, D., Rossa, M., Palmeira, J. D., González-Barrio, D., Calero-Bernal, R., & Carmena, D. (2024). Molecular detection and characterization of *Blastocystis* in herbivore livestock species in Portugal. *Veterinary Parasitology*, 327, 110147. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110147>

- Filice, F. P. (1952). Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. In *University of California Press eBooks*. <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BA1897433X>
- Flores, C. F. Y., & Almachi, O. F. O. (2024). Diversidad genética de *Blastocystis* spp: actualización sobre su virulencia y patogenicidad. *Bionatura Journal*, 1(4), 1–15. <https://doi.org/10.70099/bj/2024.01.04.10>
- Forsell, J., Bengtsson-Palme, J., Angelin, M., Johansson, A., Evengård, B., & Granlund, M. (2017). The relation between *Blastocystis* and the intestinal microbiota in Swedish travellers. *BMC Microbiology*, 17(1), 231. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1139-7>
- Forsell, J., Granlund, M., Stensvold, C. R., Clark, C. G., & Evengård, B. (2012). Subtype analysis of *Blastocystis* isolates in Swedish patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(7), 1689–1696. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1416-6>
- Franklin, F., Rajamanikam, A., Raju, C. S., Gill, J. S., Francis, B., Sy-Cherng, L. W., & Kumar, S. (2022). Higher amoebic and metronidazole resistant forms of *Blastocystis* sp. seen in schizophrenic patients. *Parasites & Vectors*, 15(1), 313. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05418-0>
- Fusaro, C., Bernal, J. E., Baldiris-Ávila, R., González-Cuello, R., Cisneros-Lorduy, J., Reales-Ruiz, A., Castro-Orozco, R., & Sarria-Guzmán, Y. (2024). Molecular prevalence and subtypes distribution of *Blastocystis* spp. in humans of Latin America: A systematic review. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 9(2), 38. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9020038>
- Gabín-García, L. B., Bartolomé, C., Abal-Fabeiro, J. L., Méndez, S., Llovo, J., & Maside, X. (2017). Strong genetic structure revealed by multilocus patterns of variation in *Giardia duodenalis* isolates of patients from Galicia (NW-Iberian Peninsula). *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 48, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.014>
- Gabrielli, S., Furzi, F., Fontanelli Sulekova, L., Taliani, G., & Mattiucci, S. (2020). Occurrence of *Blastocystis*-subtypes in patients from Italy revealed association of ST3 with a healthy gut microbiota. *Parasite Epidemiology and Control*, 9, e00134. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00134>

- Gabrielli, S., Palomba, M., Furzi, F., Brianti, E., Gaglio, G., Napoli, E., Rinaldi, L., Alburqueque, R. A., & Mattiucci, S. (2021). Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolated from farmed animals in Southern Italy. *Microorganisms*, 9(8), 1656. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081656>
- Galán-Puchades, M. T., Gosálvez, C., Trelis, M., Gómez-Samblás, M., Solano-Parada, J., Osuna, A., Sáez-Durán, S., Bueno-Marí, R., & Fuentes, M. V. (2023). Parasite fauna and coinfections in urban rats naturally infected by the zoonotic parasite *Angiostrongylus cantonensis*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 13(1), 28. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010028>
- Garavelli, P. L., Scaglione, L., Bicocchi, R., & Libanore, M. (1991). Pathogenicity of *Blastocystis hominis*. *Infection*, 19(3), 185. <https://doi.org/10.1007/BF01643249>
- García-Cervantes, P. C., Báez-Flores, M. E., Delgado-Vargas, F., Ponce-Macotela, M., Nawa, Y., De-la-Cruz-Otero, M. D., Martínez-Gordillo, M. N., & Díaz-Camacho, S. P. (2017). *Giardia duodenalis* genotypes among schoolchildren and their families and pets in urban and rural areas of Sinaloa, Mexico. *Journal of Infection in Developing Countries*, 11(2), 180–187. <https://doi.org/10.3855/jidc.8223>
- García-R, J. C., Ogbuigwe, P., Pita, A. B., Velathanthiri, N., Knox, M. A., Biggs, P. J., French, N. P., & Hayman, D. T. S. (2021). First report of novel assemblages and mixed infections of *Giardia duodenalis* in human isolates from New Zealand. *Acta Tropica*, 220, 105969. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105969>
- García-Rodríguez, J. A., Martín-Sánchez, A. M., Canut Blasco, A., & García Luis, E. J. (1990). The prevalence of *Cryptosporidium* species in children in day care centres and primary schools in Salamanca (Spain): an epidemiological study. *European Journal of Epidemiology*, 6(4), 432–435. <https://doi.org/10.1007/BF00151721>
- García-Sancho M. (2010). A new insight into Sanger's development of sequencing: from proteins to DNA, 1943-1977. *Journal of the History of Biology*, 43(2), 265–323. <https://doi.org/10.1007/s10739-009-9184-1>
- Garg, P., Chetwood, J., Phan, T., Gray, T., & McKew, G. (2024). A tale of two studies: is peripheral eosinophilia associated with *Dientamoeba fragilis* detection in adult stool samples?. *Pathology*, 56(5), 688–695. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2024.01.011>

- Gargantini, P. R., Serradell, M. D. C., Ríos, D. N., Tenaglia, A. H., & Luján, H. D. (2016). Antigenic variation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Current Opinion in Microbiology*, 32, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.017>
- Gelaneu, T., Lalle, M., Hailu, A., Pozio, E., & Cacciò, S. M. (2007). Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Tropica*, 102(2), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.04.003>
- Gerbaba, T. K., Gupta, P., Rioux, K., Hansen, D., & Buret, A. G. (2015). *Giardia duodenalis*-induced alterations of commensal bacteria kill *Caenorhabditis elegans*: a new model to study microbial-microbial interactions in the gut. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308(6), G550–G561. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00335.2014>
- Ghafari-Cherati, M., Karampour, A., Nazem-Sadati, S. S., & Asghari, A. (2024). Foodborne concerns of *Blastocystis* spp. in marine animals (fish, bivalves, and sponges): A systematic review and meta-analysis of global prevalence and subtypes distribution. *Food and Waterborne Parasitology*, 36, e00242. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2024.e00242>
- Gil, H., Cano, L., de Lucio, A., Bailo, B., de Mingo, M. H., Cardona, G. A., Fernández-Basterra, J. A., Aramburu-Aguirre, J., López-Molina, N., & Carmena, D. (2017). Detection and molecular diversity of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheltered dogs and cats in Northern Spain. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 50, 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.02.013>
- Goñi, P., Aldana, D. E., Clavel, A., Seral, C., Remacha, M. A., & Castillo, F. J. (2010). Prevalencia de *Giardia duodenalis* genotipo B en humanos en Zaragoza y León, España [Prevalence of *Giardia duodenalis* assemblage B in humans in Zaragoza and León, Spain]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(10), 710–712. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.04.010>
- Gonzalez-Arenas, N. R., Villalobos, G., Vargas-Sanchez, G. B., Avalos-Galarza, C. A., Marquez-Valdelamar, L. M., Ramirez-Miranda, M. E., Olivo-Diaz, A., Romero-Valdovinos, M., Martinez-Hernandez, F., & Maravilla, P. (2018). Is the genetic variability of Cathepsin B important in the pathogenesis of *Blastocystis* spp.?. *Parasitology Research*, 117(12), 3935–3943. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6103-4>

- González-Moreno, O., Domingo, L., Teixidor, J., & Gracenea, M. (2011). Prevalence and associated factors of intestinal parasitisation: a cross-sectional study among outpatients with gastrointestinal symptoms in Catalonia, Spain. *Parasitology Research*, *108*(1), 87–93. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2044-2>
- Govind, S. K., Khairul, A. A., & Smith, H. V. (2002). Multiple reproductive processes in *Blastocystis*. *Trends in Parasitology*, *18*(12), 528. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02402-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02402-9)
- Goyal, N., & Shukla, G. (2013). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates the mucosal immune response in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. *Digestive Diseases and Sciences*, *58*(5), 1218–1225. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2503-y>
- Gray, T. J., Kwan, Y. L., Phan, T., Robertson, G., Cheong, E. Y., & Gottlieb, T. (2013). *Dientamoeba fragilis*: a family cluster of disease associated with marked peripheral eosinophilia. *Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *57*(6), 845–848. <https://doi.org/10.1093/cid/cit389>
- Greige, S., El Safadi, D., Bécu, N., Gantois, N., Pereira, B., Chabé, M., Benamrouz-Vanneste, S., Certad, G., El Hage, R., Chemaly, M., Hamze, M., & Viscogliosi, E. (2018). Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. isolates from poultry in Lebanon and evidence of zoonotic potential. *Parasites & Vectors*, *11*(1), 389. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2975-5>
- Gulhan, B., Aydin, M., Demirkazik, M., Koltas, I. S., Cikman, A., Turkmen, K., & Duran, T. (2020). Subtype distribution and molecular characterization of *Blastocystis* from hemodialysis patients in Turkey. *Journal of Infection in Developing Countries*, *14*(12), 1448–1454. <https://doi.org/10.3855/jidc.12650>
- Hagen, K. D., Hart, C. J. S., McNally, S. G., & Dawson, S. C. (2024). Harnessing the power of new genetic tools to illuminate *Giardia* biology and pathogenesis. *Genetics*, *227*(2), iyae038. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyae038>
- Hagen, K. D., McNally, S. G., Hilton, N. D., & Dawson, S. C. (2020). Microtubule organelles in *Giardia*. *Advances in Parasitology*, *107*, 25–96. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.11.001>
- Haidar, A., & De Jesus, O. (2023). *Entamoeba coli* Infection. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564412/>

- Hajare, S. T., Chekol, Y., & Chauhan, N. M. (2022). Assessment of prevalence of *Giardia lamblia* infection and its associated factors among government elementary school children from Sidama zone, SNNPR, Ethiopia. *PloS One*, 17(3), e0264812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264812>
- Halliez, M. C., & Buret, A. G. (2013). Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World Journal of Gastroenterology*, 19(47), 8974–8985. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i47.8974>
- Haque, R., Mondal, D., Karim, A., Molla, I. H., Rahim, A., Faruque, A. S., Ahmad, N., Kirkpatrick, B. D., Houpt, E., Snider, C., & Petri, W. A., Jr (2009). Prospective case-control study of the association between common enteric protozoal parasites and diarrhea in Bangladesh. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48(9), 1191–1197. <https://doi.org/10.1086/597580>
- Hawash Y. (2014). DNA extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for diagnostic PCR. *The Korean Journal of Parasitology*, 52(3), 263–271. <https://doi.org/10.3347/kjp.2014.52.3.263>
- Hernández, P. C., Morales, L., Chaparro-Olaya, J., Sarmiento, D., Jaramillo, J. F., Ordoñez, G. A., Cortés, F., & Sánchez, L. K. (2019). Intestinal parasitic infections and associated factors in children of three rural schools in Colombia. A cross-sectional study. *PloS One*, 14(7), e0218681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218681>
- Hernández-Castro, C., Dashti, A., Vusirikala, A., Balasegaram, S., Köster, P. C., Bailo, B., Imaña, E., López, A., Llorente, M. T., González-Barrío, D., Sánchez, S., & Carmena, D. (2023b). Prevalence and temporal dynamics of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Blastocystis* sp. among toddlers attending day-care centres in Spain. A prospective molecular-based longitudinal study. *European Journal of Pediatrics*, 182(1), 213–223. <https://doi.org/10.1007/s00431-022-04662-x>
- Hernández-Castro, C., Maloney, J. G., Agudelo-López, S. P., Toro-Londoño, M. A., Botero-Garcés, J. H., Orozco, M. C., Quintero-Quinchia, Y. C., Correa-Cote, J. C., Múnera-Duque, A., Ricaurte-Ciro, J. C., Londoño-Álvarez, L. I., Escobar, R. M., Köster, P. C., Sánchez, S., Carmena, D., & Santín, M. (2023a). Identification and validation of novel *Blastocystis* subtype ST41 in a Colombian patient undergoing colorectal cancer screening. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 70(5), e12978. <https://doi.org/10.1111/jeu.12978>
- Herráez, Á. (2012). *Biología molecular e ingeniería genética: Texto ilustrado e interactivo*. Elsevier España. <https://biomodel.uah.es/texto/index.htm>

- Higuera, A., Herrera, G., Jimenez, P., García-Corredor, D., Pulido-Medellín, M., Bulla-Castañeda, D. M., Pinilla, J. C., Moreno-Pérez, D. A., Maloney, J. G., Santín, M., & Ramírez, J. D. (2021). Identification of multiple *Blastocystis* subtypes in domestic animals from Colombia using amplicon-based next generation sequencing. *Frontiers in veterinary science*, 8, 732129. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.732129>
- Higuera, A., Villamizar, X., Herrera, G., Giraldo, J. C., Vasquez-A, L. R., Urbano, P., Villalobos, O., Tovar, C., & Ramírez, J. D. (2020). Molecular detection and genotyping of intestinal protozoa from different biogeographical regions of Colombia. *PeerJ*, 8, e8554. <https://doi.org/10.7717/peerj.8554>
- Hillman, A., Ash, A., Elliot, A., Lymbery, A., Perez, C., & Thompson, R. C. A. (2016). Confirmation of a unique species of *Giardia*, parasitic in the quenda (*Isoodon obesulus*). *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*, 5(1), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.01.002>
- Holberton, D., Baker, D. A., & Marshall, J. (1988). Segmented alpha-helical coiled-coil structure of the protein giardin from the *Giardia* cytoskeleton. *Journal of Molecular Biology*, 204(3), 789–795. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(88\)90370-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(88)90370-1)
- Homan, W. L., & Mank, T. G. (2001). Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *International Journal for Parasitology*, 31(8), 822–826. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00183-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00183-7)
- Hoque, M. E., Hope, V. T., Scragg, R., Kjellström, T., & Lay-Yee, R. (2001). Nappy handling and risk of giardiasis. *Lancet (London, England)*, 357(9261), 1017–1018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04251-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04251-3)
- Hu, K. C., Lin, C. C., Wang, T. E., Liu, C. Y., Chen, M. J., & Chang, W. H. (2008). Amoebic liver abscess or is it?. *Gut*, 57(5), 627–683. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.119149>
- Humbert, P., Guichard, A., Bennani, I., & Chiheb, S. (2017). *Giardia duodenalis* et son implication dans diverses dermatoses [*Giardia duodenalis* and its involvement in skin diseases]. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*, 144(11), 676–684. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2017.08.002>

- Hussein, E. M., Muhammad, M. A. A., Hussein, A. M., Elzagawy, S. M., Zaki, W. M., Temsah, A. G., Badr, M. S., & Alabbassy, M. M. (2023). Levels of Genetic Variants Among Symptomatic *Blastocystis* Subtypes and their Relationship to Mucosal Immune Surveillance in the Precancerous Colons of Experimentally Infected Rats. *Acta Parasitologica*, 68(1), 70–83. <https://doi.org/10.1007/s11686-022-00628-z>
- Iguchi, A., Yoshikawa, H., Yamada, M., Kimata, I., & Arizono, N. (2009). Expression of interferon gamma and proinflammatory cytokines in the cecal mucosa of rats experimentally infected with *Blastocystis* sp. strain RN94-9. *Parasitology Research*, 105(1), 135–140. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1373-5>
- Inpankaew, T., Schär, F., Odermatt, P., Dalsgaard, A., Chimnoi, W., Khieu, V., Muth, S., & Traub, R. J. (2014). Low risk for transmission of zoonotic *Giardia duodenalis* from dogs to humans in rural Cambodia. *Parasites & Vectors*, 7, 412. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-412>
- Jadallah, K. A., Nimri, L. F., & Ghanem, R. A. (2017). Protozoan parasites in irritable bowel syndrome: A case-control study. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(4), 201–207. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i4.201>
- Janarthanan, S., Khoury, N., & Antaki, F. (2011). An unusual case of invasive *Blastocystis hominis* infection. *Endoscopy*, 43 Suppl 2 UCTN, E185–E186. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1256322>
- Javanmard, E., Niyiyati, M., Ghasemi, E., Mirjalali, H., Asadzadeh Aghdai, H., & Zali, M. R. (2018). Impacts of human development index and climate conditions on prevalence of *Blastocystis*: A systematic review and meta-analysis. *Acta Tropica*, 185, 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.05.014>
- Jerlström-Hultqvist, J., Ankarklev, J., & Svärd, S. G. (2010b). Is human giardiasis caused by two different *Giardia* species?. *Gut Microbes*, 1(6), 379–382. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.6.13608>
- Jerlström-Hultqvist, J., Franzén, O., Ankarklev, J., Xu, F., Nohýnková, E., Andersson, J. O., Svärd, S. G., & Andersson, B. (2010a). Genome analysis and comparative genomics of a *Giardia intestinalis* assemblage E isolate. *BMC Genomics*, 11, 543. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-543>
- Jiménez, P. A., Jaimes, J. E., & Ramírez, J. D. (2019). A summary of *Blastocystis* subtypes in North and South America. *Parasites & Vectors*, 12(1), 376. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3641-2>

- Jiménez, P., Muñoz, M., & Ramírez, J. D. (2022). An update on the distribution of *Blastocystis* subtypes in the Americas. *Heliyon*, 8(12), e12592. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12592>
- Jiménez-Cardoso, E., Eligio-García, L., Cortés-Campos, A., Flores-Luna, A., Valencia-Mayoral, P., & Lozada-Chávez, I. (2009). Changes in beta-giardin sequence of *Giardia intestinalis* sensitive and resistant to albendazole strains. *Parasitology Research*, 105(1), 25–33. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1363-7>
- Jinatham, V., Maxamhud, S., Popluechai, S., Tsaousis, A. D., & Gentekaki, E. (2021). *Blastocystis* one health approach in a rural community of Northern Thailand: Prevalence, subtypes and novel transmission routes. *Frontiers in Microbiology*, 12, 746340. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.746340>
- Jones, M. S., 2nd, Ganac, R. D., Hiser, G., Hudson, N. R., Le, A., & Whipps, C. M. (2008). Detection of *Blastocystis* from stool samples using real-time PCR. *Parasitology Research*, 103(3), 551–557. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1006-4>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kaczmarek, A., Gołąb, E., Żarnowska-Prymek, H., Rawska, A., Jańczak, D., Lewicki, A., Wesółowska, M., Rozej-Bielicka, W., Cielecka, D., & Sałamatin, R. (2017). Genetic diversity of *Blastocystis hominis* sensu lato isolated from humans in Poland. *Przegląd Epidemiologiczny*, 71(4), 539–546.
- Karamati, S. A., Mirjalali, H., Niyati, M., Yadegar, A., Asadzadeh Aghdaei, H., Haghighi, A., & Seyyed Tabaei, S. J. (2021). Association of *Blastocystis* ST6 with higher protease activity among symptomatic subjects. *BMC Microbiology*, 21(1), 285. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02341-9>
- Kaya, F., İnkaya, A. Ç., Aksoy, S., Abbasoğlu, O., Ertentli, A. İ., Büyükaşık, Y., Arıkan Akdağlı, S., Akyön, Y., & Ergüven, S. (2021). Investigation of Intestinal Protozoon Prevalence in Immunocompromised Patients at a University Hospital. Bir Üniversite Hastanesinde İmmünsüpresif Hastalardaki İntestinal Protozoon Prevalansının Araştırılması. *Türkiye Parazitolojii Dergisi*, 45(1), 39–44. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2020.6819>

- Kaya, S., Cetin, E. S., Aridoğan, B. C., Arıkan, S., & Demirci, M. (2007). Pathogenicity of *Blastocystis hominis*, a clinical reevaluation. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(3), 184–187.
- Ken Dror, S., Pavlotzky, E., & Barak, M. (2016). Evaluation of the NanoCHIP® Gastrointestinal Panel (GIP) Test for simultaneous detection of parasitic and bacterial enteric pathogens in fecal specimens. *PloS One*, 11(7), e0159440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159440>
- Khaled, S., Gantois, N., Ly, A. T., Senghor, S., Even, G., Dautel, E., Dejager, R., Sawant, M., Baydoun, M., Benamrouz-Vanneste, S., Chabé, M., Ndiaye, S., Schacht, A. M., Certad, G., Riveau, G., & Viscogliosi, E. (2020). Prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in Senegalese School Children. *Microorganisms*, 8(9), 1408. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091408>
- Khorshidvand, Z., Khazaei, S., Amiri, M., Taherkhani, H., & Mirzaei, A. (2021). Worldwide prevalence of emerging parasite *Blastocystis* in immunocompromised patients: A systematic review and meta-analysis. *Microbial Pathogenesis*, 152, 104615. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104615>
- Klotz, C., Sannella, A. R., Weisz, F., Chaudhry, U., Sroka, J., Tůmová, P., Nohýnková, E., Ignatius, R., Aebischer, T., Betson, M., Troell, K., & Cacciò, S. M. (2022). Extensive testing of a multi-locus sequence typing scheme for *Giardia duodenalis* assemblage A confirms its good discriminatory power. *Parasites & Vectors*, 15(1), 489. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05615-x>
- Koehler, A. V., Herath, H. M. P. D., Hall, R. S., Wilcox, S., & Gasser, R. B. (2023). Marked genetic diversity within *Blastocystis* in Australian wildlife revealed using a next generation sequencing-phylogenetic approach. *International Journal for Parasitology. Parasites and Wildlife*, 23, 100902. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.100902>
- Kooyman, F. N. J., Wagenaar, J. A., & Zomer, A. (2019). Whole-genome sequencing of dog-specific assemblages C and D of *Giardia duodenalis* from single and pooled cysts indicates host-associated genes. *Microbial Genomics*, 5(12), e000302. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000302>
- Kosik-Bogacka, D., Lepczyńska, M., Kot, K., Szkup, M., Łanocha-Arendarczyk, N., Dzika, E., & Grochans, E. (2021). Prevalence, subtypes and risk factors of *Blastocystis* spp. infection among pre- and perimenopausal women. *BMC Infectious Diseases*, 21(1), 1125. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06815-z>

- Köster, P. C., Dashti, A., Bailo, B., Muadica, A. S., Maloney, J. G., Santín, M., Chicharro, C., Migueláñez, S., Nieto, F. J., Cano-Terriza, D., García-Bocanegra, I., Guerra, R., Ponce-Gordo, F., Calero-Bernal, R., González-Barrio, D., & Carmena, D. (2021b). Occurrence and genetic diversity of protist parasites in captive non-human primates, zookeepers, and free-living sympatric rats in the Córdoba zoo conservation centre, Southern Spain. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 11(3), 700. <https://doi.org/10.3390/ani11030700>
- Köster, P. C., Dashti, A., Reh, L., Bailo, B., Hernández-De-Mingo, M., Muadica, A. S., & Carmena, D. (2021a). Molecular detection and genotyping of enteric protists in asymptomatic schoolchildren and their legal guardians in Madrid, Spain. *Parasitologia*, 1(2), 83–94. <https://www.mdpi.com/2673-6772/1/2/10>
- Köster, P. C., Figueiredo, A. M., Maloney, J. G., Dashti, A., Bailo, B., Torres, R. T., Fonseca, C., Mysterud, A., Habela, M. Á., Rivero-Juarez, A., Vicente, J., Serrano, E., Arnal, M. C., de Luco, D. F., Armenteros, J. A., Balseiro, A., Cardona, G. A., Carvalho, J., Hipólito, D., Fernandes, J., ... Carmena, D. (2024). *Blastocystis* occurrence and subtype diversity in European wild boar (*Sus scrofa*) from the Iberian Peninsula. *Veterinary Research*, 55(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s13567-024-01385-9>
- Köster, P. C., Martínez-Nevado, E., González, A., Abelló-Poveda, M. T., Fernández-Bellon, H., de la Riva-Fraga, M., Marquet, B., Guéry, J. P., Knauf-Witzens, T., Weigold, A., Dashti, A., Bailo, B., Imaña, E., Muadica, A. S., González-Barrio, D., Ponce-Gordo, F., Calero-Bernal, R., & Carmena, D. (2022). Intestinal protists in captive non-human primates and their handlers in six european zoological gardens. Molecular evidence of zoonotic transmission. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 819887. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.819887>
- Kosuwin, R., Putaporntip, C., Pattanawong, U., & Jongwutiwes, S. (2010). Clonal diversity in *Giardia duodenalis* isolates from Thailand: evidences for intragenic recombination and purifying selection at the beta giardin locus. *Gene*, 449(1-2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.09.010>
- Krogsgaard, L. R., Engsbro, A. L., Stensvold, C. R., Nielsen, H. V., & Bytzer, P. (2015). The prevalence of intestinal parasites is not greater among individuals with irritable bowel syndrome: a population-based case-control study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology : the Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 13(3), 507–513.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.07.065>

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumarasamy, V., Anbazhagan, D., Subramaniyan, V., & Vellasamy, S. (2018). *Blastocystis* sp., parasite associated with gastrointestinal disorders: An overview of its pathogenesis, immune modulation and therapeutic strategies. *Current Pharmaceutical Design*, 24(27), 3172–3175. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180807101536b>
- Künstler, J. (1882). Sur cinq Protozoaires parasites nouveaux. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 95(7), 347-349.
- Kwon, J. Y., Choi, J. H., Lee, H. I., Ju, J. W., & Lee, M. R. (2024). Molecular prevalence of *Blastocystis* sp. from patients with diarrhea in the Republic of Korea. *Microorganisms*, 12(3), 523. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030523>
- La Fe – Hospital Universitari i Politècnic. (H.U.P. La Fe) (s.f.). *Departamento de Salud Valencia La Fe*. Conselleria de Sanidad. <http://www.lafe.san.gva.es/departamento-de-salud-valencia-la-fe>
- Lagunas-Rangel, F. A., & Bermúdez-Cruz, R. M. (2019). Epigenetics in the early divergent eukaryotic *Giardia duodenalis*: An update. *Biochimie*, 156, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.008>
- Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., & Cacciò, S. M. (2005). Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *International Journal for Parasitology*, 35(2), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.022>
- Lambl, W. (1859). *Mikroskopische Untersuchungen der Darm-Excrete : Beitrag zur Pathologie des Darms und zur Diagnostik am Krankenbette*. <https://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/frontdoor/index/index/year/2010/docId/14619>
- Lanuza, M. D., Carbajal, J. A., Villar, J., & Borrás, R. (1997). Description of an improved method for *Blastocystis hominis* culture and axenization. *Parasitology Research*, 83(1), 60–63. <https://doi.org/10.1007/s004360050209>
- Lavier, G. (1923). Sur deux espèces nouvelles du genre *Giardia* : *G. viscaciae* de la viscache (*Viscacia viscacia*) et *G. varani* du varan (*Varanus niloticus*). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 1(2), 147–154. <https://doi.org/10.1051/parasite/1923012147>

- Lebbad, M., Mattsson, J. G., Christensson, B., Ljungström, B., Backhans, A., Andersson, J. O., & Svärd, S. G. (2010). From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Veterinary Parasitology*, 168(3-4), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.003>
- Lecová, L., Tůmová, P., & Nohýnková, E. (2019). Clone-based haplotyping of *Giardia intestinalis* assemblage B human isolates. *Parasitology Research*, 118(1), 355–361. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6161-7>
- Lehto, K. M., Fan, Y. M., Oikarinen, S., Nurminen, N., Hallamaa, L., Juuti, R., Mangani, C., Maleta, K., Hyöty, H., & Ashorn, P. (2019). Presence of *Giardia lamblia* in stools of six- to 18-month old asymptomatic Malawians is associated with children's growth failure. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 108(10), 1833–1840. <https://doi.org/10.1111/apa.14832>
- Lepczyńska, M., Białkowska, J., Dzika, E., Piskorz-Ogórek, K., & Korycińska, J. (2017). *Blastocystis*: how do specific diets and human gut microbiota affect its development and pathogenicity?. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 36(9), 1531–1540. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-2965-0>
- Lepczyńska, M., Chen, W. C., & Dzika, E. (2016). Mysterious chronic urticaria caused by *Blastocystis* spp.?. *International Journal of Dermatology*, 55(3), 259–266. <https://doi.org/10.1111/ijd.13064>
- Leung, A. K. C., Leung, A. A. M., Wong, A. H. C., Sergi, C. M., & Kam, J. K. M. (2019). Giardiasis: An overview. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 13(2), 134–143. <https://doi.org/10.2174/1872213X13666190618124901>
- Lhotská, Z., Jirků, M., Hložková, O., Brožová, K., Jirsová, D., Stensvold, C. R., Kolísko, M., & Jirků Pomajbíková, K. (2020). A study on the prevalence and subtype diversity of the intestinal protist *Blastocystis* sp. in a gut-healthy human population in the Czech Republic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 544335. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.544335>
- Li, J., Deng, T., Li, X., Cao, G., Li, X., & Yan, Y. (2013). A rat model to study *Blastocystis* subtype 1 infections. *Parasitology Research*, 112(10), 3537–3541. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3536-7>

- Li, J., Wang, Z., Karim, M. R., & Zhang, L. (2020). Detection of human intestinal protozoan parasites in vegetables and fruits: a review. *Parasites & Vectors*, 13(1), 380. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04255-3>
- Li, M., Gong, J., Cottrill, M., Yu, H., de Lange, C., Burton, J., & Topp, E. (2003). Evaluation of QIAamp DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. *Journal of Microbiological Methods*, 54(1), 13–20. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(02\)00260-9](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(02)00260-9)
- Liao, C. C., Chen, C. H., Shin, J. W., Lin, W. C., Chen, C. C., & Chu, C. T. (2023). Lipid accumulation in *Blastocystis* increases cell damage in co-cultured cells. *Microorganisms*, 11(6), 1582. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061582>
- Lim, M. X., Png, C. W., Tay, C. Y., Teo, J. D., Jiao, H., Lehming, N., Tan, K. S., & Zhang, Y. (2014). Differential regulation of proinflammatory cytokine expression by mitogen-activated protein kinases in macrophages in response to intestinal parasite infection. *Infection and Immunity*, 82(11), 4789–4801. <https://doi.org/10.1128/IAI.02279-14>
- Lipoldová M. (2014). *Giardia* and Vilém Dušan Lamb. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5), e2686. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002686>
- Liu, J., Fu, Z., Hellman, L., & Svärd, S. G. (2019). Cleavage specificity of recombinant *Giardia intestinalis* cysteine proteases: Degradation of immunoglobulins and defensins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 227, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.10.004>
- Liu, J., Ma'ayeh, S., Peirasmaki, D., Lundström-Stadelmann, B., Hellman, L., & Svärd, S. G. (2018). Secreted *Giardia intestinalis* cysteine proteases disrupt intestinal epithelial cell junctional complexes and degrade chemokines. *Virulence*, 9(1), 879–894. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1451284>
- Long, H. Y., Handschack, A., König, W., & Ambrosch, A. (2001). *Blastocystis hominis* modulates immune responses and cytokine release in colonic epithelial cells. *Parasitology Research*, 87(12), 1029–1030. <https://doi.org/10.1007/s004360100494>
- Longo, M. C., Berninger, M. S., & Hartley, J. L. (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene*, 93(1), 125–128. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90145-h](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90145-h)

- Lorenzo-Rebenaque, L., López-Fernández, S., Marco-Jiménez, F., Montoro-Dasi, L., Marin, C., Vega, S., Martínez-Manzanares, E., & Fariñas, F. (2023). Zoonotic parasites in playgrounds in Southern Spain: A one health approach. *Microorganisms*, 11(3), 721. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030721>
- Lucía, J. F., Aguilar, C., & Betran, A. (2007). *Blastocystis hominis* colitis in a haemophilic patient as a cause of lower gastrointestinal bleeding. *Haemophilia : the Official Journal of the World Federation of Hemophilia*, 13(2), 224–225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2006.01434.x>
- Lyu, Z., Shao, J., Xue, M., Ye, Q., Chen, B., Qin, Y., & Wen, J. (2018). A new species of *Giardia* Künstler, 1882 (Sarcocystidophora: Hexamitidae) in hamsters. *Parasites & Vectors*, 11(1), 202. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2786-8>
- Ma, L., Qiao, H., Wang, H., Li, S., Zhai, P., Huang, J., & Guo, Y. (2020). Molecular prevalence and subtypes of *Blastocystis* sp. in primates in Northern China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(6), 2789–2796. <https://doi.org/10.1111/tbed.13644>
- Maas, L., Dorigo-Zetsma, J. W., de Groot, C. J., Bouter, S., Plötz, F. B., & van Ewijk, B. E. (2014). Detection of intestinal protozoa in paediatric patients with gastrointestinal symptoms by multiplex real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection : the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(6), 545–550. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12386>
- Ma'ayeh, S. Y., & Brook-Carter, P. T. (2012). Representational difference analysis identifies specific genes in the interaction of *Giardia duodenalis* with the murine intestinal epithelial cell line, IEC-6. *International Journal for Parasitology*, 42(5), 501–509. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.04.004>
- Ma'ayeh, S. Y., Knörr, L., & Svärd, S. G. (2015). Transcriptional profiling of *Giardia intestinalis* in response to oxidative stress. *International Journal for Parasitology*, 45(14), 925–938. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.07.005>
- Ma'ayeh, S. Y., Liu, J., Peirasmaki, D., Hörnaeus, K., Bergström Lind, S., Grabherr, M., Bergquist, J., & Svärd, S. G. (2017). Characterization of the *Giardia intestinalis* secretome during interaction with human intestinal epithelial cells: The impact on host cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), e0006120. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006120>

- Macarasin, D., O'Brien, C., Fayer, R., Bauchan, G., & Jenkins, M. (2012). Immunolocalization of  $\beta$ - and  $\delta$ -giardin within the ventral disk in trophozoites of *Giardia duodenalis* using multiplex laser scanning confocal microscopy. *Parasitology Research*, 111(1), 241–248. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2825-x>
- Mahdavi, F., Sadrebazzaz, A., Chahardehi, A. M., Badali, R., Omidian, M., Hassanipour, S., & Asghari, A. (2022). Global epidemiology of *Giardia duodenalis* infection in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *International Health*, 14(1), 5–17. <https://doi.org/10.1093/inthealth/ihab026>
- Maloney, J. G., & Santin, M. (2021). Mind the Gap: New Full-Length Sequences of *Blastocystis* Subtypes Generated via Oxford Nanopore Minion Sequencing Allow for Comparisons between Full-Length and Partial Sequences of the Small Subunit of the Ribosomal RNA Gene. *Microorganisms*, 9(5), 997. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050997>
- Maloney, J. G., da Cunha, M. J. R., Molokin, A., Cury, M. C., & Santin, M. (2021a). Next-generation sequencing reveals wide genetic diversity of *Blastocystis* subtypes in chickens including potentially zoonotic subtypes. *Parasitology Research*, 120(6), 2219–2231. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07170-3>
- Maloney, J. G., Jang, Y., Molokin, A., George, N. S., & Santin, M. (2021b). Wide Genetic Diversity of *Blastocystis* in White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) from Maryland, USA. *Microorganisms*, 9(6), 1343. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061343>
- Maloney, J. G., Lombard, J. E., Urie, N. J., Shivley, C. B., & Santin, M. (2019b). Zoonotic and genetically diverse subtypes of *Blastocystis* in US pre-weaned dairy heifer calves. *Parasitology Research*, 118(2), 575–582. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6149-3>
- Maloney, J. G., Molokin, A., & Santin, M. (2019a). Next generation amplicon sequencing improves detection of *Blastocystis* mixed subtype infections. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 73, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.013>
- Maloney, J. G., Molokin, A., & Santin, M. (2020b). Use of Oxford Nanopore MinION to generate full-length sequences of the *Blastocystis* small subunit (SSU) rRNA gene. *Parasites & Vectors*, 13(1), 595. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04484-6>

- Maloney, J. G., Molokin, A., da Cunha, M. J. R., Cury, M. C., & Santin, M. (2020a). *Blastocystis* subtype distribution in domestic and captive wild bird species from Brazil using next generation amplicon sequencing. *Parasite Epidemiology and Control*, 9, e00138. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00138>
- Maloney, J. G., Molokin, A., Seguí, R., Maravilla, P., Martínez-Hernández, F., Villalobos, G., Tsaousis, A. D., Gentekaki, E., Muñoz-Antolí, C., Klisiowicz, D. R., Oishi, C. Y., Toledo, R., Esteban, J. G., Köster, P. C., de Lucio, A., Dashti, A., Bailo, B., Calero-Bernal, R., González-Barrio, D., Carmena, D., ... Santín, M. (2022). Identification and molecular characterization of four new *Blastocystis* subtypes designated ST35-ST38. *Microorganisms*, 11(1), 46. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010046>
- Manzardo, C., Treviño, B., Gómez i Prat, J., Cabezos, J., Monguí, E., Clavería, I., Luis Del Val, J., Zabaleta, E., Zarzuela, F., & Navarro, R. (2008). Communicable diseases in the immigrant population attended to in a tropical medicine unit: epidemiological aspects and public health issues. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 6(1-2), 4-11. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2007.11.002>
- Marangi, M., Boughattas, S., De Nittis, R., Pisanelli, D., Delli Carri, V., Lipsi, M. R., La Bella, G., Serviddio, G., Niglio, M., Lo Caputo, S., Margaglione, M., & Arena, F. (2023). Prevalence and genetic diversity of *Blastocystis* sp. among autochthonous and immigrant patients in Italy. *Microbial Pathogenesis*, 185, 106377. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106377>
- Marchiori, E., Bono, L., Voltan, L., Dotto, G., Tessarin, C., & Marcer, F. (2024). Gastrointestinal parasites in non-human primates in zoological gardens in Northern Italy. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 14(17), 2607. <https://doi.org/10.3390/ani14172607>
- Marcos, L. A., & Gotuzzo, E. (2013). Intestinal protozoan infections in the immunocompromised host. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 26(4), 295-301. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283630be3>
- Maritz, J. M., Eyck, T. a. T., Alter, S. E., & Carlton, J. M. (2019). Patterns of protist diversity associated with raw sewage in New York City. *The ISME Journal*, 13(11), 2750-2763. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0467-z>
- Martínez-Díaz, R. A., Sansano-Maestre, J., Martínez-Herrero, M.delC., Ponce-Gordo, F., & Gómez-Muñoz, M. T. (2011). Occurrence and genetic characterization of *Giardia duodenalis* from captive nonhuman primates by multi-locus sequence analysis. *Parasitology Research*, 109(3), 539-544. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2281-z>

- Matadamas-Martínez, F., Noguera-Torres, B., Castillo, R., Hernández-Campos, A., Barrera-Valdes, M. L., León-Ávila, G., Hernández, J. M., & Yépez-Mulia, L. (2020). Characterisation of the in vitro activity of a Nitazoxanide-N-methyl-1H-benzimidazole hybrid molecule against albendazole and nitazoxanide susceptible and resistant strains of *Giardia intestinalis* and its in vivo giardicidal activity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115, e190348. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190348>
- Mateo, M., Mateo, M., Montoya, A., Bailo, B., Saugar, J. M., Aguilera, M., Fuentes, I., & Carmena, D. (2014). Detection and molecular characterization of *Giardia duodenalis* in children attending day care centers in Majadahonda, Madrid, Central Spain. *Medicine*, 93(15), e75. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000075>
- Matovelle, C., Quílez, J., Tejedor, M. T., Beltrán, A., Chueca, P., & Monteagudo, L. V. (2024). Subtype distribution of *Blastocystis* spp. in patients with gastrointestinal symptoms in Northern Spain. *Microorganisms*, 12(6), 1084. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061084>
- Matovelle, C., Tejedor, M. T., Monteagudo, L. V., Beltrán, A., & Quílez, J. (2022). Prevalence and associated factors of *Blastocystis* sp. infection in patients with gastrointestinal symptoms in Spain: A Case-Control Study. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(9), 226. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7090226>
- Mattiucci, S., Crisafi, B., Gabrielli, S., Paoletti, M., & Cancrini, G. (2016). Molecular epidemiology and genetic diversity of *Blastocystis* infection in humans in Italy. *Epidemiology and Infection*, 144(3), 635–646. <https://doi.org/10.1017/S0950268815001697>
- Mei, X., Wei, L., Su, C., Yang, Z., Tian, X., Zhang, Z., & Wang, S. (2024). Advances in the axenic isolation methods of *Blastocystis* sp. and their applications. *Parasitology*, 151(2), 125–134. <https://doi.org/10.1017/S0031182023001300>
- Mejia, R., Damania, A., Jeun, R., Bryan, P. E., Vargas, P., Juarez, M., Cajal, P. S., Nasser, J., Krolewiecki, A., Lefoulon, E., Long, C., Drake, E., Cimino, R. O., & Slatko, B. (2020). Impact of intestinal parasites on microbiota and cobalamin gene sequences: a pilot study. *Parasites & Vectors*, 13(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04073-7>
- Melo, G. B., Roldan, W., Malta, F. M., Lescano, S. A. Z., Castilho, V. L., Gonçalves, E. M. D. N., Paula, F. M., & Gryscek, R. C. B. (2020). Culture isolation and molecular identification of *Blastocystis* sp. in Brazilian human isolates: preliminary results. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 62, e51. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202062051>

- Meloni, D., Sanciu, G., Poirier, P., El Alaoui, H., Chabé, M., Delhaes, L., Dei-Cas, E., Delbac, F., Luigi Fiori, P., Di Cave, D., & Viscogliosi, E. (2011). Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. isolates from symptomatic patients in Italy. *Parasitology Research*, 109(3), 613–619. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2294-7>
- Menounos, P. G., Spanakos, G., Tegos, N., Vassalos, C. M., Papadopoulou, C., & Vakalis, N. C. (2008). Direct detection of *Blastocystis* sp. in human faecal samples and subtype assignment using single strand conformational polymorphism and sequencing. *Molecular and Cellular Probes*, 22(1), 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.06.007>
- Messa, A., Jr, Köster, P. C., Garrine, M., Gilchrist, C., Bartelt, L. A., Nhampossa, T., Massora, S., Kotloff, K., Levine, M. M., Alonso, P. L., Carmena, D., & Mandomando, I. (2021). Molecular diversity of *Giardia duodenalis* in children under 5 years from the Manhiça district, Southern Mozambique enrolled in a matched case-control study on the aetiology of diarrhoea. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(1), e0008987. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008987>
- Meyer E. A. (1970). Isolation and axenic cultivation of *Giardia* trophozoites from the rabbit, chinchilla, and cat. *Experimental Parasitology*, 27(2), 179–183. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(70\)90023-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(70)90023-8)
- Minetti, C., Lamden, K., Durband, C., Cheesbrough, J., Fox, A., & Wastling, J. M. (2015). Determination of *Giardia duodenalis* assemblages and multi-locus genotypes in patients with sporadic giardiasis from England. *Parasites & Vectors*, 8, 444. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1059-z>
- Mirsepasi, H., Persson, S., Struve, C., Andersen, L. O., Petersen, A. M., & Krogfelt, K. A. (2014). Microbial diversity in fecal samples depends on DNA extraction method: easyMag DNA extraction compared to QIAamp DNA stool mini kit extraction. *BMC Research Notes*, 7, 50. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-50>
- Mirza, H., & Tan, K. S. (2009). *Blastocystis* exhibits inter- and intra-subtype variation in cysteine protease activity. *Parasitology Research*, 104(2), 355–361. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1203-1>
- Mirza, H., Wu, Z., Kidwai, F., & Tan, K. S. (2011). A metronidazole-resistant isolate of *Blastocystis* spp. is susceptible to nitric oxide and downregulates intestinal epithelial inducible nitric oxide synthase by a novel parasite survival mechanism. *Infection and Immunity*, 79(12), 5019–5026. <https://doi.org/10.1128/IAI.05632-11>

- Mirza, H., Wu, Z., Teo, J. D., & Tan, K. S. (2012). Statin pleiotropy prevents rho kinase-mediated intestinal epithelial barrier compromise induced by *Blastocystis* cysteine proteases. *Cellular Microbiology*, 14(9), 1474–1484. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01814.x>
- Moe, K. T., Singh, M., Howe, J., Ho, L. C., Tan, S. W., Ng, G. C., Chen, X. Q., & Yap, E. H. (1996). Observations on the ultrastructure and viability of the cystic stage of *Blastocystis hominis* from human feces. *Parasitology Research*, 82(5), 439–444. <https://doi.org/10.1007/s004360050142>
- Mohammad Rahimi, H., Karamati, S. A., Nemati, S., Mirjalali, H., & Zali, M. R. (2022b). Molecular identification, subtypes distribution, and alleles discrimination of *Blastocystis* sp., isolated from immunocompromised subjects in Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 17(2), 184–193. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v17i2.9534>
- Mohammad Rahimi, H., Yadegar, A., Asadzadeh Aghdaei, H., Mirjalali, H., & Zali, M. R. (2022a). Modulation of microRNAs and claudin-7 in Caco-2 cell line treated with *Blastocystis* sp., subtype 3 soluble total antigen. *BMC Microbiology*, 22(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02528-8>
- Mohammadpour, I., Bozorg-Ghalati, F., Gazzonis, A. L., Manfredi, M. T., Motazedian, M. H., & Mohammadpour, N. (2020). First molecular subtyping and phylogeny of *Blastocystis* sp. isolated from domestic and synanthropic animals (dogs, cats and brown rats) in southern Iran. *Parasites & Vectors*, 13(1), 365. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04225-9>
- Momčilović, S., Cantacessi, C., Arsić-Arsenijević, V., Otranto, D., & Tasić-Otašević, S. (2019). Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs. *Clinical Microbiology and Infection : the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(3), 290–309. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.028>
- Moniot, M., Nourrisson, C., Bailly, E., Lambert, C., Combes, P., & Poirier, P. (2024). Current status of intestinal parasitosis and microsporidiosis in industrialized countries: Results from a prospective study in France and Luxembourg. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 18(12), e0012752. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012752>
- Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G., & Ey, P. L. (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 16(9), 1135–1144. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026204>

- Monis, P. T., Caccio, S. M., & Thompson, R. C. (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology*, 25(2), 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.11.006>
- Moreno-Mesonero, L., Amorós, I., Moreno, Y., & Alonso, J. (2022). Simultaneous detection of less frequent waterborne parasitic protozoa in reused wastewater using amplicon sequencing and qPCR techniques. *Journal of Environmental Management*, 314, 115029. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115029>
- Moreno-Mesonero, L., Soler, L., Amorós, I., Moreno, Y., Ferrús, M. A., & Alonso, J. L. (2023). Protozoan parasites and free-living amoebae contamination in organic leafy green vegetables and strawberries from Spain. *Food and Waterborne Parasitology*, 32, e00200. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2023.e00200>
- Moreno-Mesonero, L., Soler, P., Alonso, J., Macián, V., & Moreno, Y. (2024). Assessment of pathogenic protozoa in a drinking water treatment plant with UV treatment. *Journal of Environmental Management*, 366, 121897. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121897>
- Muadica, A. S., Köster, P. C., Dashti, A., Bailo, B., Hernández-de-Mingo, M., Reh, L., Balasegaram, S., Verlander, N. Q., Ruiz Chércoles, E., & Carmena, D. (2020). Molecular diversity of *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. and *Blastocystis* sp. in asymptomatic school children in Leganés, Madrid (Spain). *Microorganisms*, 8(4), 466. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040466>
- Mülayim, S., Aykur, M., Dağcı, H., Dalkılıç, S., Aksoy, A., & Kaplan, M. (2021). Investigation of isolated *Blastocystis* subtypes from cancer patients in Turkey. *Acta Parasitologica*, 66(2), 584–592. <https://doi.org/10.1007/s11686-020-00322-y>
- Muñoz-Antoli, C., Irisarri-Gutiérrez, M. J., Acosta, L., Bonet, M. J., Esteban, J. G., & Toledo, R. (2023). Intestinal parasitic infections and their potential risk factors among prison inmates in Valencia, Spain. *BMC Infectious Diseases*, 23(1), 616. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08613-1>
- Muñoz Gutiérrez, J., Aldasoro, E., Requena, A., Comin, A. M., Pinazo, M. J., Bardají, A., Oliveira, I., Valls, M. E., & Gascon, J. (2013). Refractory giardiasis in Spanish travellers. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 11(2), 126–129. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2012.10.004>

- Munsaka, G., Hayashida, K., Mubemba, B., Simulundu, E., Mulunda, N., Pule, R., Sianongo, S., Makuluni, M., Muleya, W., Changula, K., Chitanga, S., & Mutengo, M. (2022). Molecular subtyping of *Blastocystis* sp. detected in patients at a large tertiary referral hospital in Lusaka, Zambia. *Frontiers in Parasitology*, 1, 1033485. <https://doi.org/10.3389/fpara.2022.1033485>
- Nabarro, L. E., Lever, R. A., Armstrong, M., & Chiodini, P. L. (2015). Increased incidence of nitroimidazole-refractory giardiasis at the Hospital for Tropical Diseases, London: 2008-2013. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(8), 791–796. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.04.019>
- Naguib, D., Gantois, N., Desramaut, J., Dominguez, R. G., Arafat, N., Atwa, S. M., Even, G., Devos, D. P., Certad, G., Chabé, M., & Viscogliosi, E. (2024). Large-scale molecular epidemiological survey of *Blastocystis* sp. among herbivores in Egypt and assessment of potential zoonotic risk. *Microorganisms*, 12(7), 1286. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071286>
- Nash, T. E., Herrington, D. A., Levine, M. M., Conrad, J. T., & Merritt, J. W., Jr (1990). Antigenic variation of *Giardia lamblia* in experimental human infections. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 144(11), 4362–4369.
- Nassir, E., Awad, J., Abel, A. B., Khoury, J., Shay, M., & Lejbkowitz, F. (2004). *Blastocystis hominis* as a cause of hypoalbuminemia and anasarca. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 23(5), 399–402. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1122-8>
- Nemati, S., Falahati Anbaran, M., Mohammad Rahimi, H., Hosseini, M. S., Aghaei, S., Khalili, N., Mirjalali, H., & Zali, M. R. (2021a). Evolutionary and phylogenetic analyses of the barcoding region suggest geographical relationships among *Blastocystis* sp., ST3 in humans. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 96, 105151. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105151>
- Nemati, S., Zali, M. R., Johnson, P., Mirjalali, H., & Karanis, P. (2021b). Molecular prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in Asia and in Australia. *Journal of Water and Health*, 19(5), 687–704. <https://doi.org/10.2166/wh.2021.011>
- Nenoff, P., Domula, E., Willing, U., & Herrmann, J. (2006). *Giardia lamblia*--Ursache von Urtikaria und Pruritus oder zufällige Assoziation? [*Giardia lamblia*--cause of urticaria and pruritus or accidental association?]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 57(6), 518–522. <https://doi.org/10.1007/s00105-005-0959-9>

- Nguyen, L. D. N., Gantois, N., Hoang, T. T., Do, B. T., Desramaut, J., Naguib, D., Tran, T. N., Truong, A. D., Even, G., Certad, G., Chabé, M., & Viscogliosi, E. (2023). First Epidemiological Survey on the Prevalence and Subtypes Distribution of the Enteric Parasite *Blastocystis* sp. in Vietnam. *Microorganisms*, 11(3), 731. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030731>
- Noradilah, S. A., Lee, I. L., Anuar, T. S., Salleh, F. M., Manap, S. N. A., Husnie, N. S., Azrul, S. M., & Moktar, N. (2017). *Blastocystis* spp. Contaminated water sources in aboriginal settlements. *Tropical Biomedicine*, 34(1), 110–117. [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/Noradilah\\_et\\_al.,\\_2017/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/Noradilah_et_al.,_2017/)
- Nourrisson, C., Scanzi, J., Pereira, B., NkoudMongo, C., Wawrzyniak, I., Cian, A., Viscogliosi, E., Livrelli, V., Delbac, F., Dapoigny, M., & Poirier, P. (2014). *Blastocystis* is associated with decrease of fecal microbiota protective bacteria: comparative analysis between patients with irritable bowel syndrome and control subjects. *PLoS One*, 9(11), e111868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111868>
- Nourrisson, C., Wawrzyniak, I., Cian, A., Livrelli, V., Viscogliosi, E., Delbac, F., & Poirier, P. (2016). On *Blastocystis* secreted cysteine proteases: a legumain-activated cathepsin B increases paracellular permeability of intestinal Caco-2 cell monolayers. *Parasitology*, 143(13), 1713–1722. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001396>
- Ocaña-Losada, C., Cuenca-Gómez, J. A., Cabezas-Fernández, M. T., Vázquez-Villegas, J., Soriano-Pérez, M. J., Cabeza-Barrera, I., & Salas-Coronas, J. (2018). Clinical and epidemiological characteristics of intestinal parasite infection by *Blastocystis hominis*. Características clínicas y epidemiológicas de la parasitación intestinal por *Blastocystis hominis*. *Revista Clínica Española*, 218(3), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2018.01.003>
- Öncü Öner, T., Karabey, M., Can, H., Değirmenci Döşkaya, A., Karakavuk, M., Gül, A., Köseoğlu, A. E., Döşkaya, M., Ün, C., Gürüz, A. Y., Kaya, S., Pektaş, B., & Aksoy Gökmen, A. (2022). Molecular investigation of *Blastocystis* sp. and its subtypes in cancer patients under chemotherapy in Aegean region, Turkey. *Acta Tropica*, 233, 106577. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106577>
- Organización Mundial de la Salud (OMS) [World Health Organization (WHO)] (2017). *Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum*. WHO. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>.

- Ortega-Pierres, G., Argüello-García, R., Laredo-Cisneros, M. S., Fonseca-Linán, R., Gómez-Mondragón, M., Inzunza-Arroyo, R., Flores-Benítez, D., Raya-Sandino, A., Chavez-Munguía, B., Ventura-Gallegos, J. L., Zentella-Dehesa, A., Bermúdez-Cruz, R. M., & González-Mariscal, L. (2018). Giardipain-1, a protease secreted by *Giardia duodenalis* trophozoites, causes junctional, barrier and apoptotic damage in epithelial cell monolayers. *International Journal for Parasitology*, 48(8), 621–639. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.01.006>
- Ortega-Pierres, M. G., & Argüello-García, R. (2019). *Giardia duodenalis*: Role of secreted molecules as virulent factors in the cytotoxic effect on epithelial cells. *Advances in Parasitology*, 106, 129–169. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.07.003>
- Ortiz Arduan, A., Castrillo, J. M., Carreira, J., López Cubero, L., Miranda, R., & Jiménez Casado, M. (1990). Gastroenteritis con eosinofilia por *Giardia lamblia* [Gastroenteritis with eosinophilia caused by *Giardia lamblia*]. *Revista Clínica Española*, 187(2), 68–70.
- Osorio-Pulgarin, M. I., Higuera, A., Beltran-Álzate, J. C., Sánchez-Jiménez, M., & Ramírez, J. D. (2021). Epidemiological and molecular characterization of *Blastocystis* infection in children attending daycare centers in Medellín, Colombia. *Biology*, 10(7), 669. <https://doi.org/10.3390/biology10070669>
- Padukone, S., Mandal, J., Rajkumari, N., Bhat, B. V., Swaminathan, R. P., & Parija, S. C. (2018). Detection of *Blastocystis* in clinical stool specimens using three different methods and morphological examination in Jones' medium. *Tropical Parasitology*, 8(1), 33–40. [https://doi.org/10.4103/tp.TP\\_4\\_18](https://doi.org/10.4103/tp.TP_4_18)
- Paget, T. A., Kelly, M. L., Jarroll, E. L., Lindmark, D. G., & Lloyd, D. (1993). The effects of oxygen on fermentation in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 57(1), 65–71. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90244-r](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90244-r)
- Palasuwan, A., Palasuwan, D., Mahittikorn, A., Chiabchalard, R., Combes, V., & Popruk, S. (2016). Subtype Distribution of *Blastocystis* in communities along the Chao Phraya River, Thailand. *The Korean Journal of Parasitology*, 54(4), 455–460. <https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.4.455>
- Parés, D., Comas, M., Dorcaratto, D., Araujo, M. I., Vial, M., Bohle, B., Pera, M., & Grande, L. (2009). Adaptation and validation of the Bristol scale stool form translated into the Spanish language among health professionals and patients. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 101(5), 312–316. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082009000500002>

- Park, J. H., Schofield, P. J., & Edwards, M. R. (1998). *Giardia intestinalis*: characterization of a NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Experimental Parasitology*, *88*(2), 131–138. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4199>
- Parkar, U., Traub, R. J., Vitali, S., Elliot, A., Levecke, B., Robertson, I., Geurden, T., Steele, J., Drake, B., & Thompson, R. C. (2010). Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology*, *169*(1-2), 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.032>
- Paulos, S., Köster, P. C., de Lucio, A., Hernández-de-Mingo, M., Cardona, G. A., Fernández-Crespo, J. C., Stensvold, C. R., & Carmena, D. (2018). Occurrence and subtype distribution of *Blastocystis* sp. in humans, dogs and cats sharing household in northern Spain and assessment of zoonotic transmission risk. *Zoonoses and Public Health*, *65*(8), 993–1002. <https://doi.org/10.1111/zph.12522>
- Paulos, S., Saugar, J. M., de Lucio, A., Fuentes, I., Mateo, M., & Carmena, D. (2019). Comparative performance evaluation of four commercial multiplex real-time PCR assays for the detection of the diarrhoea-causing protozoa *Cryptosporidium hominis*/parvum, *Giardia duodenalis* and *Entamoeba histolytica*. *PLoS One*, *14*(4), e0215068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215068>
- Pennell, R. G., & Kurtz, A. B. (1989). Fetal intrathoracic and gastrointestinal anomalies. *Clinics in diagnostic ultrasound*, *25*, 111–138.
- Petersen, A. M., Stensvold, C. R., Mirsepasi, H., Engberg, J., Friis-Møller, A., Porsbo, L. J., Hammerum, A. M., Nordgaard-Lassen, I., Nielsen, H. V., & Krogfelt, K. A. (2013). Active ulcerative colitis associated with low prevalence of *Blastocystis* and *Dientamoeba fragilis* infection. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *48*(5), 638–639. <https://doi.org/10.3109/00365521.2013.780094>
- Phillips, B. P., & Zierdt, C. H. (1976). *Blastocystis hominis*: pathogenic potential in human patients and in gnotobiontes. *Experimental Parasitology*, *39*(3), 358–364. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(76\)90039-4](https://doi.org/10.1016/0014-4894(76)90039-4)

- Piperni, E., Nguyen, L. H., Manghi, P., Kim, H., Pasolli, E., Andreu-Sánchez, S., Arrè, A., Bermingham, K. M., Blanco-Míguez, A., Manara, S., Valles-Colomer, M., Bakker, E., Busonero, F., Davies, R., Fiorillo, E., Giordano, F., Hadjigeorgiou, G., Leeming, E. R., Lobina, M., Masala, M., ... Asnicar, F. (2024). Intestinal *Blastocystis* is linked to healthier diets and more favorable cardiometabolic outcomes in 56,989 individuals from 32 countries. *Cell*, 187(17), 4554–4570.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.06.018>
- Piubelli, C., Soleymanpoor, H., Giorli, G., Formenti, F., Buonfrate, D., Bisoffi, Z., & Perandin, F. (2019). *Blastocystis* prevalence and subtypes in autochthonous and immigrant patients in a referral centre for parasitic infections in Italy. *PLoS One*, 14(1), e0210171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210171>
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Albert, A., El Alaoui, H., Delbac, F., & Livrelli, V. (2011). Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection and quantification of *Blastocystis* parasites in human stool samples: prospective study of patients with hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 975–983. <https://doi.org/10.1128/JCM.01392-10>
- Poirier, P., Wawrzyniak, I., Vivarès, C. P., Delbac, F., & El Alaoui, H. (2012). New insights into *Blastocystis* spp.: a potential link with irritable bowel syndrome. *PLoS Pathogens*, 8(3), e1002545. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002545>
- Popruk, S., Adao, D. E. V., & Rivera, W. L. (2021). Epidemiology and subtype distribution of *Blastocystis* in humans: A review. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 95, 105085. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.105085>
- Popruk, S., Koompapong, K., Mahittikorn, A., Andersen, L. O., & Stensvold, C. R. (2024). Cats and dogs as hosts of *Blastocystis* - What is the evidence?. *Veterinary Parasitology*, 332, 110325. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110325>
- Poulsen, C. S., & Stensvold, C. R. (2016). Systematic review on *Endolimax nana*: A less well studied intestinal ameba. *Tropical Parasitology*, 6(1), 8–29. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.175077>
- Puthia, M. K., Lu, J., & Tan, K. S. (2008). *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells in an NF-kappaB-dependent manner. *Eukaryotic Cell*, 7(3), 435–443. <https://doi.org/10.1128/EC.00371-07>

- Puthia, M. K., Sio, S. W., Lu, J., & Tan, K. S. (2006). *Blastocystis ratti* induces contact-independent apoptosis, F-actin rearrangement, and barrier function disruption in IEC-6 cells. *Infection and Immunity*, 74(7), 4114–4123. <https://doi.org/10.1128/IAI.00328-06>
- Puthia, M. K., Vaithilingam, A., Lu, J., & Tan, K. S. (2005). Degradation of human secretory immunoglobulin A by *Blastocystis*. *Parasitology Research*, 97(5), 386–389. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-1461-0>
- Quezada-Lázaro, R., Vázquez-Cobix, Y., Fonseca-Liñán, R., Nava, P., Hernández-Cueto, D. D., Cedillo-Peláez, C., López-Vidal, Y., Huerta-Yepez, S., & Ortega-Pierres, M. G. (2022). The cysteine protease Giardipain-1 from *Giardia duodenalis* contributes to a disruption of intestinal homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13649. <https://doi.org/10.3390/ijms232113649>
- Rafiei, A., Baghlaninezhad, R., Köster, P. C., Bailo, B., Hernández de Mingo, M., Carmena, D., Panabad, E., & Beiromvand, M. (2020). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in Southwestern Iran. A community survey. *PLoS One*, 15(2), e0228317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228317>
- Ragavan, N. D., Govind, S. K., Chye, T. T., & Mahadeva, S. (2014). Phenotypic variation in *Blastocystis* sp. ST3. *Parasites & Vectors*, 7, 404. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-404>
- Rajah Salim, H., Suresh Kumar, G., Vellayan, S., Mak, J. W., Khairul Anuar, A., Init, I., Vennila, G. D., Saminathan, R., & Ramakrishnan, K. (1999). *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitology Research*, 85(12), 1032–1033. <https://doi.org/10.1007/s004360050677>
- Rajamanikam, A., & Govind, S. K. (2013). Amoebic forms of *Blastocystis* spp. - evidence for a pathogenic role. *Parasites & Vectors*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-295>
- Rajamanikam, A., Hooi, H. S., Kudva, M., Samudi, C., & Govind, S. K. (2022). Distinct Phenotypic Variation of *Blastocystis* sp. ST3 from Urban and Orang Asli Population-An Influential Consideration during Sample Collection in Surveys. *Biology*, 11(8), 1211. <https://doi.org/10.3390/biology11081211>
- Rajamanikam, A., Isa, M. N. M., Samudi, C., Devaraj, S., & Govind, S. K. (2023). Gut bacteria influence *Blastocystis* sp. phenotypes and may trigger pathogenicity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 17(3), e0011170. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011170>

- Ramírez, J. D., Sánchez, A., Hernández, C., Flórez, C., Bernal, M. C., Giraldo, J. C., Reyes, P., López, M. C., García, L., Cooper, P. J., Vicuña, Y., Mongi, F., & Casero, R. D. (2016). Geographic distribution of human *Blastocystis* subtypes in South America. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 41, 32–35. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.017>
- Ramírez, J. D., Sánchez, L. V., Bautista, D. C., Corredor, A. F., Flórez, A. C., & Stensvold, C. R. (2014). *Blastocystis* subtypes detected in humans and animals from Colombia. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 22, 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.07.020>
- Ramo, A., Del Cacho, E., Sánchez-Acedo, C., & Quílez, J. (2017). Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in raw and finished drinking water in north-eastern Spain. *The Science of the Total Environment*, 580, 1007–1013. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.055>
- Rauff-Adedotun, A. A., Mohd Zain, S. N., & Farah Haziqah, M. T. (2020). Current status of *Blastocystis* sp. in animals from Southeast Asia: a review. *Parasitology Research*, 119(11), 3559–3570. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06828-8>
- Read, C. M., Monis, P. T., & Thompson, R. C. (2004). Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 4(2), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.02.001>
- Read, C., Walters, J., Robertson, I. D., & Thompson, R. C. (2002). Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *International Journal for Parasitology*, 32(2), 229–231. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00340-x](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00340-x)
- Real life-science solutions. (s.f.). *REAL Mini-System.- Parasite transport, preservation & concentration system - Real Laboratory.* Real Laboratory. <https://reallaboratory.com/product/real-mini-system/>
- Reboredo-Fernández, A., Ares-Mazás, E., Cacciò, S. M., & Gómez-Couso, H. (2015). Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). *Parasitology*, 142(7), 917–925. <https://doi.org/10.1017/S0031182015000049>

- Rego, L., Castro-Scholten, S., Cano, C., Jiménez-Martín, D., Köster, P. C., Caballero-Gómez, J., Bailo, B., Dashti, A., Hernández-Castro, C., Cano-Terriza, D., Vioque, F., Maloney, J. G., Santín, M., García-Bocanegra, I., Carmena, D., & González-Barrio, D. (2023). Iberian wild leporidae as hosts of zoonotic enteroparasites in Mediterranean ecosystems of Southern Spain. *Zoonoses and Public Health*, 70(3), 223–237. <https://doi.org/10.1111/zph.13018>
- Rehena, J., Harun, A. B., & Karim, M. R. (2025). Epidemiology of *Blastocystis* in farm animals: A review. *Veterinary Parasitology*, 334, 110382. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110382>
- Rene, B. A., Stensvold, C. R., Badsberg, J. H., & Nielsen, H. V. (2009). Subtype analysis of *Blastocystis* isolates from *Blastocystis* cyst excreting patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(4), 588–592.
- Rezaei Riabi, T., Mirjalali, H., Haghighi, A., Rostami Nejad, M., Pourhoseingholi, M. A., Poirier, P., Delbac, F., Wawrzyniak, I., & Zali, M. R. (2018). Genetic diversity analysis of *Blastocystis* subtypes from both symptomatic and asymptomatic subjects using a barcoding region from the 18S rRNA gene. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 61, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.026>
- Ringqvist, E., Palm, J. E., Skarin, H., Hehl, A. B., Weiland, M., Davids, B. J., Reiner, D. S., Griffiths, W. J., Eckmann, L., Gillin, F. D., & Svärd, S. G. (2008). Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 159(2), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2008.02.005>
- RITCHIE L. S. (1948). An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bulletin of the U.S. Army Medical Department. United States. Army. Medical Department*, 8(4), 326.
- Robaei, D., Vo-Robaei, L., Bewes, T., Terkasher, B., & Pitney, M. (2014). Myocarditis in association with *Giardia intestinalis* infection. *International Journal of Cardiology*, 177(3), e142–e144. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.09.050>
- Roberts, T., Stark, D., Harkness, J., & Ellis, J. (2014). Update on the pathogenic potential and treatment options for *Blastocystis* sp. *Gut Pathogens*, 6, 17. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-17>
- Robertson, L. J., Forberg, T., Hermansen, L., Gjerde, B. K., & Langeland, N. (2007). Molecular characterisation of *Giardia* isolates from clinical infections following a waterborne outbreak. *The Journal of Infection*, 55(1), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2007.02.001>

- Rodríguez, O. L., Hagel, I., González, Y., Roque, M. E., Vásquez, N., López, E., & Di Prisco, M. C. (2004). Secretory IgA antibody responses in Venezuelan children infected with *Giardia duodenalis*. *Journal of Tropical Pediatrics*, 50(2), 68–72. <https://doi.org/10.1093/tropej/50.2.68>
- Rodríguez-Walker, M., Molina, C. R., Luján, L. A., Saura, A., Jerlström-Hultqvist, J., Svärd, S. G., Fernández, E. A., & Luján, H. D. (2022). Comprehensive characterization of Cysteine-rich protein-coding genes of *Giardia lamblia* and their role during antigenic variation. *Genomics*, 114(5), 110462. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110462>
- Ruang-Areerate, T., Piyaraj, P., Suwannahitatorn, P., Ruang-Areerate, P., Thita, T., Naaglor, T., Witee, U., Sakboonyarat, B., Leelayoova, S., & Mungthin, M. (2021). Zoonotic Transmission of *Blastocystis* Subtype 1 among people in eastern communities of Thailand: Organic fertilizer from pig feces as a potential source. *Microbiology Spectrum*, 9(2), e0036221. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00362-21>
- Rudzińska, M., & Sikorska, K. (2023). Epidemiology of *Blastocystis* Infection: A review of data from Poland in relation to other reports. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(8), 1050. <https://doi.org/10.3390/pathogens12081050>
- Rudzińska, M., Kowalewska, B., Kurpas, M., & Szostakowska, B. (2022). Rare occurrence of *Blastocystis* in pet animals and their owners in the Pomeranian Voivodeship in Poland in the light of literature data. *Journal of Clinical Medicine*, 11(11), 2975. <https://doi.org/10.3390/jcm11112975>
- Rudzińska, M., Kowalewska, B., Wąż, P., Sikorska, K., & Szostakowska, B. (2019). *Blastocystis* subtypes isolated from travelers and non-travelers from the north of Poland - A single center study. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 75, 103926. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103926>
- Ruenchit P. (2021). State-of-the-Art Techniques for diagnosis of medical parasites and arthropods. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(9), 1545. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11091545>
- Ryan, U. M., Feng, Y., Fayer, R., & Xiao, L. (2021). Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* - a 50 year perspective (1971-2021). *International Journal for Parasitology*, 51(13-14), 1099–1119. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.08.007>

- Ryan, U., & Cacciò, S. M. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 43(12-13), 943–956. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.001>
- Ryckman, M., Gantois, N., Dominguez, R. G., Desramaut, J., Li, L. L., Even, G., Audebert, C., Devos, D. P., Chabé, M., Certad, G., Monchy, S., & Viscogliosi, E. (2024). Molecular Identification and subtype analysis of *Blastocystis* sp. isolates from wild mussels (*Mytilus edulis*) in Northern France. *Microorganisms*, 12(4), 710. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040710>
- Sahagún, J., Clavel, A., Goñi, P., Seral, C., Llorente, M. T., Castillo, F. J., Capilla, S., Arias, A., & Gómez-Lus, R. (2008). Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 27(1), 81–83. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0404-3>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The *Neighbor-joining* method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Salazar-Sánchez, R. S., Ascuña-Durand, K., Ballón-Echegaray, J., Vásquez-Huerta, V., Martínez-Barrios, E., & Castillo-Neyra, R. (2020). Socio-demographic determinants associated with *Blastocystis* infection in Arequipa, Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(2), 700–707. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0631>
- Salinas, J. L., & Vildozola Gonzales, H. (2007). Infección por *Blastocystis*. *Revista de Gastroenterología del Peru : Organo Oficial de la Sociedad de Gastroenterología del Peru*, 27(3), 264–274. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1022-51292007000300007&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1022-51292007000300007&script=sci_arttext&tlng=es)
- Salvador, F., Lobo, B., Goterris, L., Alonso-Cotoner, C., Santos, J., Sulleiro, E., Bailo, B., Carmena, D., Sánchez-Montalvá, A., Bosch-Nicolau, P., Espinosa-Pereiro, J., Fuentes, I., & Molina, I. (2021). *Blastocystis* sp. carriage and irritable bowel syndrome: is the association already established?. *Biology*, 10(4), 340. <https://doi.org/10.3390/biology10040340>
- Sánchez, A., Munoz, M., Gómez, N., Tabares, J., Segura, L., Salazar, Á., Restrepo, C., Ruíz, M., Reyes, P., Qian, Y., Xiao, L., López, M. C., & Ramírez, J. D. (2017). Molecular epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among indigenous children from the Colombian Amazon Basin. *Frontiers in Microbiology*, 8, 248. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00248>

- Sanchez-Thevenet, P., Carmena, D., Adell-Aledón, M., Dacal, E., Arias, E., Saugar, J. M., Rodríguez, E., & Dea-Ayuela, M. A. (2019). High Prevalence and diversity of zoonotic and other intestinal parasites in dogs from eastern Spain. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 19(12), 915–922. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2468>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sanpool, O., Laoraksawong, P., Janwan, P., Intapan, P. M., Sawanyawisuth, K., Thanchomnang, T., Changtrakul, Y., & Maleewong, W. (2015). Genetic subtypes of *Blastocystis* isolated from thai hospitalized patients in northeastern Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 46(2), 184–190.
- Santin, M., Figueiredo, A., Molokin, A., George, N. S., Köster, P. C., Dashti, A., González-Barrio, D., Carmena, D., & Maloney, J. G. (2024). Division of *Blastocystis* ST10 into three new subtypes: ST42-ST44. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 71(1), e12998. <https://doi.org/10.1111/jeu.12998>
- Santín, M., Gómez-Muñoz, M. T., Solano-Aguilar, G., & Fayer, R. (2011). Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitology Research*, 109(1), 205–212. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2244-9>
- Santos, H. L., Sodr e, F. C., & de Macedo, H. W. (2014). *Blastocystis* sp. in splenic cysts: causative agent or accidental association? A unique case report. *Parasites & Vectors*, 7, 207. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-207>
- Sardinha-Silva, A., Gazzinelli-Guimaraes, P. H., Ajakaye, O. G., Ferreira, T. R., Alves-Ferreira, E. V. C., Tjhin, E. T., Gregg, B., Fink, M. Y., Coelho, C. H., Singer, S. M., & Grigg, M. E. (2024). *Giardia intestinalis* reshapes mucosal immunity toward a Type 2 response that attenuates inflammatory bowel-like diseases. *bioRxiv : the Preprint Server for Biology*, 2024.03.02.583119. <https://doi.org/10.1101/2024.03.02.583119>
- Sarria-Guzmán, Y., Chávez-Romero, Y., Bernal, J. E., González-Jiménez, F. E., Serrano-Silva, N., & Fusaro, C. (2022). Molecular identification of *Giardia* spp. in Latin America: An updated systematic review on reports from 2017 to 2021. *Journal of Infection in Developing Countries*, 16(3), 392–401. <https://doi.org/10.3855/jidc.15806>

- Sarzhanov, F., Köster, P. C., Dogruman-Al, F., Bailo, B., Dashti, A., Demirel-Kaya, F., & Carmena, D. (2021). Detection of enteric parasites and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp. in patients admitted to hospital in Ankara, Turkey. *Parasitology*, 148(5), 550–561. <https://doi.org/10.1017/S0031182020001821>
- Savioli, L., Smith, H., & Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology*, 22(5), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.015>
- Scanlan, P. D., Stensvold, C. R., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G., De Vos, W. M., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2014). The microbial eukaryote *Blastocystis* is a prevalent and diverse member of the healthy human gut microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 326–330. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12396>
- Scicluna, S. M., Tawari, B., & Clark, C. G. (2006). DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, 157(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.12.001>
- Scott, K. G., Logan, M. R., Klammer, G. M., Teoh, D. A., & Buret, A. G. (2000). Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris*-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infection and Immunity*, 68(6), 3412–3418. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3412-3418.2000>
- Seabolt, M. H., Konstantinidis, K. T., & Roellig, D. M. (2021). Hidden diversity within common protozoan parasites as revealed by a novel genotyping scheme. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(6), e02275-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02275-20>
- Seabolt, M. H., Roellig, D. M., & Konstantinidis, K. T. (2022). Genomic comparisons confirm *Giardia duodenalis* sub-assembly All as a unique species. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 1010244. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1010244>
- Seguí, R., Klisiowicz, D., Oishi, C. Y., Toledo, R., Esteban, J. G., & Muñoz-Antoli, C. (2017). Intestinal symptoms and *Blastocystis* load in schoolchildren of Paranaguá Bay, Paraná, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 59, e86. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759086>

- Seguí, R., Muñoz-Antoli, C., Klisiowicz, D. R., Oishi, C. Y., Köster, P. C., de Lucio, A., Hernández-de-Mingo, M., Puente, P., Toledo, R., Esteban, J. G., & Carmena, D. (2018). Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranaguá Bay, Brazil: a community survey. *Parasites & Vectors*, 11(1), 490. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3054-7>
- Seijas-Pereda, L., Köster, P. C., Dashti, A., Bailo, B., Guadano-Procesi, I., Rescalvo-Casas, C., Hernando-Gozalo, M., Cuadros-González, J., Carmena, D., & Pérez-Tanoira, R. (2024). Intragenomic diversity of the small subunit rDNA gene shows limited impact on the pathogenicity of *Blastocystis* infection in clinical patients. *Microbes and Infection*, 105422. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2024.105422>
- Šejnohová, A., Koutenská, M., Jirků, M., Brožová, K., Pavlíčková, Z., Kadlecová, O., Cinek, O., Maloney, J. G., Santín, M., Petrželková, K. J., & Jirků, K. (2024). A cross-sectional survey of *Blastocystis* sp. and *Dientamoeba fragilis* in non-human primates and their caregivers in Czech zoos. *One Health (Amsterdam, Netherlands)*, 19, 100862. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2024.100862>
- Sekar, U., & Shanthi, M. (2013). *Blastocystis*: Consensus of treatment and controversies. *Tropical Parasitology*, 3(1), 35–39. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.113901>
- Seyer, A., Karasartova, D., Ruh, E., Güreser, A. S., Turgal, E., Imir, T., & Taylan-Ozkan, A. (2017). epidemiology and prevalence of *Blastocystis* spp. in North Cyprus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(5), 1164–1170. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0706>
- Shams, M., Asghari, A., Baniasad, M., Shamsi, L., & Sadrebazzaz, A. (2022). *Blastocystis* sp. in small ruminants: A universal systematic review and meta-analysis. *Acta Parasitologica*, 67(3), 1073–1085. <https://doi.org/10.1007/s11686-022-00589-3>
- Shan, F., Wang, F., Chang, S., Wang, N., Liu, Y., Chen, X., Zhao, G., & Zhang, L. (2024). Predominance of the *Blastocystis* subtype ST5 among free-living sympatric rodents within pig farms in China suggests a novel transmission route from farms. *One Health (Amsterdam, Netherlands)*, 18, 100723. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2024.100723>
- Shane, A. L., Mody, R. K., Crump, J. A., Tarr, P. I., Steiner, T. S., Kotloff, K., Langley, J. M., Wanke, C., Warren, C. A., Cheng, A. C., Cantey, J., & Pickering, L. K. (2017). 2017 infectious diseases society of America clinical practice guidelines for the diagnosis and management of infectious diarrhea. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 65(12), e45–e80. <https://doi.org/10.1093/cid/cix669>

- Sharifi, Y., Abbasi, F., Shahabi, S., Zaraei, A., Mikaeili, F., & Sarkari, B. (2020). Comparative genotyping of *Blastocystis* infecting cattle and human in the south of Iran. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 72, 101529. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101529>
- Shasha, D., Grupel, D., Treigerman, O., Prajgrod, G., Paran, Y., Hacham, D., Ben-Ami, R., Albukrek, D., & Zacay, G. (2024). The clinical significance of *Dientamoeba fragilis* and *Blastocystis* in human stool-retrospective cohort study. *Clinical Microbiology and Infection : the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30(1), 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.09.003>
- Shatla, H. M., el-Hodhod, M. T., Mohsen, D. M., & Salah el-Din, M. Y. (2004). Potential diagnosis of *Giardia lamblia* infection through specific antibody detection in saliva. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 34(2), 621–630.
- Shaw, D., Denoyelle, C., Tan, K. S. W., Clark, C. G., Yoshikawa, H., Viscogliosi, E., Gentekaki, E., Jirků, K., & Tsaousis, A. D. (2025). Comprehensive tools for culturing *Blastocystis*: A standardized resource for research and diagnostics. *Current Protocols*, 5(8), e70175. <https://doi.org/10.1002/cpz1.70175>
- Sheela, D. S., Chandramathi, S., & Suresh, K. (2020). Epitope variances demonstrated by *Blastocystis* sp. ST3 symptomatic and asymptomatic isolates. *Tropical Biomedicine*, 37(1), 210–217.
- Sheffield, H. G., & Bjorvat, B. (1977). Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 26(1), 23–30. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1977.26.23>
- Silberman, J. D., Sogin, M. L., Leipe, D. D., & Clark, C. G. (1996). Human parasite finds taxonomic home. *Nature*, 380(6573), 398. <https://doi.org/10.1038/380398a0>
- Singer, S. M., & Nash, T. E. (2000). The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(4), 1510–1512. <https://doi.org/10.1086/315409>
- 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*. *Parasitology Research*, 81(5), 446–450. <https://doi.org/10.1007/BF00931510>

- Singh, U., Garg, N., & Chopra, V. (2013). Eosinophilic pleural effusion and giardiasis: A causal or a casual relationship?. *Lung India : Official Organ of Indian Chest Society*, 30(1), 69–71. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.106179>
- Sio, S. W., Puthia, M. K., Lee, A. S., Lu, J., & Tan, K. S. (2006). Protease activity of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 99(2), 126–130. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0131-1>
- Skotarczak B. (2018). Genetic diversity and pathogenicity of *Blastocystis*. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 25(3), 411–416. <https://doi.org/10.26444/aaem/81315>
- Solaymani-Mohammadi, S., & Singer, S. M. (2011). Host immunity and pathogen strain contribute to intestinal disaccharidase impairment following gut infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(7), 3769–3775. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100606>
- Soleimani Jevinani, S., Mohammad Rahimi, H., Asri, N., Rostami-Nejad, M., Ahmadipour, S., & Mirjalali, H. (2023). Molecular epidemiology and subtyping of *Blastocystis* sp. and its subtypes in celiac patients; a case control study. *Microbial Pathogenesis*, 179, 106086. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106086>
- Soriano, J. M., Domènech, G., Martínez, M. C., Mañes, J., & Soriano, F. (2011). Intestinal parasitic infections in hosted Saharawi children. *Tropical Biomedicine*, 28(3), 557–562.
- Souppart, L., Sancier, G., Cian, A., Wawrzyniak, I., Delbac, F., Capron, M., Dei-Cas, E., Boorom, K., Delhaes, L., & Viscogliosi, E. (2009). Molecular epidemiology of human *Blastocystis* isolates in France. *Parasitology Research*, 105(2), 413–421. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1398-9>
- Sprong, H., Cacciò, S. M., van der Giessen, J. W., & ZOOPNET network and partners (2009). Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(12), e558. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000558>
- Stadelmann, B., Merino, M. C., Persson, L., & Svärd, S. G. (2012). Arginine consumption by the intestinal parasite *Giardia intestinalis* reduces proliferation of intestinal epithelial cells. *PloS One*, 7(9), e45325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045325>
- Stark, D., Roberts, T., Ellis, J. T., Marriott, D., & Harkness, J. (2014). Evaluation of the EasyScreen™ enteric parasite detection kit for the detection of *Blastocystis* spp., *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba* complex, and *Giardia intestinalis* from clinical stool samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(2), 149–152. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.10.013>

- Stensvold C. R. (2013). Comparison of sequencing (barcode region) and sequence-tagged-site PCR for *Blastocystis* subtyping. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1), 190–194. <https://doi.org/10.1128/JCM.02541-12>
- Stensvold, C. R., & Clark, C. G. (2016a). Current status of *Blastocystis*: A personal view. *Parasitology International*, 65(6 Pt B), 763–771. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.015>
- Stensvold, C. R., & Clark, C. G. (2016b). Molecular identification and subtype analysis of *Blastocystis*. *Current Protocols in Microbiology*, 43, 20A.2.1–20A.2.10. <https://doi.org/10.1002/cpmc.17>
- Stensvold, C. R., & Clark, C. G. (2020). Pre-empting Pandora's Box: *Blastocystis* subtypes revisited. *Trends in Parasitology*, 36(3), 229–232. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.009>
- Stensvold, C. R., Ahmed, U. N., Andersen, L. O., & Nielsen, H. V. (2012a). Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(6), 1847–1851. <https://doi.org/10.1128/JCM.00007-12>
- Stensvold, C. R., Alfellani, M. A., Nørskov-Lauritsen, S., Prip, K., Victory, E. L., Maddox, C., Nielsen, H. V., & Clark, C. G. (2009c). Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *International Journal for Parasitology*, 39(4), 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.07.006>
- Stensvold, C. R., Alfellani, M., & Clark, C. G. (2012b). Levels of genetic diversity vary dramatically between *Blastocystis* subtypes. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(2), 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.11.002>
- Stensvold, C. R., Berg, R. P. K. D., Maloney, J. G., Molokin, A., & Santin, M. (2023). Molecular characterization of *Blastocystis* and *Entamoeba* of muskoxen and sheep in Greenland. *International Journal for Parasitology*, 53(11-12), 673–685. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2023.05.005>
- Stensvold, C. R., Christiansen, D. B., Olsen, K. E., & Nielsen, H. V. (2011). *Blastocystis* sp. subtype 4 is common in Danish *Blastocystis*-positive patients presenting with acute diarrhea. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(6), 883–885. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0005>

- Stensvold, C. R., Lewis, H. C., Hammerum, A. M., Porsbo, L. J., Nielsen, S. S., Olsen, K. E., Arendrup, M. C., Nielsen, H. V., & Mølbak, K. (2009a). *Blastocystis*: unravelling potential risk factors and clinical significance of a common but neglected parasite. *Epidemiology and Infection*, 137(11), 1655–1663. <https://doi.org/10.1017/S0950268809002672>
- Stensvold, C. R., Nielsen, H. V., Mølbak, K., & Smith, H. V. (2009b). Pursuing the clinical significance of *Blastocystis*--diagnostic limitations. *Trends in Parasitology*, 25(1), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.09.010>
- Stensvold, C. R., Sørland, B. A., Berg, R. P. K. D., Andersen, L. O., van der Giezen, M., Bowtell, J. L., El-Badry, A. A., Belkessa, S., Kurt, Ö., & Nielsen, H. V. (2022). Stool microbiota diversity analysis of *Blastocystis*-Positive and *Blastocystis*-Negative individuals. *Microorganisms*, 10(2), 326. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020326>
- Stensvold, C. R., Suresh, G. K., Tan, K. S., Thompson, R. A., Traub, R. J., Viscogliosi, E., Yoshikawa, H., & Clark, C. G. (2007b). Terminology for *Blastocystis* subtypes – a consensus. *Trends in Parasitology*, 23(3), 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.01.004>
- Stensvold, C. R., Tan, K. S. W., & Clark, C. G. (2020). *Blastocystis*. *Trends in Parasitology*, 36(3), 315–316. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.008>
- Stensvold, C. R., Traub, R. J., von Samson-Himmelstjerna, G., Jespersgaard, C., Nielsen, H. V., & Thompson, R. C. (2007a). *Blastocystis*: subtyping isolates using pyrosequencing technology. *Experimental Parasitology*, 116(2), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.12.002>
- Stenzel, D. J., & Boreham, P. F. (1991). A cyst-like stage of *Blastocystis hominis*. *International Journal for Parasitology*, 21(5), 613–615. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(91\)90069-j](https://doi.org/10.1016/0020-7519(91)90069-j)
- Stenzel, D. J., & Boreham, P. F. (1996). *Blastocystis hominis* revisited. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(4), 563–584. <https://doi.org/10.1128/cmr.9.4.563>
- Suresh, K., Howe, J., Ng, G. C., Ho, L. C., Ramachandran, N. P., Loh, A. K., Yap, E. H., & Singh, M. (1994). A multiple fission-like mode of asexual reproduction in *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 80(6), 523–527. <https://doi.org/10.1007/BF00932701>
- Suresh, K., Ng, G. C., Ramachandran, N. P., Ho, L. C., Yap, E. H., & Singh, M. (1993). In vitro encystment and experimental infections of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 79(6), 456–460. <https://doi.org/10.1007/BF00931582>

- Sutthikornchai, C., Abu, A., Pintong, A. R., Chiabchalard, R., Nokkaew, W., Toompong, J., Popruk, S., & Stensvold, C. R. (2024). Genetic diversity and host specificity of *Blastocystis* in reptiles, Eastern Thailand. *Veterinary Parasitology*, 329, 110218. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2024.110218>
- Swayne, J. G. (1849). An account of certain organic cells peculiar to the evacuations of cholera. *Lancet*, 54(1362), 368-371. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)70817-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(02)70817-9).
- Talayero, J. M. P., Serrano, L. S., Feijoo, A. F., Camacho, M. F., Serrano, F. R., & Fernández, P. B. (1998). Examen de salud de niños de la República Árabe Saharaui Democrática (noroeste de Africa) de vacaciones en España. *Anales españoles de pediatría*, 49(1), 33-38.
- Tan, K. S. (2004). *Blastocystis* in humans and animals: new insights using modern methodologies. *Veterinary Parasitology*, 126(1-2), 121-144. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.017>
- Tan, K. S. W. (2008). New insights on classification, identification, and clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 639-665. <https://doi.org/10.1128/cmr.00022-08>
- Tan, K. S., Mirza, H., Teo, J. D., Wu, B., & Macary, P. A. (2010). Current views on the clinical relevance of *Blastocystis* spp. *Current infectious disease reports*, 12(1), 28-35. <https://doi.org/10.1007/s11908-009-0073-8>
- Tantrawatpan, C., Vaisusuk, K., Thanchomnang, T., Pilap, W., Sankamethawee, W., Suksavate, W., Chatan, W., Bunchom, N., Kaewkla, O., Stensvold, C. R., & Saijuntha, W. (2023). Distribution of *Blastocystis* subtypes isolated from various animal hosts in Thailand. *Research in veterinary science*, 162, 104939. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.06.017>
- Taylor-Orozco, V., López-Fajardo, A., Muñoz-Marroquín, I., Hurtado-Benítez, M., & Ríos-Ramírez, K. (2016). *Blastocystis* sp: evidencias de su rol patógeno. *Biosalud*, 15(2), 69-86. <https://doi.org/10.17151/biosa.2016.15.2.8>
- Tejera, B., Grados, D., Martínez-Morillo, M., & Roure, S. (2012). Artritis reactiva por *Blastocystis hominis* [Reactive arthritis caused by *Blastocystis hominis*]. *Reumatología clínica*, 8(1), 50-51. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2011.07.008>
- Tenorio-Abreu, A., Gil-Tomás, J. J., Martínez-Macías, O., & Colomina-Rodríguez, J. (2013). Comparación entre 2 técnicas de concentración de parásitos (Copropack versus Mini Parasep Solvent Free). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(5), 347-348. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.10.008>

- Terveer, E. M., van Gool, T., Ooijevaar, R. E., Sanders, I. M. J. G., Boeije-Koppenol, E., Keller, J. J., Bart, A., Kuijper, E. J., & Netherlands Donor Feces Bank (NDFB) Study Group (2020). Human transmission of *Blastocystis* by fecal microbiota transplantation without development of gastrointestinal symptoms in recipients. *Clinical Infectious Diseases : an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(10), 2630–2636. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1122>
- Thakur, S., Kaur, U., & Sehgal, R. (2021). Genetic diversity of *Giardia* isolates from patients in Chandigarh region: India. *BMC Research Notes*, 14(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05419-1>
- Thathaisong, U., Siripattanapipong, S., Mungthin, M., Pipatsatitpong, D., Tan-ariya, P., Naaglor, T., & Leelayoova, S. (2013). Identification of *Blastocystis* subtype 1 variants in the Home for Girls, Bangkok, Thailand. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(2), 352–358. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0237>
- Thomas, E. B., Sutanto, R., Johnson, R. S., Shih, H. W., Alas, G. C. M., Krtková, J., MacCoss, M. J., & Paredes, A. R. (2021). Staging encystation progression in *Giardia lamblia* using encystation-specific vesicle morphology and associating molecular markers. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 662945. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.662945>
- Tileklioğlu, E., & Ertaçlar, H. (2024). İshalli olgularda *Blastocystis*'in genetik çeşitliliği: alt tipler ve alellerin belirlenmesi [Genetic diversity of *Blastocystis* in diarrheal cases: identification of subtypes and alleles]. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 58(2), 196–208. <https://doi.org/10.5578/mb.202498207>
- Tito, R. Y., Chaffron, S., Caenepeel, C., Lima-Mendez, G., Wang, J., Vieira-Silva, S., Falony, G., Hildebrand, F., Darzi, Y., Rymenans, L., Verspecht, C., Bork, P., Vermeire, S., Joossens, M., & Raes, J. (2019). Population-level analysis of *Blastocystis* subtype prevalence and variation in the human gut microbiota. *Gut*, 68(7), 1180–1189. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316106>
- Toro-Londono, M. A., Bedoya-Urrego, K., Garcia-Montoya, G. M., Galvan-Diaz, A. L., & Alzate, J. F. (2019). Intestinal parasitic infection alters bacterial gut microbiota in children. *PeerJ*, 7, e6200. <https://doi.org/10.7717/peerj.6200>

- Trelis, M., Sáez-Durán, S., Puchades, P., Castro, N., Miquel, A., Gozalbo, M., & Fuentes, M. V. (2022). Survey of the occurrence of *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* spp. oocysts in green leafy vegetables marketed in the city of Valencia (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 379, 109847. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109847>
- Trelis, M., Taroncher-Ferrer, S., Gozalbo, M., Ortiz, V., Soriano, J. M., Osuna, A., & Merino-Torres, J. F. (2019). *Giardia intestinalis* and fructose malabsorption: A Frequent Association. *Nutrients*, 11(12), 2973. <https://doi.org/10.3390/nu11122973>
- Turnbull, A. M., Lin, Z., & Matthews, B. N. (2013). Severe bilateral anterior uveitis secondary to giardiasis, initially misdiagnosed as a side effect of metronidazole. *Eye (London, England)*, 27(10), 1225–1226. <https://doi.org/10.1038/eye.2013.145>
- Turner, R. A., Duke, J. N., & Foran, J. R. H. (2021). *Giardia lamblia* reactive arthritis mimicking acute periprosthetic knee infection: A Case Report. *JBJS Case Connector*, 11(3), e21.00165. <https://doi.org/10.2106/JBJS.CC.21.00165>
- Tuzer, C., Yegit, O., Ozturk, N. S., Demir, S., Demirpek, U., Boral, O. B., Buyukozturk, S., Gelincik, A., & Colakoglu, B. (2022). Relationship between *Blastocystis* spp. with accompanying food hypersensitivity and chronic spontaneous urticaria. *International Archives of Allergy and Immunology*, 183(12), 1259–1269. <https://doi.org/10.1159/000526371>
- Udonsom, R., Prasertbun, R., Mahittikorn, A., Mori, H., Changbunjong, T., Komalamisra, C., Pintong, A. R., Sukthana, Y., & Popruk, S. (2018). *Blastocystis* infection and subtype distribution in humans, cattle, goats, and pigs in central and western Thailand. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 65, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.007>
- Velasco, A. C., Mateos, M. L., Más, G., Pedraza, A., Díez, M., & Gutiérrez, A. (1984). Three-year prospective study of intestinal pathogens in Madrid, Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(2), 290–292. <https://doi.org/10.1128/jcm.20.2.290-292.1984>
- Velásquez, J. N., Astudillo, O. G., Vittar, N., Pantano, M. L., & Carnevale, S. (2022). Diagnostic features of *Blastocystis* life cycle forms in the small intestine in an HIV-infected patient. *Acta Parasitologica*, 67(1), 102–109. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00435-y>
- Vennila, G. D., Suresh Kumar, G., Khairul Anuar, A., Rajah, S., Saminathan, R., Sivanandan, S., & Ramakrishnan, K. (1999). Irregular shedding of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research*, 85(2), 162–164. <https://doi.org/10.1007/s004360050528>

- Verweij, J. J., Schinkel, J., Laeijendecker, D., van Rooyen, M. A., van Lieshout, L., & Polderman, A. M. (2003). Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Molecular and Cellular Probes*, 17(5), 223–225. [https://doi.org/10.1016/s0890-8508\(03\)00057-4](https://doi.org/10.1016/s0890-8508(03)00057-4)
- Viesy, S., Rezaei, Z., Pouladi, I., Mirzaei, A., & Abdi, J. (2022). The prevalence of *Blastocystis* sp. and its relationship with gastrointestinal disorders and risk factors. *Iranian Journal of Parasitology*, 17(1), 90–95. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v17i1.9029>
- Villanueva-Lizama, L. E., Cruz-Coral, A., Teh-Poot, C., Cruz-Chan, J. V., & Mejia, R. (2024). Detection of parasite DNA in soil samples from rural Yucatan, Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 112(2), 304–306. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.23-0385>
- Vivancos, V., González-Alvarez, I., Bermejo, M., & Gonzalez-Alvarez, M. (2018). Giardiasis: characteristics, pathogenesis and new insights about treatment. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(15), 1287–1303. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181002095314>
- Vogelberg, C., Stensvold, C. R., Monecke, S., Ditzen, A., Stopsack, K., Heinrich-Gräfe, U., & Pöhlmann, C. (2010). *Blastocystis* sp. subtype 2 detection during recurrence of gastrointestinal and urticarial symptoms. *Parasitology International*, 59(3), 469–471. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.03.009>
- Wang, W., Bielefeldt-Ohmann, H., Traub, R. J., Cuttell, L., & Owen, H. (2014a). Location and pathogenic potential of *Blastocystis* in the porcine intestine. *PloS One*, 9(8), e103962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103962>
- Wang, W., Owen, H., Traub, R. J., Cuttell, L., Inpankaew, T., & Bielefeldt-Ohmann, H. (2014b). Molecular epidemiology of *Blastocystis* in pigs and their in-contact humans in Southeast Queensland, Australia, and Cambodia. *Veterinary Parasitology*, 203(3-4), 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.006>
- Wang, Y., Gonzalez-Moreno, O., Roellig, D. M., Oliver, L., Huguet, J., Guo, Y., Feng, Y., & Xiao, L. (2019). Epidemiological distribution of genotypes of *Giardia duodenalis* in humans in Spain. *Parasites & Vectors*, 12(1), 432. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3692-4>
- Wawrzyniak, I., Poirier, P., Viscogliosi, E., Dionigia, M., Texier, C., Delbac, F., & Alaoui, H. E. (2013). *Blastocystis*, an unrecognized parasite: an overview of pathogenesis and diagnosis. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 1(5), 167–178. <https://doi.org/10.1177/2049936113504754>

- Wawrzyniak, I., Texier, C., Poirier, P., Viscogliosi, E., Tan, K. S., Delbac, F., & El Alaoui, H. (2012). Characterization of two cysteine proteases secreted by *Blastocystis* ST7, a human intestinal parasite. *Parasitology International*, 61(3), 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.02.007>
- Weisman B. L. (1979). Urticaria and *Giardia lamblia* infection. *Annals of allergy*, 42(2), 91.
- Weitzel, T., Brown, A., Libman, M., Perret, C., Huits, R., Chen, L., Leung, D. T., Leder, K., Connor, B. A., Menéndez, M. D., Asgeirsson, H., Schwartz, E., Salvador, F., Malvy, D., Saio, M., Norman, F. F., Amatya, B., Duvignaud, A., Vaughan, S., Glynn, M., ... Angelo, K. M. (2024). Intestinal protozoa in returning travellers: a GeoSentinel analysis from 2007 to 2019. *Journal of Travel Medicine*, 31(4), taae010. <https://doi.org/10.1093/jtm/taae010>
- Whipps, C. M., Boorom, K., Bermudez, L. E., & Kent, M. L. (2010). Molecular characterization of *Blastocystis* species in Oregon identifies multiple subtypes. *Parasitology Research*, 106(4), 827–832. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1739-8>
- Wielinga, C., Williams, A., Monis, P., & Thompson, R. C. A. (2023). Proposed taxonomic revision of *Giardia duodenalis*. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 111, 105430. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105430>
- Windsor, J. J., Macfarlane, L., Hughes-Thapa, G., Jones, S. K., & Whiteside, T. M. (2002). Incidence of *Blastocystis hominis* in faecal samples submitted for routine microbiological analysis. *British Journal of Biomedical Science*, 59(3), 154–157. <https://doi.org/10.1080/09674845.2002.11783653>
- Wu, Z., Mirza, H., Teo, J. D., & Tan, K. S. (2014). Strain-dependent induction of human enterocyte apoptosis by *Blastocystis* disrupts epithelial barrier and ZO-1 organization in a caspase 3- and 9-dependent manner. *BioMed Research International*, 2014, 209163. <https://doi.org/10.1155/2014/209163>
- Xiao, L., & Feng, Y. (2017). Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Food and Waterborne Parasitology*, 8-9, 14–32. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2017.09.002>
- Xu, F., Jerlström-Hultqvist, J., & Andersson, J. O. (2012). Genome-wide analyses of recombination suggest that *Giardia intestinalis* assemblages represent different species. *Molecular Biology and Evolution*, 29(10), 2895–2898. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss107>

- Yamamoto-Furusho, J. K., & Torijano-Carrera, E. (2010). Intestinal protozoa infections among patients with ulcerative colitis: prevalence and impact on clinical disease course. *Digestion*, 82(1), 18–23. <https://doi.org/10.1159/000273871>
- Yan, W. L., Li, X. M., Qin, S. Y., Xue, N. Y., Zou, Y., Li, J. H., Zhang, X. X., & Ni, H. B. (2024). Subtypes of *Blastocystis* in Tibetan Antelope (*Pantholops hodgsonii*). *Research in Veterinary Science*, 171, 105233. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105233>
- Yang, F., Gou, J. M., Yang, B. K., Du, J. Y., Yao, H. Z., Ren, M., & Lin, Q. (2023). Prevalence and Subtype Distribution of *Blastocystis* in Tibetan Sheep in Qinghai Province, Northwestern China. *Protist*, 174(2), 125948. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2023.125948>
- Yang, G. P., Erdman, D. D., Tondella, M. L., & Fields, B. S. (2009). Evaluation of tetramethylrhodamine and black hole quencher 1 labeled probes and five commercial amplification mixes in *TaqMan* real-time RT-PCR assays for respiratory pathogens. *Journal of Virological Methods*, 162(1-2), 288–290. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.08.004>
- Yang, X., Li, Y., Wang, Y., Wang, J., Lai, P., Li, Y., Song, J., Qi, M., & Zhao, G. (2021). Molecular Characterization of *Blastocystis* sp. in *Camelus bactrianus* in Northwestern China. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 11(11), 3016. <https://doi.org/10.3390/ani11113016>
- Yansouni, C. P., Merckx, J., Libman, M. D., & Ndao, M. (2014). Recent advances in clinical parasitology diagnostics. *Current Infectious Disease Reports*, 16(11), 434. <https://doi.org/10.1007/s11908-014-0434-9>
- Yarze J. C. (1996). Hemorrhagic proctosigmoiditis and *Blastocystis hominis*. *Annals of Internal Medicine*, 125(10), 860–861. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-125-10-199611150-00021>
- Yason, J. A., Liang, Y. R., Png, C. W., Zhang, Y., & Tan, K. S. W. (2019). Interactions between a pathogenic *Blastocystis* subtype and gut microbiota: in vitro and in vivo studies. *Microbiome*, 7(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0644-3>
- Yee, J., & Dennis, P. P. (1992). Isolation and characterization of a NADP-dependent glutamate dehydrogenase gene from the primitive eucaryote *Giardia lamblia*. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(11), 7539–7544.
- Yildiz Ozkaya, D., Kartal, O., & Kalkan, F. (2022). An atypical urticaria case caused by *Giardia intestinalis*. *Journal of Infection in Developing Countries*, 16(11), 1781–1783. <https://doi.org/10.3855/jidc.17177>

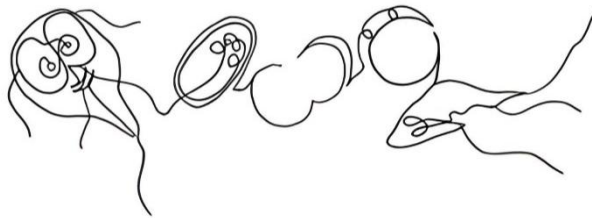
- Yoshikawa, H., Abe, N., Iwasawa, M., Kitano, S., Nagano, I., Wu, Z., & Takahashi, Y. (2000). Genomic analysis of *Blastocystis hominis* strains isolated from two long-term health care facilities. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(4), 1324–1330. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.4.1324-1330.2000>
- Yoshikawa, H., Wu, Z., Kimata, I., Iseki, M., Ali, I. K., Hossain, M. B., Zaman, V., Haque, R., & Takahashi, Y. (2004b). Polymerase chain reaction-based genotype classification among human *Blastocystis hominis* populations isolated from different countries. *Parasitology Research*, 92(1), 22–29. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0995-2>
- Yoshikawa, H., Yoshida, K., Nakajima, A., Yamanari, K., Iwatani, S., & Kimata, I. (2004a). Fecal-oral transmission of the cyst form of *Blastocystis hominis* in rats. *Parasitology Research*, 94(6), 391–396. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1230-5>
- Young, K. H., Bullock, S. L., Melvin, D. M., & Spruill, C. L. (1979). Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(6), 852–853. <https://doi.org/10.1128/jcm.10.6.852-853.1979>
- Yu, M., Yao, Y., Xiao, H., Xie, M., Xiong, Y., Yang, S., Ni, Q., Zhang, M., & Xu, H. (2023). Extensive prevalence and significant genetic differentiation of *Blastocystis* in high- and low-altitude populations of wild rhesus macaques in China. *Parasites & Vectors*, 16(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05691-7>
- Zajaczkowski, P., Lee, R., Fletcher-Lartey, S. M., Alexander, K., Mahimbo, A., Stark, D., & Ellis, J. T. (2021). The controversies surrounding *Giardia intestinalis* assemblages A and B. *Current Research in Parasitology & Vector-borne Diseases*, 1, 100055. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100055>
- Zboromyrska, Y., Hurtado, J. C., Salvador, P., Alvarez-Martínez, M. J., Valls, M. E., Mas, J., Marcos, M. A., Gascón, J., & Vila, J. (2014). Aetiology of traveller's diarrhoea: evaluation of a multiplex PCR tool to detect different enteropathogens. *Clinical Microbiology and Infection : the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(10), O753–O759. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12621>
- Zeidler, H., & Hudson, A. P. (2021). Reactive Arthritis Update: Spotlight on New and Rare Infectious Agents Implicated as Pathogens. *Current Rheumatology Reports*, 23(7), 53. <https://doi.org/10.1007/s11926-021-01018-6>

- Zhang, F. Q., Wang, P., Feng, X., Mi, Q. M., Mei, X. F., Zhang, Z. C., Li, X. R., & Wang, S. (2020b). *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi = Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 33(1), 84–94. <https://doi.org/10.16250/j.32.1374.2020083>
- Zhang, S., Zhang, T. H., Jia, T., Su, N., Xie, S. C., Li, S., Tian, X., Zhu, X. Q., Liu, Q., & Gao, W. W. (2024). Prevalence and genotype/subtype distribution of *Enterocytozoon bienersi* and *Blastocystis* in donkeys in Shanxi Province, north China. *Parasitology Research*, 123(1), 108. <https://doi.org/10.1007/s00436-024-08128-x>
- Zhang, X., Wang, L., Lan, X., Dan, J., Ren, Z., Cao, S., Shen, L., Deng, J., Zuo, Z., Yu, S., Wang, Y., Ma, X., Liu, H., Zhou, Z., Hu, Y., Fu, H., He, C., Geng, Y., Gu, X., Peng, G., ... Zhong, Z. (2020a). Occurrence and multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in captive non-human primates from 12 zoos in China. *PloS One*, 15(2), e0228673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228673>
- Zhao, G. H., Hu, X. F., Liu, T. L., Hu, R. S., Yu, Z. Q., Yang, W. B., Wu, Y. L., Yu, S. K., & Song, J. K. (2017). Molecular characterization of *Blastocystis* sp. in captive wild animals in Qinling Mountains. *Parasitology Research*, 116(8), 2327–2333. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5506-y>
- Zhao, W., Ren, G., Wang, L., Xie, L., Wang, J., Mao, J., Sun, Y., Lu, G., & Huang, H. (2024). Molecular prevalence and subtype distribution of *Blastocystis* spp. among children who have diarrhea or are asymptomatic in Wenzhou, Zhejiang Province, China. Prévalence moléculaire et distribution des sous-types de *Blastocystis* spp. parmi les enfants diarrhéiques et asymptomatiques à Wenzhou, Province du Zhejiang, Chine. *Parasite (Paris, France)*, 31, 12. <https://doi.org/10.1051/parasite/2024012>
- Zierdt, C. H. (1991). *Blastocystis hominis*--past and future. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 61–79. <https://doi.org/10.1128/cmr.4.1.61>
- Zierdt, C. H., & Swan, J. C. (1981). Generation time and growth rate of the human intestinal parasite *Blastocystis hominis*. *The Journal of Protozoology*, 28(4), 483–485. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1981.tb05324.x>
- Zierdt, C. H., & Tan, H. K. (1976). Ultrastructure and light microscope appearance of *Blastocystis hominis* in a patient with enteric disease. *Zeitschrift für Parasitenkunde (Berlin, Germany)*, 50(3), 277–283. <https://doi.org/10.1007/BF02462972>

- Zierdt, C. H., & Williams, R. L. (1974). *Blastocystis hominis*: axenic cultivation. *Experimental Parasitology*, 36(2), 233–243. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(74\)90062-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(74)90062-9)
- Zierdt, C. H., Rude, W. S., & Bull, B. S. (1967). Protozoan characteristics of *Blastocystis hominis*. *American Journal of Clinical Pathology*, 48(5), 495–501. <https://doi.org/10.1093/ajcp/48.5.495>
- Zierdt, CH, Zierdt, WS y Nagy, B. (1995). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to *Blastocystis hominis* in symptomatic infections. *The Journal of Parasitology*, 81(1), 127-129.



## 8. ANEXOS





## 8.1. ANEXO I. Dictamen del comité de ética



### DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

JUAN EDUARDO MEGIAS VERICAT, titular de la Secretaría Técnica del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del **CEIM - HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA FE,**

#### CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha 30/04/2025, el Proyecto de Investigación:

Título: **“Estudio de prevalencia de parasitosis intestinales y la clínica asociada.”**

Nº de registro: **2025-0418-1**

Código de protocolo/ acrónimo: **PARACLINIC**

Documento	Versión - Fecha
Protocolo	08 de abril de 2025
Hoja de Información y Consentimiento Informado - Solicitud de exención del CI	09 de abril de 2025

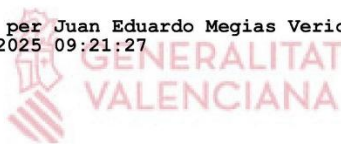
Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud.

En consecuencia, este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA FE por el/la Dr. / Dra. **MARÍA TRELIS VILLANUEVA** del servicio/unidad/grupo de investigación de **Unidad Mixta de Investigación en Endocrinología, Nutrición y Dietética clínica** como Investigador Principal.

Que el CEIM - HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA FE, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIM - HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA FE, es la indicada en el Anexo I, teniendo en cuenta que, en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés, no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del estudio clínico.

Lo que firmo en Valencia, a 30/04/2025

Firmat per Juan Eduardo Megias Vericat, el  
05/05/2025 09:21:27



Fdo.: JUAN EDUARDO MEGIAS VERICAT  
Titular de la secretaría técnica del CEIm

## 8.2. ANEXO II: Secuencias de referencia de GenBank empleadas para la caracterización molecular de *Giardia intestinalis*

### 8.2.1. Secuencias *gdh*

>L40509.1 *Giardia lamblia* (isolate Ad-1) NADP-dependent glutamate dehydrogenase (*gdh*) gene, partial cds

```
ATCTTCCGCGTGCCCTGGATGGATGACGCTGGACGCATCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTGTCCAG
TACAACTCTGCTCTCGGCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCACCCCTCTGTCAATCTTTCGATTCT
CAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCCGATGGGCGGCGGCA
AGGGCGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCC
TTCATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCCGGCGCCGACACTGACGTTCTGCGGGCGACATCGGCGT
CGGCGCCCGCGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGC
GTCCTCACAGGCAAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCTTTCATCAGGCCGGAGGCCACGGGGCTATGG
CGCTGTCTACTTCTGAGGAGATGTGCAAGGACAACAACACTGTGATCAGGGGTAAGAACGTCCTT
CTTTCTGGCTCCGGCAACGTTGCCAGTTTGCTTGCGAGAAGCTCATTAGCTCGGCGCAAAGGTC
CTCACCTTCTCAGACTCCAACGGGACCATTGTCGACAAGGACGGGTTCAACGAGGAGAAGCTGGC
CCACCTCATGTACCTCAAGAACGAGAAGCGTGGG
```

>L40510.1 *Giardia lamblia* (isolate Ad-2) NADP-dependent glutamate dehydrogenase (*gdh*) gene, partial cds

```
ATCTTCCGCGTGCCCTGGATGGATGACGCTGGACGCATCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTGTCCAG
TACAACTCTGCTCTCGGCCCTACAAGGGTGGCCTCCGCTTCCACCCCTCTGTCAATCTTTCGATTCT
CAAGTTCCTCGGTTTCGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTCACCACGCTCCCGATGGGCGGCGGCA
AGGGCGGCTCCGACTTTGACCCAAAGGGCAAGTCCGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCC
TTCATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCCGGCGCCGACACTGACGTTCTGCGGGCGACATCGGCGT
CGGCGCCCGCGAGATCGGGTACCTGTACGGACAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGC
GTCCTCACAGGCAAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCTTTCATCAGGCCGGAGGCTACGGGGCTATGG
CGCTGTCTACTTCTGAGGAGATGTGCAAGGACAACAACACTGTGATCAGGGGTAAGAACGTCCTC
CTTTCTGGCTCCGGCAACGTTGCCAGTTTGCTTGCGAGAAGCTCATTAGCTTGGCGCAAAGGTC
TCACCTTCTCAGACTCCAACGGGACCATTGTCGACAAGGATGGGTTCAACGAGGAGAAGCTGGCTC
ACCTCATGTACCTCAAGAACGAGAAGCGCGGG
```

>EU637582.1 *Giardia intestinalis* isolate ISSGdA614 glutamate dehydrogenase gene, partial cds

```
ATGACCGAGCTTCAGAGGCACGTCCGGCGCCGACACTGACGTTCTGCGGGCGACATCGGCGTCCG
GCGCCCGCGAGATCGGCTATCTGTATGGGCAGTACAAGCGCCTGAGGAACGAGTTCACAGGCGTT
CTCACAGGCAAGAACGTCAAGTGGGGCGGGTCTTTCATCAGGCCGGAGGCCACGGGGCTATGGTG
CCGTCTACTTCTGAGGAGATGTGCAAGGACAACAATACCGTGATCAGGGGCAAGAATGTCCTCCT
TTCTGGCTCCGGCAACGTCCGCTCAGTTTGCTTGCGAGAAGCTCATTAGCTCGGCGCAAAGGTCCT
CACATTCTCAGACTCCAATGGGACCATTGTCGACAAGGACGGGTTCAACGAGGAGAAGCTGGCCCA
CCTCATGTACCTCAAGAACGAGAAGCGTGGGCGCGTCTCCGAGTTCAAGGATAAGTATCCTAGCGTC
GCGTACTATGAAGGTAAGAAGCCCTGGGAGTGCTTCGAGGGCCAGGTGGATTGCATCATGCCTTGC
GCCAC
```

>AF069059.1 *Giardia intestinalis* cell-line BAH-12 glutamate dehydrogenase (*gdh*) gene, partial cds

ATCAACGTTAACCGCGGCTTCCGTATCCAGTACAACCTCCGCTCTCGGGCCCTACAAGGGTGGTCTC  
CGCTTCCACCCCTCTGTCAACCTCTCGATCCTCAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAAGAACT  
CCCTTACCACGCTTCCGATGGGCGGTGGTAAGGGCGGCTCCGACTTCGATCCTAAGGGCAAGTCCG  
GACAACGAGGTCATGCGCTTTTGCCAGTCCCTTATGACTGAGCTCCAGAGGCACGTCCGGGGCTGAC  
ACCGACGTTCTGCTGGCGATATTGGCGTCCGCGGTCGCGAGATCGGTTATCTGTTTGGACAGTACA  
AGCGCCTCAGGAACGAGTTCACGGGCGTCTCACGGGCAAGAACATCAAGTGGGGCGGGTCTCTC  
ATCAGGCCAGAGGCCACAGGGTATGGAGCTGTCTACTTCTGAGGAGATGTGCAAGGATAACAACA  
CCGTAATCAGGGGCAAGAACGTCCTTCTCTCTGGCTCTGGCAACGTTGCCAGTACGCGTCCGAGA  
AGCTCCTCCAGCTCGGTGCGAAGGTCTCACCTTCTCGGACTCCAACGGGACTATCGTCGATA

>L40508.1 *Giardia lamblia* (isolate Ad-7) NADP-dependent glutamate dehydrogenase (*gdh*) gene, partial cds

ATGTTCCGTGTCCCCTGGATGGACGACGCCGGACGCATCAACGTCAACCGCGGCTTCCGTATCCAG  
TACAACCTCCGCTCTCGGGCCCTACAAGGGTGGTCTCCGCTTCCACCCCTCTGTCAACCTCTCGATC  
CTTAAGTTCCTCGGCTTTGAGCAGATCCTGAAGAACTCCCTTACCACGCTTCCGATGGGCGGTGGTA  
AGGGCGGCTCCGACTTCGATCCTAAGGGCAAGTCGGACAACGAGGTCATGCGCTTCTGCCAGTCCCT  
TTATGACCGAGCTCCAGAGGCACGTCCGGGGCTGACACCGACGTTCTGCTGGCGATATTGGCGTCCG  
GCGGTCCGAGATCGGTTATCTGTTTGGACAGTATAAGCGCCTCAGGAACGAGTTTACGGGCGTCCCT  
CACGGGCAAGAACATCAAGTGGGGCGGGTCTCTCATCAGACCAGAGGCCACAGGGTATGGAGCTG  
TCTACTTCTGAGGAGATGTGCAAGGATAACAACACCGTAATCAGGGGCAAGAACGTCCTCCTCTC  
TGGCTCTGGCAACGTTGCTCAGTACGCGTGCAGAAAGCTCCTCCAGCTCGGTGCGAAGGTCTCAC  
CTTCTCGGACTCCCACGGGACTATCGTCGATAAGGATGGCTTCAACGAGGAGAAGCTGGCCACCT  
CATAACCTCAAGAATGAGAAGCGCGGG

### 8.2.2. Secuencias *bg*

>AY655702.1 *Giardia intestinalis* beta-giardin gene, partial cds

AGCAGGTTCCATGACAAGATGGAGAACGAGATCGAGGTCCGCCGCGTCCGACGACACGCGCGT  
GAAGATGATCAAGGACGCCATTGCACACCTCGACAGGCTCATCCAGACGGAGTCGAGGAAGCGCC  
AGGCTCGTTCGAGGACATCCGCGAGGAGGTCAAGAAGTCCGCCGACAACATGTACCTAACGATCA  
AGGAGGAGATCGACACCATGGCTGCAAACCTCCGCAAGTCCCTTGCAGGAGATGGGCGACACTC  
AACAACGTTGAGACAAATCTCCAGAACCAGATCGCCATCCATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGG  
AAGGAGGCTCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAGAAAGGAA  
GAAGATGTACGACCAGCTCAACGAGAAGGTCGAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCCGCGATCG  
AGAAGGAGACGATCGCCCGGAGAGGGCCGTTAGCGCTGCCACGACAGAAGCGCTCACAAACAC  
GAAGCTCGTCGAGAAGTGCGTCAACGAGCAGCTCGAGAACGTCGCTCGGAGATCCGCGCTATCC  
AGGAGGAGATCGACCGCGAGAAGGCCGAGCGCAAGGAGGCAGAGGACAAGATCGTCAACACTCT  
CGAGGACGT

>AY072723.1 *Giardia intestinalis* strain KC8 beta giardin mRNA, partial cds

AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGCAGCCGAGACGGCGGTCAAGCTCAGCAACATGAACCAGC  
GCGTCAGCAGGTTCCACGACAAGATGGAGAACGAGATCGAGGTCCGCCGCGTCCGACGACGACAC  
GCGCGTGAAGATGATCAAGGACGCCATCGCACACCTCGACAGGCTCATCCAGACGGAGTCGAGGA

AGCGCCAGGCCTCGTTCGAGGACATCCGCGAGGAGGTCAAGAAGTCCGCCGACAACATGTACCTA  
 ACGATCAAGGAGGAGATCGACACCATGGCTGCAAACCTCCGCAAGTCCCTTGCGGAGATGGGCGA  
 CAACTCAACAACGTTGAGACAAATCTCCAGAACCAGATCGCCATCCATAACGACGCCATCGCGGC  
 TCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAG  
 AAAGGAAGAAGATGTACGACCAGCTCAACGAGAAGGTCGCAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCC  
 GCGATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGCGAGAGGGCCGTTAGTGCTGCCACGACAGAAGCGCTCA  
 CAAACACGAAGCTCGTTCGAGAAGTGCGTCAACGAGCAGCTCGAGAACGTGCCTCGGAGATCCGC  
 GCTATCCAGGAGGAGATCGACCGCGAGAAGGCCGAGCGCAAGGAGGCAGAGGACAAGATCGTCA  
 ACACTCTCGAGGACGTCGTCTCGAAGATCCAGGGCGGCCTC

>AY072724.1 *Giardia intestinalis* strain ISSGF7 beta giardin mRNA, partial cds

AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGGGACCGAGACGGCGGTCAAGCTCAGCAACATGAACCAGC  
 GCGTCAGCAGGTTCCACGACAAGATGGAGAACGAGATCGAGGTCCGCCGCGTTCGACGACGACAC  
 GCGCGTGAAGATGATCAAGGACGCCATCGCACACCTCGACAGGCTCATCCAGACGGAGTCGAGGA  
 AGCGCCAGGCCTCGTTCGAGGACATCCGCGAGGAGGTCAAGAAGTCCGCCGACAACATGTACCTA  
 ACGATCAAGGAGGAGATCGACACCATGGCTGCAAACCTCCGCAAGTCCCTTGCGGAGATGGGCGA  
 CAACTCAACAACGTTGAGACAAATCTCCAGAACCAGATCGCCATCCATAACGACGCCATCGCGGC  
 TCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGACCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGCAG  
 AAAGGAAGAAGATGTACGACCAGCTCAACGAGAAGGTCGCAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCC  
 GCGATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGCGAGAGGGCCGTTAGTGCTGCCACGACAGAAGCGCTCA  
 CAAACACGAAGCTCGTTCGAGAAGTGCGTCAACGAGCAGCTCGAGAACGTGCCTCGGAGATCCGC  
 GCTATCCAGGAGGAGATCGACCGCGAGAAGGCCGAGCGCAAGGAGGCAGAGGACAAGATCGTCA  
 ACACTCTCGAGGACGTCGTCTCGAAGATCCAGGGCGGCCTC

>AY072727.1 *Giardia intestinalis* strain BAH8 beta giardin mRNA, partial cds

AAGCCCGACGACCTCACCCGCAGTGGGACTGAGACGGCAGTCAAGCTCAGCAACATGAACCAGC  
 GCGTCAGCAGGTTCCACGACAAGATGGAGAACGAGATCGAGGTCCGCCGCGTTCGACGACGACAC  
 GCGTGTGAAGATGATCAAGGACGCCATCGCGCACCTCGACAGACTCATCCAGACAGAGTCGAGGAA  
 GCGCCAGGCCTCGTTCGAGGACATCCGCGAGGAAGTCAAGAAGTCTGCCGACAACATGTACCTGA  
 CGATCAAGGAGGAGATCGACACCATGGCCGCAAACCTCCGCAAGTCTCTCGCTGAGATGGGCGAC  
 ACGCTCAACAACGTCGAGACGAACCTCCAGAACCAGATCGCCATCCACAACGACGCCATCGCAGC  
 CCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAACGACCTCGAGACAGGCATCGCCACGGAGAACGCC  
 GAGAGGAAGAAGATGTATGACCAGCTCAACGAGAAAAGTCGCAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCT  
 GCCATCGAGAAGGAGACGATCGCCCGCGAGAGGGCCGTCAGCGCCGCCACGACAGAGGCCCTC  
 ACAAACACGAAGCTCGTTCGAGAAGTGCGTCAACGAGCAGCTCGAGAACGTGCCTCGGAGATCCG  
 CGCCATCCAGGAGGAGATCGACCGCGAGAAGGCAGAGCGCAAGGAGGCAGAGGACAAGATCGTC  
 AACAACTCGAGGACGTCGTCTCGAAGATCCAGGGCGGCCTC

### 8.3. ANEXO III: Secuencias de referencia de PUBMLST *Blastocystis* empleadas para la caracterización molecular de *Blastocystis* sp.

Alelo 4. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 4*

TATAGTTTATTTGGTGAAGTGTACTACTTGGATAACCGTAGTAATTCTAGGGCTAATACATGAGAAAAGTCCT  
CTGGTGAGGTGTGTTTATTAGAATGAAAACCATATGCTTCGGCATGATAGTGAGTAATAGTAACCTATCGT  
ATCGCATGCTTAATGTAGCGATGAGTCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTCGATGGTAGTATATGGG  
CCTACCATGGCAGTAACGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGG  
CTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACA  
ATAAA

Alelo 9. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 9*

TATAGTTTATTTGGTGAAGGATACTAATTGGATAACCGTAGTAATTCTAGGGCTAATACATGAGTAAAGTCC  
CGTTGGGATGTGTTTATTAGAATGAAAACCATATGCTTCGGCATGATAGTGAGTAATAGTAACCTATCGTA  
TCGCATGCTTAATGTAGCGATGAGTCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTCGATGGTAGCATATGGGT  
CTACCATGGCAGTAACGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGC  
TACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAA  
TAAA

Alelo 11. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 11*

TATAGTTTATTTGGTGAAGGATACTAATTGGATAACCGTAGTAATTCTAGGGCTAATACATGAGTAAAGTCC  
CGTTGGGATGTGTTTATTAGAATGAAAACCATATGCTTCGGCATGATAGTGAGTAATAGTAACCTATCGTA  
TCGCATGCTTAAAGTAGCGATGAGTCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTCGATGGTAGCATATGGGT  
CTACCATGGCAGTAACGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGC  
TACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAA  
TAAA

Alelo 12. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 12*

TATAGTTTATTTGGTGAAGGATACTAATTGGATAACCGTAGTAATTCTAGGGCTAATACATGAGTAAAGTCC  
CATTGGGATGTGTTTATTAGAATGAAAACCATATGCTTCGGCATGATAGTGAGTAATAGTAACCTATCGTAT  
CGCATGCTTAAAGTAGCGATGAGTCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTCGATGGTAGCATATGGGT  
TACCATGGCAGTAACGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCT  
ACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAA  
AAA

Alelo 21. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 21*

TATAGTTTATTTGATGCAATCTACTACTTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGGTAAAGTCCT  
CAACTTGTGAAGAGGTGTATTTATTAGAATGAAAACCATAGACTTAGTCTATTCGTGAGTAATAATAACTT  
ATCATATCGCATGCTTAGGTAGCGATATGTCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTCGATGGTAGTGAT  
TGGACTACCATGGCAGTAACGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGA  
TGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTG  
ACAATAAA

Alelo 34. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 34*

TATAGTTTATTTGATGAAGAATACTAATTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGTATAAAGTCTT  
GTAGACTGCATTTATTAGAATGAAAACCATAGGTTTCGGCCTATTCGTGAGTAATAATAACTAATCATATC  
GTATGCTTATGTAACGATGTGTCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTAC  
CATGGCAGTAACGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTTTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTACC  
ACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAA

Alelo 36. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 36*

TATAGTTTATTTGATGAAGAATACTAATTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGTATAAAGTCTT  
GTAGACTGCATTTATTAGAATGAAAACCATAGGTTTCGGCCTATTCGTGAGTAATAATAACTAATCATATC  
GTATGCTTAAAGTAACGATGTGTCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTAC  
CATGGCAGTAACGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTTTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTACC  
ACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAA

Alelo 37. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 37*

TATAGTTTATTTGATGAAGAATACTAATTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGTATAAAGTCTT  
GTAGACTGCATTTATTAGAATGAAAACCATAGGTTTCGGCCTATTCGTGAGTAATAATAACTAATCATATC  
GTATGCTTACGTAACGATGTGTCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTAC  
CATGGCAGTAACGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTTTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTACC  
ACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAA

Alelo 42. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 42*

TATAGTTTATTTGATGAAAAGTACTACTTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGATAAAATCCTC  
GACTTTGAAGAGGTGTATTTATTAGAATGAAACCAATAGACTTCGGTCTGTTTGTGAGTAATAATAACTAAT  
CGTATCGCATGCTTAGGTAGCGATATGTCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGTGTATTG  
GACTACCATGGCAGTAACGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTTTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATG  
GCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACATAGGGAGGTAGTGAC  
AATAAA

Alelo 92. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 92*

TATAGTTTATTTGATGAAAAGTACTACTTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGATAAAATCCTC  
GACTTTGAAGAGGTGTATTTATTAGAATGAAACCAAGAGACTTCGGTCTATTTGTGAGTAATAATAACTAAT  
CGTATCGCATGCTTAGGTAGCGATATGTCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGTGTATTG  
GACTACCATGGCAGTAACGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTTTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATG  
GCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACATAGGGAGGTAGTGAC  
AATAAA

Alelo 99. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 99*

TATAGTTTATTTGGAATAGTTTCTATATGGATAACCGTAGTAATTCTAGGGCTAATACATGTGTTTTCTTTGGT  
GGGCAACCATTAAGAAGTACTTATTAGACATAAAACCAATTTAATGTTGTTGTGAGTAATAATAATTGTTG  
ACTTTATCGCATGCTTGTAGTAGCGATGTTCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTTCGATGGTAGTGT  
ATTGGACTACCATGGCAGTAACGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTTTCGGAGAGGGAGCCTGAGA  
GATGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGT  
TGACAATAAA

Alelo 104. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 104*

TATAGTTTATTTGGAATAGTTTCTATATGGATAACCGTAGTAATTCTAGGGCTAATACATGTGTTTTCTTTGAT  
GGGCAACCATTAAAGAAGTACTTATTAGGCATAAAACCAATTTAATGTTGTTGTGAGTAATAATAATTGTTG  
ACTTTATCGCATGCTTGTTAGTAGCGATGTTCCCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTCGATGGTAGTGT  
ATTGGACTACCATGGCAGTAACGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTTTCGGAGAGGGAGCCTGAGA  
GATGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAG  
TGACAATAAA

Alelo 122. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 122*

TATAGTTTATTTGGATGAATTTTTCTATGGATAACCGTAGTAATTCTAGGGCTAATACATGTTGTAATCTCTTT  
GAGATTTTCTTATTAGAATAAAACCAATTGTATTAGTGAGTAATAATAATAGAATCGATCGCATGCTTTTGTA  
GCGATAATCCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTAAC  
GGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTTTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTACCACATCCAAGGAA  
GGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAA

Alelo 123. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 123*

TATAGTTTATTTGGATGAATTTTTCTATGGATAACCGTAGTAATTCTAGGGCTAATACATGTTATAATCTCTTT  
GAGATTTTCTTATTAGAATAAAACCAATTGTATTAGTGAGTAATAATAATAGAATCGATCGCATGCTTTTGTA  
GCGATAATCCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTAAC  
GGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTTTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTACCACATCCAAGGAA  
GGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAA

Alelo 134. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 134*

ATAGTTTATTTGGATGAATTTTTCTATGGATAACCGTAGTAATTCTAGGGCTAATACATGTTGTAATCTCTTC  
GAGATTTTCTTATTAGAATAAAACCAATTGTATTAGTGAGTAATAATAATAGAATCGATCGCATGCTTTTGTA  
GCGATAATCCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTAAC  
GGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTTTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTACCACATCCAAGGAA  
GGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAA

Alelo 154. *Allele information - 18S\_rRNA\_barcode: 154*

CAAAGATTAAGCCATGCATGTGTAAGTCTAAATAGTTTTAGTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTATATCAG  
TTATAGTTTATTTGGATGAATTTTTCTATGGATAACCGTAGTAATTCTAGGGCTAATACATGTTATAATCTCTT  
CGAGATTTTCTTATTAGAATAAAACCAATTGTATTAGTGAGTAATAATAATAGAATCGATCGCATGCTTTTG  
AGCGATAATCCTTTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTCGATGGTAGTGTATTGGACTACCATGGCAGTAA  
CGGGTAACGAAGAATTTGGGTTTCGATTTTCGGAGAGGGAGCCTGAGAGATGGCTACCACATCCAAGG  
AAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATCACAATGCG  
GAACCTTTGGTTTTGCAATTGGATTGAGAAGAAGGTACAAATCATATCGATAAACAATTGGAGGGCAAG  
TCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCC